

На правах рукописи

Закирьянова Гузалия Фаритовна

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ 25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА И ОЛЕСОКСИМА НА
СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СОЕДИНЕНИИ
МЫШИ**

1.5.2 – биофизика

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН)

Научный руководитель: **Петров Алексей Михайлович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: **Мухина Ирина Васильевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород

Боговид Татьяна Халиловна – доктор биологических наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», г. Казань

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» кафедра физиологии человека и животных биологического факультета, г. Москва

Защита состоится «8» июня 2022 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 при ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН: <http://kibb.knc.ru/>.
Автореферат разослан « » апреля 2022 г.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru).

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Освобождение нейромедиатора из пресинаптических нервных окончаний является ключевым этапом нейротрансмиссии. Молекулы нейромедиатора упакованы в синаптические везикулы (СВ), которые путем экзоцитоза освобождают нейромедиатор в синаптическую щель в ответ на вход ионов кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы (Mateos-Aparicio, Rodriguez-Moreno, 2020). Экзоцитоз СВ – тонко регулируемый процесс, во многом определяющий пластичность нейротрансмиссии. Эффективность экзоцитоза зависит не только от функционирования собственно аппарата слияния мембран, но и доставки (мобилизации) везикул в сайты экзоцитоза (активные зоны) (Brunger et al., 2019; Held et al., 2020; Bonnycastle et al., 2021). В качестве элементов, регулирующих экзоцитоз, выступают сами молекулы нейромедиаторов, ко-нейромедиаторы, а также разнообразные пептиды и гормоны. В итоге процесс нейросекреции тонко регулируется, что адаптирует синаптическую передачу к текущей электрической активности нейронов (Koroleva et al., 2020; Traina, 2020).

Потенциальными модуляторами нейротрансмиссии, в том числе на уровне пресинаптической мембраны, являются холестерин-подобные молекулы. Отчасти это определяется высокой тропностью синаптических мембран к холестерину, который используется для построения липидных рафтов, где расположены важные белки, обеспечивающие экзо-эндоцитоз и рецепцию нейромедиатора. Особенно высоко содержание холестерина в мембранах СВ (Krivoi, Petrov, 2019). Ранее было показано, что важный метаболит мозгового холестерина – 24-гидроксихолестерин – способен через негеномный и геномный механизмы регулировать освобождение нейромедиатора (Ohyama et al., 2006; Paul et al., 2013; Kasimov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2018; Mukhutdinova et al., 2019). В рамках представленной работы мы сосредоточились на схожей по строению молекуле 25-гидроксихолестерине (25ГХ). 25ГХ в наномолярных концентрациях присутствует в норме в нейрональных тканях, и его уровень значительно возрастает при индукции воспаления. В последнем случае микроглиальные клетки и макрофаги начинают интенсивно продуцировать 25ГХ из холестерина (Liu et al., 2018). Уровень 25ГХ также возрастает при ряде нейродегенеративных заболеваний, в том числе при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) (Zakurjanova et al., 2021), который сопровождается ранним нарушением нервно-мышечной передачи, зачастую предшествующий гибели нейронов и последующей тяжелой мышечной атрофии (Kim et al., 2017). Однако влияние 25ГХ на нервно-мышечную передачу не изучено. Также в поле наших интересов попало синтетическое производное холестерина – олесоксим (4-холестен-3-он оксим), поскольку это производное холестерина в ряде моделей нейродегенеративных заболеваний, в том числе при БАС, проявляет нейропротекторные

свойства (Weber et al., 2019). Ранние работы нашей лаборатории выявили его способность усиливать экзоцитоз и стабилизировать липидные микродомены в пресинаптических нервных окончаниях лягушки (Kasimov et al., 2016). При этом данных о его влиянии на синаптическую передачу у млекопитающих нет.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования являлось изучение эффектов и механизмов действия двух производных холестерина (25-гидроксихолестерина и олесоксима) на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мыши.

Задачи:

1. С использованием электрофизиологического и флуоресцентного методов оценить влияние 25ГХ на экзоцитоз и мобилизацию синаптических везикул, а также на амплитудно-временные параметры постсинаптических ответов.

2. Выявить сигнальные молекулы и пути, задействованные в реализации эффекта 25ГХ на процессы экзоцитоза и мобилизации синаптических везикул.

3. Изучить ранние структурные и функциональные изменения в нервно-мышечном синапсе в модели БАС и оценить влияние на них 25ГХ.

4. Выявить влияние и механизмы действия олесоксима на экзоцитоз и мобилизацию синаптических везикул, а также на амплитудно-временные параметры постсинаптических ответов.

Научная новизна. Исследования эффектов производных холестерина на различные клеточные процессы в последние годы становятся актуальными, поскольку холестерин и его производные играют важную роль не только в построении мембраны, но и в межклеточной сигнализации и регуляции метаболизма липидов (Krivoi, Petrov, 2019). Результаты проведенной нами работы позволили выявить эффекты двух оксистеринов в субмикромольных концентрациях на нервно-мышечную передачу в диафрагме мыши и раскрыть механизмы их действия. Впервые нами было обнаружено, что 25-гидроксихолестерин (эндогенный гидроксистерин) способен усиливать мобилизацию синаптических везикул и последующий экзоцитоз, а полученный синтетическим способом олесоксим, наоборот, ограничивает этот процесс. Также был раскрыт новый сигнальный путь действия 25ГХ, зависимый от активации мембранных X-рецепторов печени (LX-рецепторы), G_i -белка и его $\beta\gamma$ -димера. В итоге это приводит к активации фосфолипазы C (ФЛС) с последующим выбросом кальция из депо и стимуляции протеинкиназы C (ПКС). Также впервые обнаружено, что на досимптомной стадии у мышей с моделью БАС (mSOD

мышци) изменяются свойства синаптических мембран (снижение целостности липидных рафтов, увеличение текучести мембраны, перекисное окисление липидов), а 25ГХ способен устранять эти нарушения. Впервые нами было показано, что олесоксим способен замедлять нервно-мышечную передачу, а анион-транспортный белок плазматической мембраны (предположительно VDAC), активируемый олесоксимом, участвует в регуляции экзоцитоза и мобилизации синаптических везикул. Индуцируемый олесоксимом механизм пресинаптического ингибирования связан с притоком ионов хлора в пресинаптическое нервное окончание. Это впервые указывает на существование хлор-зависимого угнетения нервно-мышечной передачи в синапсе мышцы.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе впервые получены данные, расширяющие представление о влиянии производных холестерина, 25ГХ и олесоксима, на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении (НМС). Ряд литературных данных свидетельствует о том, что 25ГХ является важным регулятором иммунного ответа и усиленно вырабатывается при БАС (Cyster et al., 2014; Jang et al., 2016; Kim et al., 2017; Cao et al., 2020). В свою очередь, олесоксим имеет нейропротекторные свойства при различных нейродегенеративных заболеваниях за счет угнетения образования митохондриальной поры (Weber et al., 2019). В нашей работе было показано, что 25ГХ и олесоксим в субмикромольных концентрациях имеют выраженные эффекты на нервно-мышечную передачу. Раскрытие механизмов действия этих стероидов позволило обнаружить новые пути регуляции нервно-мышечной передачи, что может быть применено в будущем при разработке методов модуляции синаптической передачи. Основываясь на полученных в работе фактах, можно утверждать, что оксистерины являются важным классом нейромодуляторов, которые можно использовать для коррекции нервно-мышечных дисфункций. Результаты научной работы вносят вклад в концепцию о производных холестерина, как мощных регуляторов физиологических процессов.

Методология. В экспериментах применялось несколько методов, позволяющих оценить взаимосвязанные аспекты синаптической передачи.

Степень достоверности. Количество проведенных экспериментов, статистическая обработка данных и соответствие результатов поставленным задачам являются основанием для подтверждения достоверности. Все результаты исследования опубликованы в ведущих рецензируемых журналах, соответственно, прошли все этапы независимой экспертизы.

Апробация результатов и связь работы с научными программами. По материалам диссертации было опубликовано 20 работ, среди которых 11 статей в журналах из списка,

рекомендованного ВАК. Работа проводилась с 2017 по 2021 гг. Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 17-04-00046 А, РФФИ № 20-04-00077 А, а также стипендией Президента РФ молодым ученым и аспирантам. Электрофизиологические эксперименты частично проведены совместно с к.б.н. Ценцевицким А.Н. (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Эксперименты с использованием флуоресцентного метода частично проведены совместно с Кузнецовой Е.А. и Гильмутдиновым А.И. (Казанский (Приволжский) федеральный университет).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит 155 страниц машинописного текста и включает список сокращений, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, их обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 285 источников. В работе представлены 1 таблица и 30 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовались нервно-мышечные препараты диафрагмальной мышцы лабораторных мышей, мышей дикого типа, мышей с моделью БАС (mSOD). mSOD мыши – трансгенные мыши линии B6SJL-Tg (SOD1^{G93A})dl1Gur/J с экспрессией мутантной формы G93A (в 93 кодоне глицин заменен на аланин) человеческой супероксиддисмутазы-1. Мыши дикого типа – контрольная линия мышей B6SJL. Содержание животных и проведение экспериментов соответствовали правилам по использованию лабораторных животных. С использованием внутриклеточных стеклянных микроэлектродов регистрировались потенциалы концевой пластинки (ПКП) и миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП). Для детекции процессов эндо- и экзоцитоза применяли краситель FM1–43, который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и захватывается синаптическими везикулами в ходе стимуляции нерва. В экспериментах использовались красители для оценки митохондриальных активных форм кислорода (АФК) (MitoSox), внутриклеточных АФК (CM-H2DCFDA), Cl⁻ (MEQ), Ca²⁺ (Oregon Green®488 BAPTA-1), H₂O₂ (Amplex® Red Hydrogen Peroxide, резорурфин), холина (Amplex® Red Acetylcholine Assay Kit). Иммунофлуоресцентный метод использовался для анализа распределения белков VDAC и LX-рецепторов в синаптическом компартменте. Для оценки свойств мембран применялись красители, чувствительные к липидному микроокружению: *XT-B (липидные рафты)*,

BODIPY FL C5-ганглиозид GM1, 22NBD-холестерин, F2N12S (асимметрия мембран), BODIPY™ FL C5-церамид, BODIPY-холестерин, Image-iT (перекисное окисление липидов). Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Origin Pro. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; n – количество мышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 25ГХ на электрофизиологические параметры. Аппликация 25ГХ (0.1 и 1 мкМ) не приводила к изменениям параметров МПКП и ПКП (при частоте стимуляции 0.2 Гц), за исключением уменьшения частоты МПКП при действии 25ГХ в концентрации 10 мкМ.

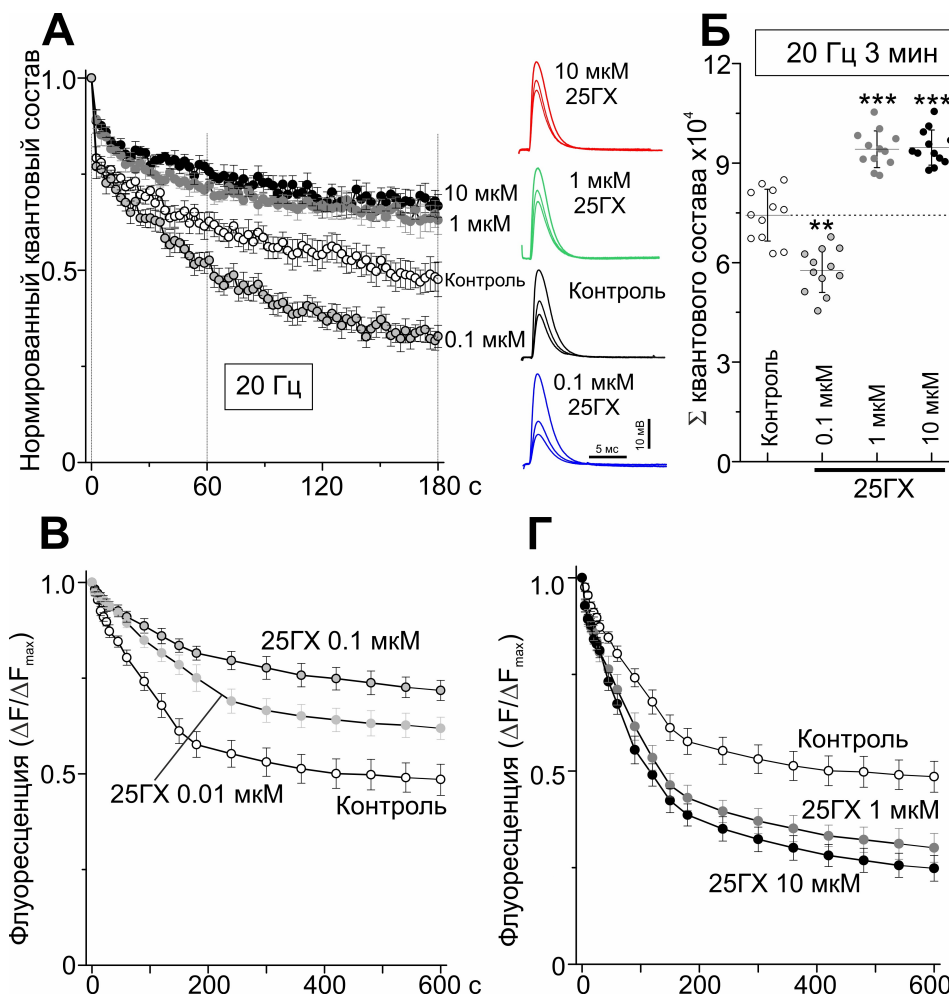


Рис. 1. Влияние 25ГХ на высвобождение нейромедиатора и экзоцитоз FM1-43. А – нормированная кривая изменения квантового состава ПКП. Справа показаны ПКП, записанные на 0, 60, 180 с стимуляции с частотой 20 Гц. Б – суммарное количество квантов, высвобожденных при стимуляции с частотой 20 Гц в течение 3 мин. В и Г – кинетика экзоцитоза красителя FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц после воздействия высоких и низких концентраций 25ГХ. В, Г: ось Y –

интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{max}$) относительно значения перед стимуляцией. Среднее значение ± стандартное отклонение; n=12-15 для каждой группы. **P<0.01, ***P<0.001, по сравнению с контролем.

При умеренно-частотной (20 Гц) активности 25ГХ (0.1 мкМ) приводил к усилению депрессии квантового высвобождения (рис. 1А) (на ~23%). Более высокие концентрации (1 и

10 мкМ) 25ГХ ослабляли снижение квантового состава при частоте 20 Гц (на ~27%). Таким образом, 25ГХ может модулировать высвобождение нейромедиатора при умеренно-частотной активности в концентрационно-зависимой манере: низкая концентрация (0.1 мкМ) уменьшает высвобождение ацетилхолина (АХ), более высокие концентрации (1 и 10 мкМ) увеличивают его.

Кинетика экзоцитоза FM1-43. Нервные терминалы, предварительно загруженные FM1-43, подвергали стимуляции для экзоцитоза красителя FM1-43 из СВ. В низких концентрациях (0.01 и 0.1 мкМ) 25ГХ снижал скорость экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 1В), и через 3 мин стимуляции потеря красителя из нервных терминалей была ниже на $43\pm 8\%$ и $57\pm 4\%$ ($p < 0.001$, $n = 15$), соответственно. Напротив, более высокие концентрации (1 и 10 мкМ) 25ГХ ускоряли экзоцитоз FM1-43 (рис. 1Г), и потеря FM1-43 была выше на $33\pm 8\%$ и $44\pm 6\%$, соответственно, по сравнению с контролем. Эти результаты согласуются с электрофизиологическими данными и указывают на снижение и увеличение участия СВ в экзоцитозе после аппликации 25ГХ в низких (0.01 и 0.1 мкМ) и высоких (1 и 10 мкМ) концентрациях, соответственно.

Зависимость эффектов 25ГХ от NMDA- и LX-рецепторов. В нормальном состоянии концентрация 25ГХ в плазме и тканях очень низкая и может увеличиваться до 1 мкМ во время воспалительных реакций. Поэтому мы сосредоточились на изучении влияния 25ГХ в концентрации 1 мкМ. 25ГХ является мощным агонистом ядерных LX-рецепторов, активно контролирующей клеточный гомеостаз холестерина (Cyster et al., 2014), а в ЦНС может модулировать работу NMDA-рецепторов (Linsenbardt et al., 2014). На фоне селективного антагониста LX-рецепторов (GSK 2033) 25ГХ терял способность усиливать экзоцитоз FM1-43 и, наоборот, снижал скорость потери красителя FM1-43 при частоте стимуляции 20 Гц (рис. 2А). При аппликации блокатора NMDA-рецепторов (D-AP5) 25ГХ продолжал ускорять экзоцитоз FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц.

Таким образом, потенцирующий эффект 25ГХ может зависеть от LX-, но не от NMDA-рецепторов в НМС. Подтверждением этому стали электрофизиологические эксперименты, где 25ГХ после аппликации GSK 2033 терял способность ослаблять депрессию секреции квантов нейромедиатора при стимуляции с частотой 20 Гц и, наоборот, угнетал секрецию (рис. 2Б). Следовательно, при блокировании LX-рецепторов эффект 25ГХ на нейротрансдукцию инвертировался и напоминал эффект более низких концентраций 25ГХ.

Локализация LX-рецепторов в НМС и роль липидных рафтов в эффекте 25ГХ. С

использованием иммунофлуоресцентного метода было обнаружено присутствие LXβ-рецепторов в НМС в плазматических мембранах (рис. 2В). Неядерные LXβ-рецепторы могут располагаться в богатых холестерином липидных рафтах в сосудистых эндотелиальных клетках (Ishikawa et al., 2013). Инкубация в метил-β-циклодекстрине (МβЦД, 0.1 мМ), агенте, снижающем уровень холестерина преимущественно в липидных рафтах, нарушала картину точечного окрашивания, размывая флуоресцентный сигнал (рис. 2В) от меченных LXβ-рецепторов. Таким образом, LXβ-рецепторы находятся в липидных рафтах НМС. Использование маркера липидных рафтов ХТ-В также показало точечное окрашивание в НМС, а МβЦД заметно уменьшал окрашивание ХТ-В, указывая на частичное разрушение липидных рафтов.

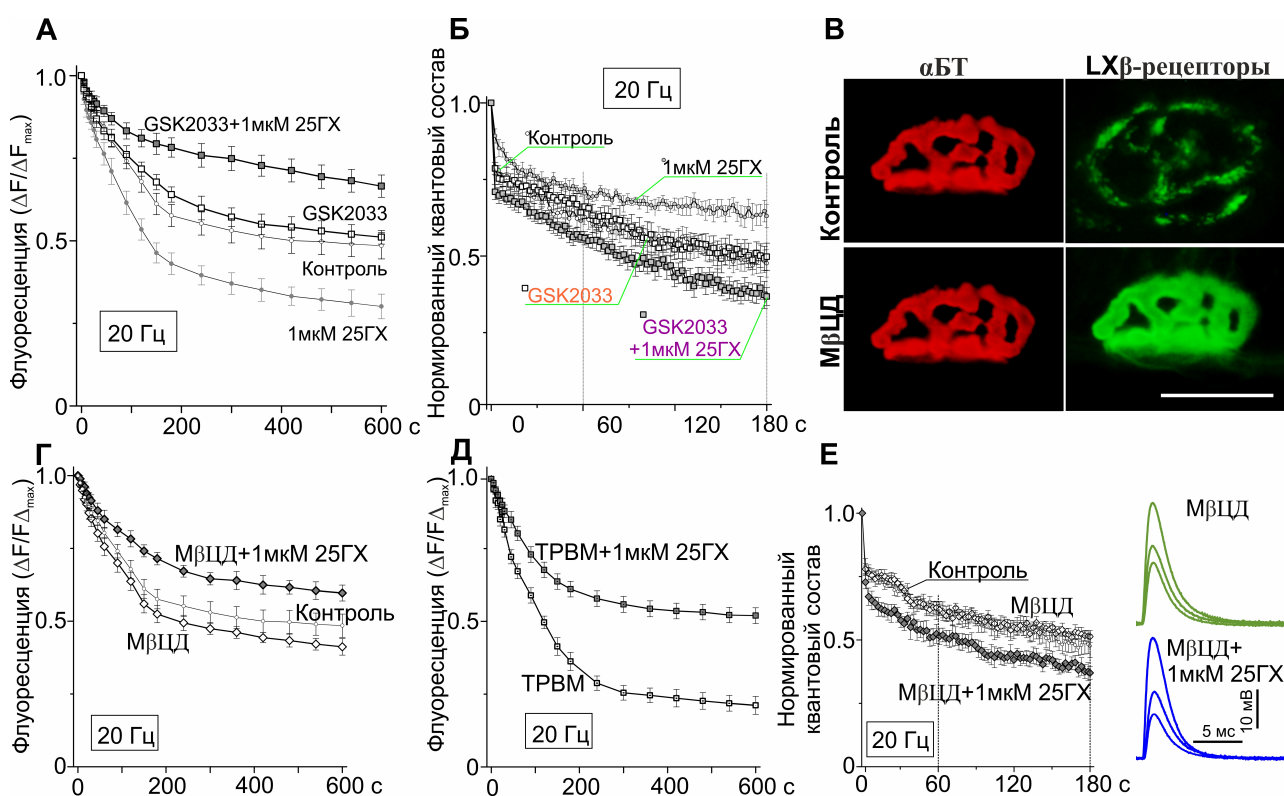


Рис. 2. Роль LX-рецепторов, липидных рафтов и рецепторов эстрогена α (ЭРα) в эффекте 25ГХ (1 мкМ) на экзоцитоз. А, Г, Д – нормированные кривые экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц после обработки МβЦД, при аппликации антагонистов LX-рецепторов (GSK2033) и ЭРα (ТВРМ). Б, Е – нормированные кривые снижения квантового состава при стимуляции (20 Гц) в присутствии GSK2033 и после воздействия МβЦД отдельно или в комбинации с 25ГХ (1 мкМ). Е, справа – характерные ПКП на 0, 60, 180 с стимуляции (20 Гц). В – иммунолокализация LXβ-рецепторов в НМС в контрольных и МβЦД-обработанных препаратах. Масштабная линейка – 20 мкм. n=10-14 для каждой кривой. **P<0.01, по сравнению с контролем.

Участие липидных рафтов в потенцирующем эффекте 25ГХ на экзоцитоз.

Предварительная обработка МβЦД (0.1 мМ) отменяла 25ГХ-зависимое (1 мкМ) усиление

экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 2Г). Неядерные LX-рецепторы могут непосредственно активировать мембранный рецептор эстрогена α (ЭР α) в липидных рафтах эндотелиальных клеток (Ishikawa et al., 2013). Блокатор ЭР α (ТРВМ) также предотвращал 25ГХ-опосредованное увеличение скорости экзоцитоза FM1-43 (рис. 2Д). Можно предположить, что целостность липидных рафтов и активация ЭР α необходимы для способности 25ГХ потенцировать вовлечение СВ, содержащих краситель, в экзоцитоз. Таким образом, 25ГХ активирует LX-рецепторы, которые могут взаимодействовать с ЭР α в липидных рафтах. Результаты электрофизиологических экспериментов также показали, что предварительная обработка МВЦД предотвращала способность 25ГХ способствовать высвобождению нейромедиатора (рис. 2Е).

Влияние 25ГХ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и роль Ca^{2+} в эффекте 25ГХ на экзоцитоз. Ключевые этапы рециклирования СВ, включая мобилизацию СВ, зависят от внутриклеточного Ca^{2+} и активности Ca^{2+} -зависимых ферментов (Rizzoli, 2014). 25ГХ приводил к увеличению флуоресценции кальциевого красителя Oregon Green BAPTA 1 (рис.3А) (возвращение к исходному уровню наблюдалось через 7-9 мин), которая частично ослаблялась в присутствии антагониста LX-рецепторов и не изменилась в присутствии блокатора NMDA-рецепторов (рис. 3Б). 25ГХ может активировать G-белок-связанный рецептор GPR183, который экспрессируется в основном в иммунных клетках (Cyster et al., 2014). Антагонист GPR183 (NIBR 189) не изменял действие 25ГХ на внутриклеточный уровень Ca^{2+} (рис. 3Б).

Таким образом, 25ГХ-опосредованное увеличение цитозольного Ca^{2+} частично может происходить из-за активации LX-рецепторов. Вход Ca^{2+} из внеклеточной среды или высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) через рианодиновые рецепторы (Ри-рецепторы) или инозитолтрифосфатные рецепторы (ИТФ-рецепторы) являются основными путями повышения цитозольного Ca^{2+} в синапсе. 25ГХ-индуцированное увеличение цитозольного Ca^{2+} сохранялось в растворе без Ca^{2+} , содержащем внеклеточный буфер Ca^{2+} (EGTA), а также в присутствии блокатора Ри-рецепторов дантролена (рис. 3В). ТМВ-8, блокатор ИТФ-рецепторов, предотвращал увеличение цитозольного Ca^{2+} в ответ на 25ГХ (рис. 3В).

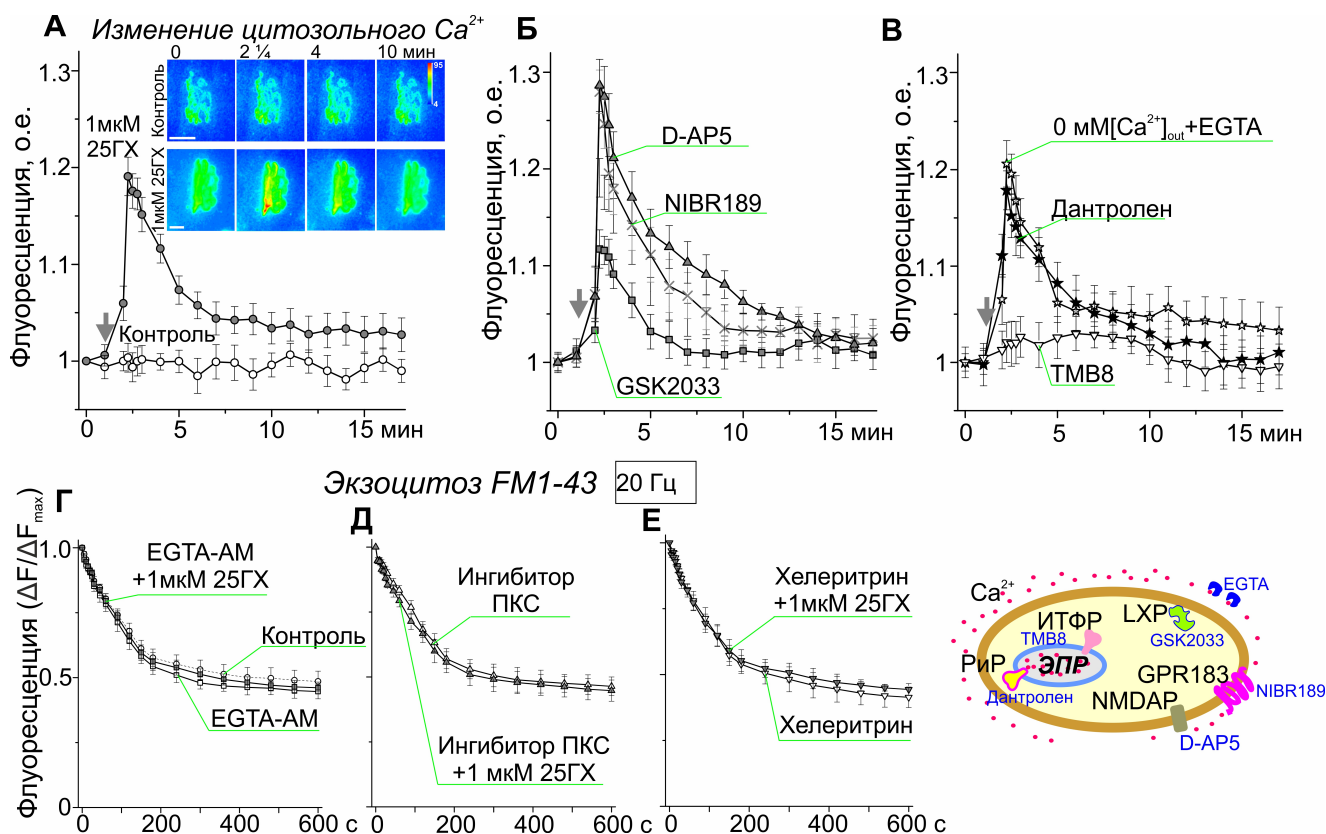


Рис. 3. Роль Ca^{2+} сигнализации в эффекте 25ГХ (1 мкМ). А-В – нормированная интенсивность красителя на внутриклеточный Ca^{2+} (Oregon Green® 488 BAPTA-1) в условиях блокирования NMDA- (D-AP-5), LX- (GSK2033), Ри- (дантролен), ИТФ-рецепторов (ТМВ8), GPR183 (NIBR189), а также удаления внеклеточного Ca^{2+} (физиологический солевой раствор без Ca^{2+} , содержащий внеклеточный Ca^{2+} буфер EGTA). Момент начала аппликации 25ГХ (или контрольного раствора) указан стрелкой. Внизу на схеме указаны молекулярные мишени для используемых фармакологических веществ. Г-Е – нормированный временной ход экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в условиях внутриклеточного хелатирования Ca^{2+} EGTA-AM (Г) и блокирования ПКС пептидным блокатором (Д) или хелеритрином (Е). Масштабная линейка – 10 мкм. n=10-11 для каждой кривой.

Таким образом, 25ГХ может провоцировать высвобождение Ca^{2+} из ЭПР через ИТФ-рецепторы. 25ГХ на фоне EGTA-AM терял свою способность увеличивать скорость экзоцитоза FM1-43 (рис. 3Г). Повышение цитозольного Ca^{2+} может влиять на нейротрансдукцию через активацию сигнальных ферментов. Учитывая, что 25ГХ-индуцированное повышение Ca^{2+} зависело от активации ИТФ-рецепторов, мы проверили участие ПКС в эффекте 25ГХ. Мембранопроникающий пептидный блокатор Ca^{2+} - и фосфолипид-зависимой ПКС полностью предотвращал эффект 25ГХ на потерю красителя при частоте 20 Гц (рис. 3Д). Аналогично, хелеритрин хлорид, мощный изоформ-неспецифический блокатор ПКС, отменял 25ГХ-опосредованные изменения в экзоцитозе FM1-43 (рис. 3Е). Таким образом, 25ГХ может модулировать участие СВ в экзоцитозе ПКС- и Ca^{2+} -зависимым образом.

Сигнальные молекулы, участвующие в эффекте 25ГХ на экзоцитоз FM1-43.

Потенциально, комплекс LX-рецептор/ЭРА на плазматической мембране в синапсе может

влиять на G_i -белок, поскольку мембранно-ассоциированный ЭР α может напрямую связывать и активировать его (Kumar et al., 2007). Ингибирование G_i -белка путем предварительной обработки коклюшным токсином отменило 25ГХ-опосредованное увеличение скорости потери FM1-43 (рис. 4А). Таким образом, LX-рецептор-зависимая активация G_i -белка может быть вовлечена в стимулирующий экзоцитоз эффект 25ГХ. $\beta\gamma$ -димер G_i -белка может активировать ФЛС (Smrcka, 2008).

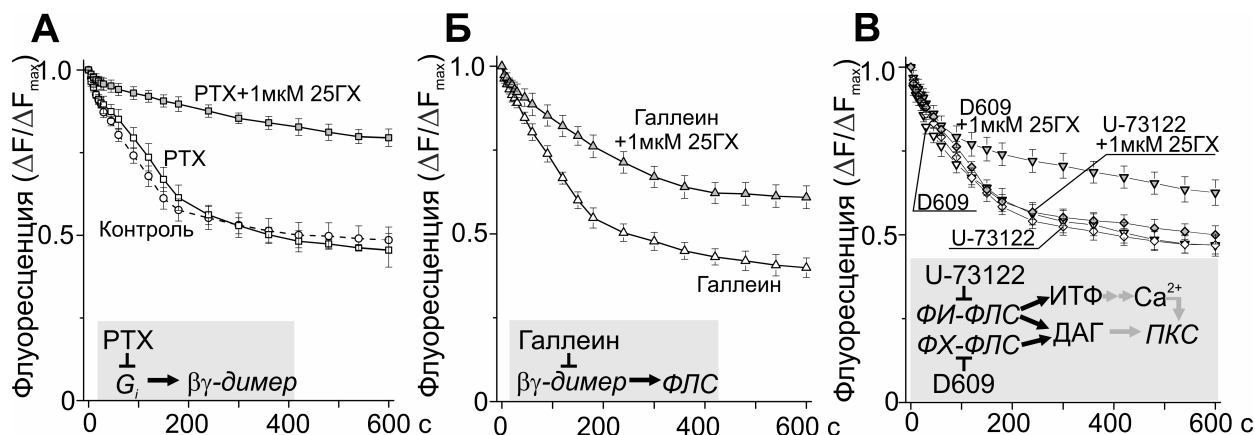


Рис. 4. Нормированная кинетика экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в препаратах, предварительно обработанных блокаторами G_i -белка (РТХ – коклюшный токсин), $\beta\gamma$ -димера G -белка (галлеин) и ФЛС (D609 и U-73122). $n=14$ для каждой кривой. *** $P<0.001$, по сравнению с контролем.

Соответствует этому предположению то, что галлеин (блокатор $\beta\gamma$ -димера), D609 (блокатор фосфодитилхолин-специфичной ФЛС (ФХ-ФЛС)) и U-73122 (блокатор фосфатидилинозитол-специфической ФЛС (ФИ-ФЛС)) действовали так же, как и блокирование G_i -белка (рис. 4Б, В). Интересно, что 25ГХ (1 мкМ) оказывал обратный эффект (характерный для его наномолярных концентраций) на высвобождение FM1-43 при блокировании G_i -белка, его $\beta\gamma$ -димера или ФХ-ФЛС. В то же время, блокирование ФИ-ФЛС и ПКС, а также хелатирование Ca^{2+} полностью подавляли эффект 25ГХ. Таким образом, потенцирующий эффект 25ГХ на участие СВ в экзоцитозе зависит от G_i -белка/ $\beta\gamma$ -димера G -белка/ФХ-ФЛС и ФИ-ФЛС/ Ca^{2+} /ПКС пути.

Активные формы кислорода в эффекте 25ГХ на экзоцитоз FM1-43. АФК могут служить потенциальными усилителями Ca^{2+} /ПКС сигнализации. 25ГХ вызывал увеличение флуоресценции индикатора АФК (СМ-Н2DCF) (рис. 5А). Хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} (с помощью EGTA-AM) предотвратило увеличение флуоресценции СМ-Н2DCF в ответ на 25ГХ. Аналогично, эксперименты с резоруфином (Amplex® Red Hydrogen Peroxide), чувствительным к H_2O_2 , показали, что 25ГХ может увеличивать внеклеточный уровень H_2O_2 в Ca^{2+} -зависимой манере (рис. 5В).

Отличительной чертой токсического действия АФК является перекисное окисление мембранных липидов (оценено с помощью ратиометрической метки *iT*-сенсора), чего мы не наблюдали в ответ на аппликацию 25ГХ (рис. 5Б). Подтверждением тому, что АФК могут частично способствовать влиянию 25ГХ на мобилизацию СВ стало то, что антиоксидант НАС снижал 25ГХ-опосредованное ускорение потери красителя при частоте 20 Гц (рис. 5Г).

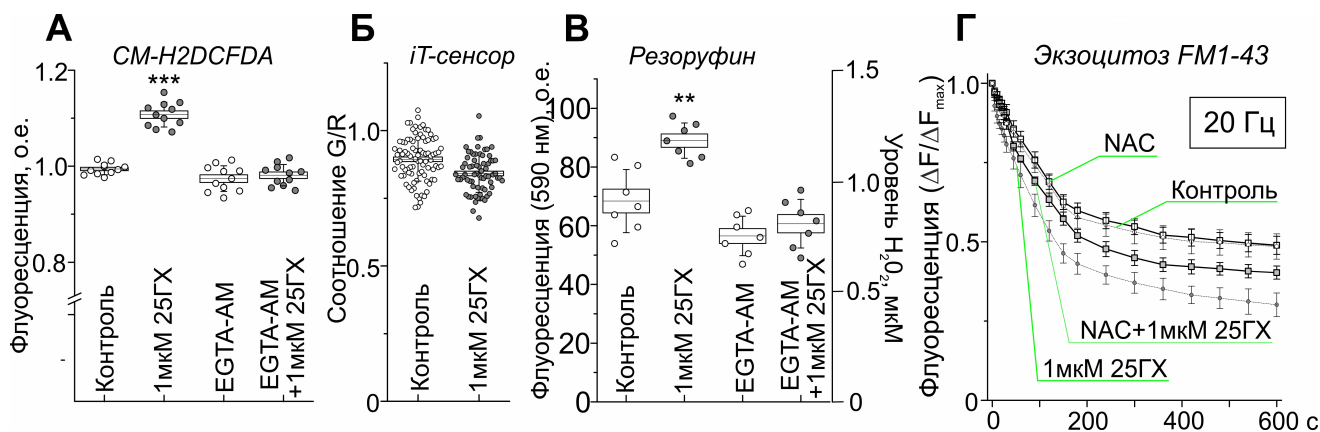


Рис. 5. Влияние 25ГХ (1 мкМ) на продукцию АФК. А, В – нормированная интенсивность свечения CM-H2DCFDA и резорурфина. Б – соотношение зеленой/красной флуоресценции *iT*-сенсора (n=6, 88/70 НМС в группах контроль/25ГХ). Г – нормированный временной ход экзоцитоза FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в мышцах, обработанных НАС. А, В, Г: n=12-14 для каждой кривой. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, по сравнению с контролем.

Ранние синаптические изменения в модели бокового амиотрофического склероза. Известно, что уровни 25ГХ повышаются у пациентов с БАС. Однако роль 25ГХ в генезе нервно-мышечных нарушений, которые проявляются рано и вносят весомый вклад в развитие заболевания, не известно. Для ответа на этот вопрос, были выявлены наиболее ранние признаки дисфункции нервно-мышечных синапсов. Предыдущие исследования указали на отсутствие выраженных изменений в квантовой спонтанной и вызванной секреции нейромедиатора у mSOD мышей (мыши с моделью БАС) на досимптомной стадии (Naumenko et al., 2011). Что происходит с неквантовым освобождением нейромедиатора не было понятно. После попадания в синаптическую щель АХ гидролизует на холин и ацетат. Внеклеточные уровни холина в покое в наружном растворе отражают неквантовое высвобождение АХ в НМС (Petrov et al., 2011). Внеклеточное содержание холина было заметно выше (на $43 \pm 17\%$, $p=0.0009$) у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа. Ранее мы показали, что незначительное истощение мембранного холестерина может увеличить невезикулярное высвобождение АХ из-за повышенной активности транспортера АХ в пресинаптической мембране НМС крысы (Petrov et al., 2011). Использование комплекса МВЦД-холестерин для насыщения мембран экзогенным холестерином снизило содержание

внеклеточного холина у mSOD мышей. В условиях добавления экзогенной ацетилхолинэстеразы (АХЭ) уровень холина был выше (на $43\pm 15\%$, $p=0.0022$) у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа, а добавление холестерина снижало содержание холина. Это указывает на увеличение уровня АХ в нервно-мышечных препаратах у mSOD мышей. Сходная степень увеличения уровня холина, оцененная без и с добавлением экзогенной АХЭ, свидетельствует об отсутствии существенной разницы в активности эндогенной АХЭ у mSOD мышей на ранней стадии заболевания, по сравнению с мышами дикого типа.

Различия в свойствах мембран синаптического и внесинаптического региона.

Для проверки гипотезы о том, что изменения липидных рафтов являются ранними событиями при БАС, использовали красители, чувствительные к липидному окружению: флуоресцентно-меченный ХТ-В (связывается со скоплениями ганглиозидов GM1, расположенными преимущественно в липидных рафтах), BODIPY FL C5-ганглиозид GM1 (встраивается в липидные рафты), NBD-холестерин (увеличивает флуоресценцию при повышении текучести мембраны), F2N12S (радиометрическая метка, указывающая на потерю асимметрии мембраны и нарушение упорядоченности упаковки липидов в мембране). У mSOD мышей окрашивание плазматической мембраны ХТ-В было заметно ниже избирательно в синаптических областях (рис. 6А), тогда как флуоресценция ганглиозид GM1 была ниже в синаптических и внесинаптических областях (рис. 6В). Флуоресценция NBD-холестерина была значительно выше у mSOD мышей, чем у животных дикого типа (рис. 6Б). Следовательно, на ранних стадиях в НМС mSOD мышей происходит увеличение текучести мембран. Соотношение красной/зеленой флуоресценции F2N12S снизилось в синаптических областях у mSOD мышей, указывая на нарушение упаковки мембранных липидов (рис. 6Г). Таким образом, использование четырех различных красителей свидетельствует о выраженном нарушении свойств мембран (в частности, липидных рафтов) в синаптических регионах диафрагмы mSOD мышей до манифестации заболевания.

Нарушенный метаболизм церамида и его накопление могут способствовать разрушению липидных рафтов, синаптической дисфункции, а также метаболической дисрегуляции в скелетных мышцах. Содержание церамида было выше в мышцах диафрагмы у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа (Zakurjanova et al., 2021). В

дополнение, использование BODIPY-церамида показало накопление церамида в плазматической и внутриклеточной мембранах в НМС (рис. 6Д).

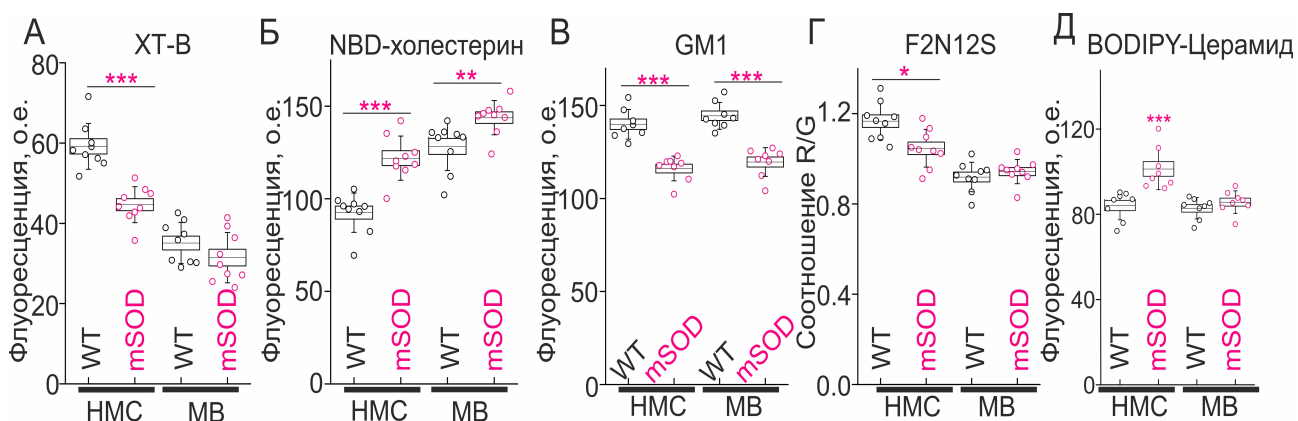


Рис. 6. Флуоресценция меток, чувствительных к липидному окружению, в синаптической (НМС) и внесинаптической областях (МВ). А – ХТ-В (n=9, количество МВ для дикого типа (WT)=258, mSOD=263). Б – NBD-холестерин (n=9, МВ для WT=261, mSOD=267). В – флуоресцентный ганглиозид GM1 (n=8, МВ для WT=209, mSOD=231). Г – F2N12S, соотношение красной и зеленой флуоресценции (n=9, МВ для WT=202, mSOD=214). Д – BODIPY-церамид (n=8, МВ для WT=192, mSOD=208). А-В, Д – флуоресценция представлена в относительных единицах (о.е.), Г – соотношение красной и зеленой флуоресценции. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Влияние 25ГХ на свойства мембран. Было обнаружено, что воздействие 25ГХ (1 мкМ) в течение 1.5 ч может усиливать формирование мембранных микродоменов (увеличение мечения ганглиозидом GM1) и снижать текучесть мембран (снижение флуоресценции NBD-холестерина) у mSOD мышей как в синаптическом, так и во внесинаптическом регионах (рис. 7А, Б).

Также 25ГХ увеличивал соотношение красной и зеленой флуоресценции F2N12S в мембранах у mSOD мышей (рис. 7В). Это указывает на 25ГХ-индуцированное увеличение упорядоченности плазматических мембран у mSOD мышей. Кроме того, 25ГХ снижал поглощение BODIPY-церамида в синаптическом регионе у mSOD мышей (рис. 7Г). Интересно, что 25ГХ не показал значительного эффекта у мышей дикого типа. Вероятно, 25ГХ более эффективно связывается с мембраной mSOD мышей. Чтобы проверить это, мы использовали 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерин, который, как и 25ГХ, транспортируется внутрь клетки оксистерин-связывающими белками (Holttä-Vuori et al., 2008). Поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина было значительно выше в синаптических областях у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа (рис. 7Е). Более того, предварительная обработка 25ГХ заметно ослабляла поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина, что свидетельствует о конкуренции между этими двумя стеринами и, следовательно, об одном и том же механизме, ответственном за их накопление в НМС.

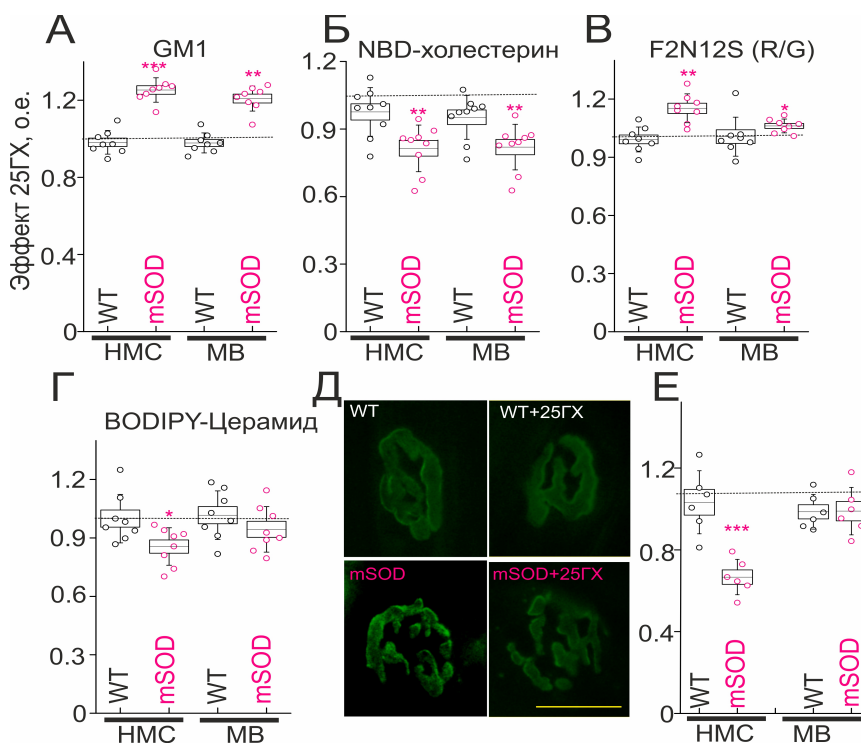


Рис. 7. Нормированный эффект 25GX на флуоресценцию красителей: BODIPY-GM1 (А), NBD-холестерин (Б), F2N12S (В), BODIPY-церамид (Г), 25-(C4 TopFluor®)25-OH-холестерин (Е). А, В, Г – n=8, Б – n=9, Е – n=6 для каждой группы. Количество МВ для А/Б/В/Г/Е: WT=216/249/177/202/167 и mSOD=224/253/185/211/173. Масштабные линейки – 20 мкм. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

В случае введения 25GX в течение месяца в очень низкой дозе (0,4 мг/кг; одна внутрибрюшинная инъекция раз в 4 дня) происходило увеличение соотношения красной и зеленой флуоресценции F2N12S в синаптических областях mSOD мышей (рис. 8А). Аналогичная ситуация была с флуоресцентным церамидом (рис. 8Б), окрашивание которого у mSOD мышей после лечения 25GX было таким же, как у мышей дикого типа (83.9 ± 4.7 , n=9 и 84.1 ± 6.7 , n=8). Таким образом, острое и хроническое введение 25GX может предотвратить ранние мембранные нарушения у mSOD мышей.

Также были проанализированы морфология (Chibalin et al, 2018) (распределение никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nXP)), уровень АХ и перекисное окисление липидов (iТ-сенсор) на фоне хронического введения 25GX. Морфометрический анализ распределения nXP показал увеличение количества островков концевых пластинок в диафрагме mSOD мышей, после месячного введения 25GX это увеличение снижалось (рис. 8Г). Хроническое введение 25GX подавляло повышение внеклеточного уровня холина в мышцах mSOD мышей, что свидетельствует о снижении дисрегуляции некантового высвобождения нейромедиатора (рис. 8В). Использование iТ-сенсора показало усиление перекисного окисления липидов в синаптической области у mSOD мышей до начальной стадии заболевания, что было устранено длительным лечением 25GX (рис. 8Д). Таким образом, хроническое введение 25GX смягчает ранние синаптические аномалии у mSOD мышей.

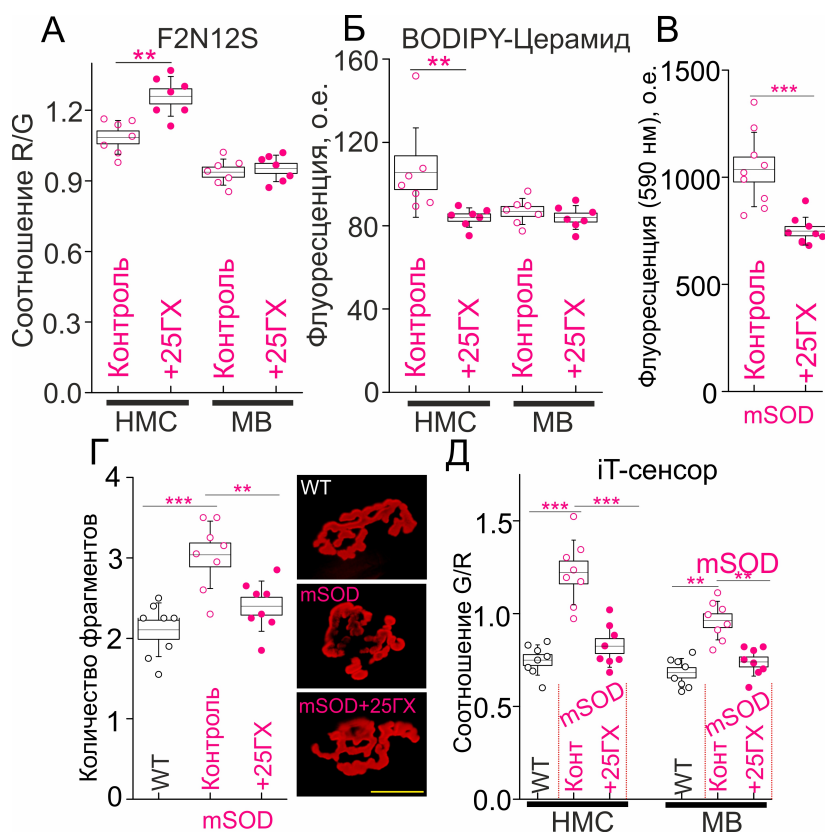


Рис. 8. Влияние хронического введения 25ГХ на мембранные свойства в синаптических (HMC) и внесинаптических областях (MB). А – флуоресценция F2N12S (MB для контроля (mSOD)/+25ГХ:149/152), Б - флуоресценция BODIPY-церамида (контроль (mSOD)/+25ГХ:187/193), Д – флуоресценция iT-сенсора (WT/контроль (mSOD)/mSOD+25ГХ:164/171/174). В – различия в уровнях внеклеточного холина/АХ. Г – анализ фрагментации HMC (слева) и характерные изображения HMC, меченных α -бунгаротоксином. Масштабная линейка – 20 мкм. n=8 на каждую группу. **P<0.01, ***P<0.001.

Влияние олесоксима на спонтанное и вызванное высвобождение нейромедиатора и на кинетику экзоцитоза FM1-43. Олесоксим (0.4 мкМ), как и блокатор транспорта анионов DIDS, не изменял параметры МПКП. Олесоксим статистически значимо снижал амплитуду ПКП при низкочастотной стимуляции (0.5 Гц), однако DIDS предотвращал его угнетающее действие. Во время высокочастотной активности эффективность выброса нейромедиатора зависит от мобилизации СВ к активной зоне. Предварительная обработка олесоксимом в течение 20 мин вызвала сильное снижение амплитуды ПКП при стимуляции с частотой 20 Гц, особенно это было выражено в начальный период. Таким образом, олесоксим селективно подавляет вызванный выброс нейромедиатора в ответ на низкочастотную (0.5 Гц) и высокочастотную (20 Гц) активности, при этом не влияя на спонтанное высвобождение. Эти эффекты олесоксима блокировались антагонистом анионного транспорта DIDS.

Олесоксим снижал скорость экзоцитоза красителя FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц, что полностью предотвращалось DIDS. DIDS эффективно подавляет активность канала VDAC, локализованного как в митохондриях, так и на плазматической мембране (Shafir et al., 1998; Godbole et al., 2003; Marin et al., 2007; Ramirez et al., 2009). Чтобы проверить роль VDAC плазматической мембраны в эффекте олесоксима на экзоцитоз СВ, был использован мембранонепроницающий селективный блокатор VDAC S-18. S-18

полностью предотвратил эффект олесоксима. Олесоксим оказывал свой негативный эффект на выброс нейромедиатора и экзоцитоз особенно выражено в первую минуту. Это предполагает, что во время высокочастотной активности олесоксим может снизить доставку СВ к сайтам экзоцитоза из рециклирующего пула.

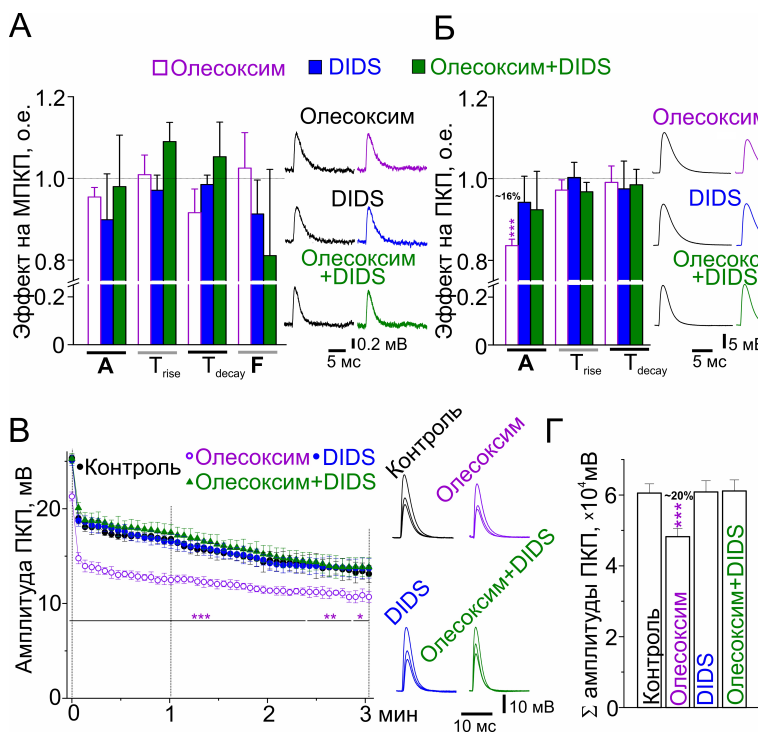


Рис. 9. Нормированный эффект олесоксима и DIDS на спонтанный и вызванный выброс нейромедиатора. А, Б: А – амплитуда, T_{rise} – время нарастания, T_{decay} – время спада и F – частота МПКП. А, Б – справа представлены МПКП (А) и ПКП (Б) до и после 20 мин экспозиции вещества (в цвете). В – депрессия амплитуды ПКП (мВ) при стимуляции с частотой 20 Гц. Справа показаны ПКП на 0, 1, 3 мин во время стимуляции (20 Гц). Г – кумулятивные амплитуды ПКП (мВ, получены путем суммиации ПКП из графика В) при стимуляции с частотой 20 Гц. n=8-11 на группу. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Действительно, электрофизиологические эксперименты показали усиление депрессии секреции нейромедиатора при длительной стимуляции с частотой 20 Гц после воздействия везамикола (блокатор везикулярного транспортера АХ), который снижает вклад в нейросекрецию рециклирующих везикул во время активности. В условиях применения везамикола олесоксим не оказывал дополнительного эффекта на депрессию амплитуды ПКП (Zakurjanova et al., 2020). Учитывая, что действию олесоксима препятствует непроникающий внутрь клеток блокатор белка VDAC S-18, можно полагать, что основной мишенью олесоксима может быть VDAC, локализованный на плазматической мембране. Иммунофлуоресцентное мечение показало присутствие VDAC в НМС.

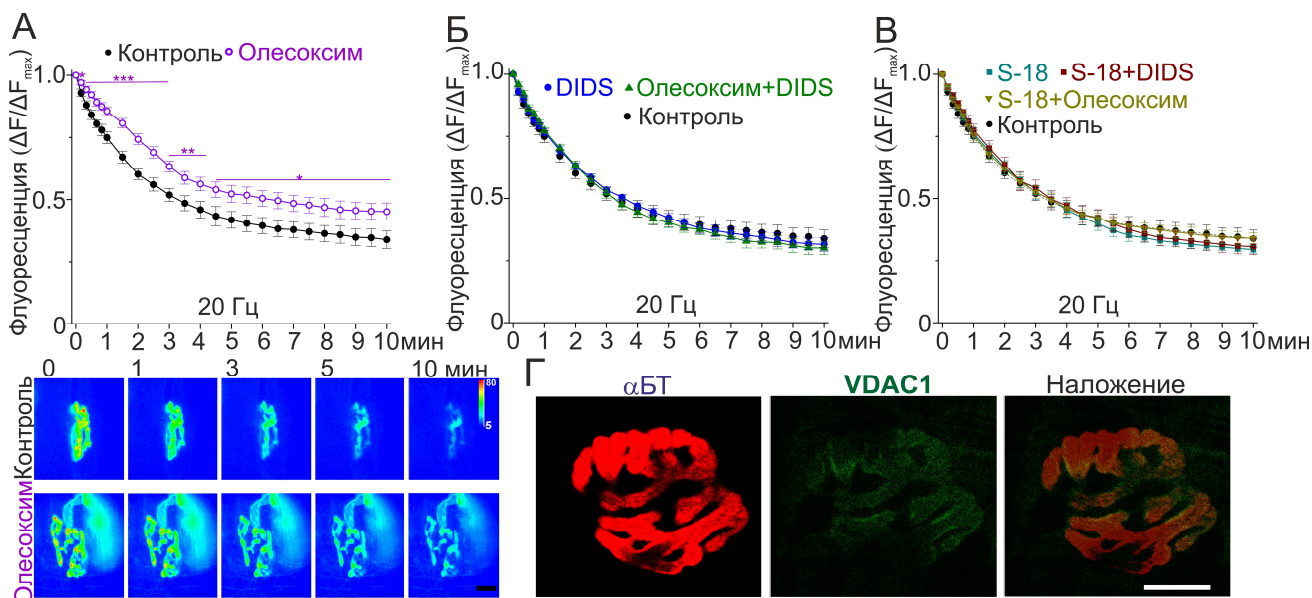


Рис. 10. Нормированные эффекты олесоксима, DIDS и S-18 на экзоцитоз FM1-43. А – эффект олесоксима. Ниже изображения НМС в псевдоцвете во время стимуляции. Б, В – собственное и в сочетании с олесоксимом влияние DIDS и S-18 на экзоцитоз FM1-43. n=12 для каждой группы. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Г – иммунолокализация белка VDAC в НМС. Масштабная линейка – 10 мкм.

Участие митохондрий в эффекте олесоксима на экзоцитоз СВ. Клеточные эффекты олесоксима могут быть связаны с функцией митохондрий. Усиление продукции митохондриальной АФК при применении ротенона (блокатор электротранспортной цепи I митохондрий) было частично подавлено мембранопроницающим DIDS, но не олесоксимом или клеточно-непроницаемым S-18. Ротенон также подавлял экзоцитоз FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц. DIDS, но не олесоксим и S-18, частично подавлял эффект ротенона на экзоцитоз FM1-43. Эти результаты свидетельствуют о независимом от митохондрий действии олесоксима на экзоцитоз в НМС.

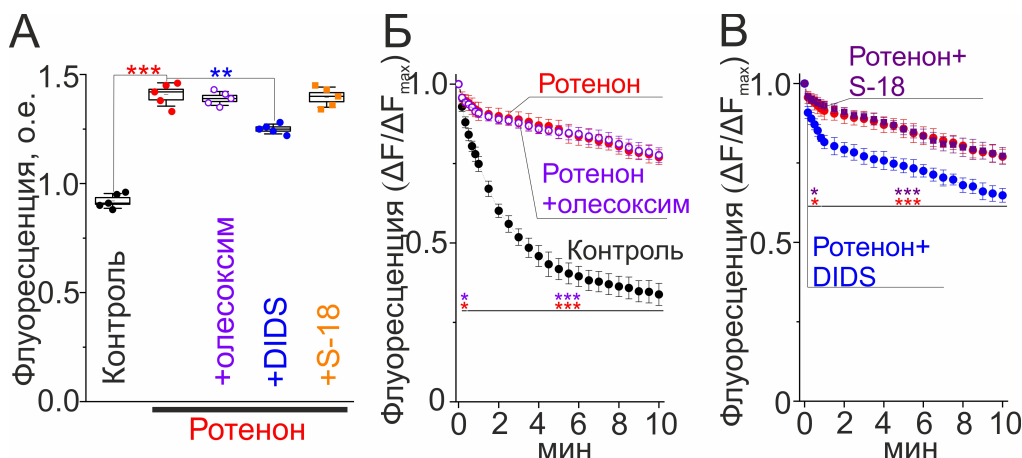


Рис. 11. Роль митохондрий в эффектах модуляторов VDAC (все значения нормированы относительно начальной точки). А – изменение

флуоресценции MitoSox в ответ на применение ротенона (n=5, **P<0.01, ***P<0.001). Б, В – действие самого ротенона и в комбинации с олесоксимом и блокаторами VDAC на экзоцитоз FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц (n=12, *P<0.05, ***P<0.001).

Анион-зависимый (Cl⁻) эффект олесоксима. Увеличение концентрации Cl⁻ в растворе угнетало экзоцитоз FM1-43 (рис. 12А), усиливало снижение амплитуды ПКП при

стимуляции с частотой 20 Гц (Zakurjanova et al., 2020). В данных условиях угнетающее действие олесоксима было заметно усилено. S-18, блокатор плазмалеммальных VDAC, уменьшал отрицательный эффект олесоксима (рис. 12Б). Для оценки изменения внутриклеточного Cl^- нервные окончания были загружены индикатором Cl^- MEQ, флуоресценция которого подавляется при связывании анионов Cl^- (Bowersi, Verkman, 1991; Chub et al., 2006). В покое флуоресценция MEQ увеличивалась при уменьшении концентрации Cl^- и снижалась в ответ на олесоксим. В условиях стимуляции (20 Гц) сигнал MEQ немного снижался, олесоксим вызывал более значительное падение флуоресценции. Блокаторы VDAC предотвращали это действие олесоксима. Следовательно, олесоксим может увеличивать проницаемость пресинаптической мембраны для Cl^- как в условиях покоя, так и во время синаптической активности, и это действие олесоксима зависит от белка, ингибируемого DIDS и S-18 (предположительно VDAC).

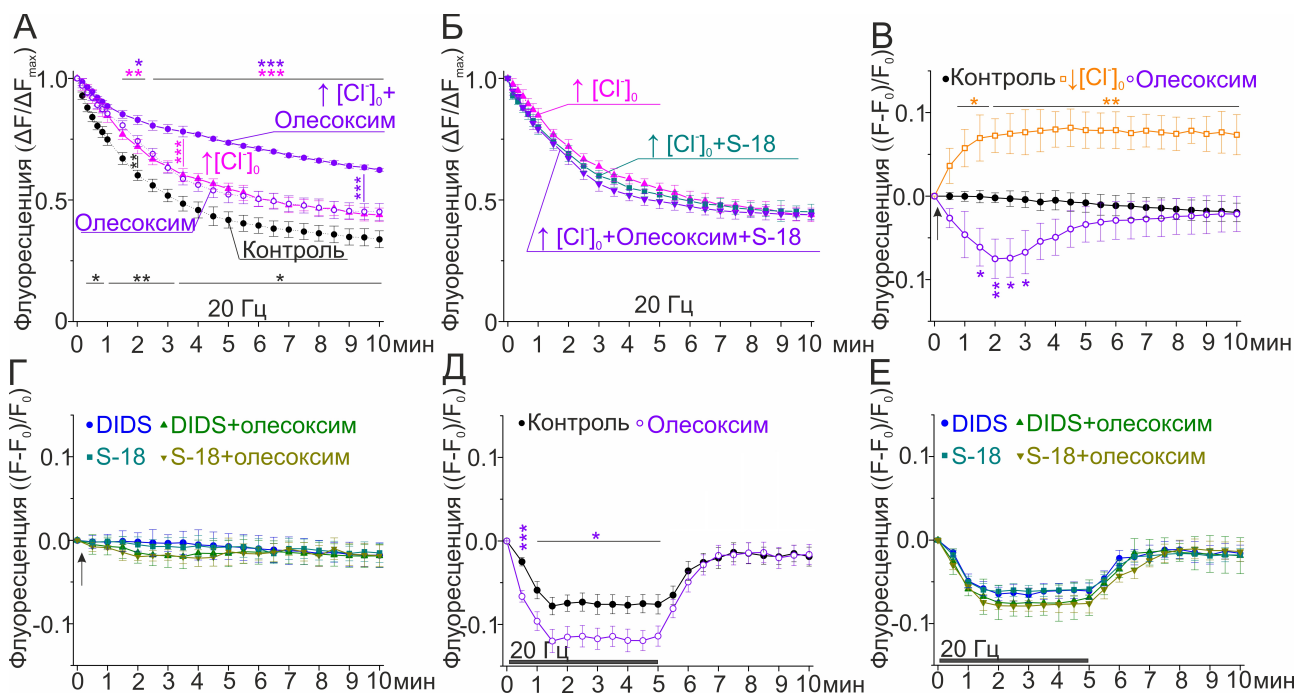


Рис. 12. Роль Cl^- в эффектах олесоксима и блокаторов VDAC. А, Б – эффекты олесоксима и блокаторов белка VDAC на экзоцитоз FM1-43 в условиях высокого внеклеточного Cl^- . В-Е – изменения флуоресценции Cl^- -чувствительного красителя (MEQ) в покое (В, Г) и во время стимуляции с частотой 20 Гц (Д, Е) при аппликации олесоксима и блокаторов VDAC. В, Д – справа изображения, иллюстрирующие изменения интенсивности флуоресценции MEQ. В-Е: ось Y – относительная интенсивность флуоресценции, рассчитанная по формуле $(F-F_0)/F_0$. n=12 для каждой группы. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании описаны механизмы действий двух производных холестерина, 25ГХ и олесоксима, на нервно-мышечную передачу. 25ГХ образуется преимущественно иммунокомпетентными клетками, концентрация которого увеличивается

при воспалении и БАС. Олесоксим – искусственно синтезированная молекула, обладающая нейропротекторными свойствами при БАС. Учитывая то, что при БАС поражаются НМС, мы тестировали гипотезу, что 25ГХ и олесоксим могут модулировать нервно-мышечную передачу.

Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что иммунный оксистерин 25ГХ является мощным модулятором нервно-мышечной передачи и регулирует вовлечение СВ в экзоцитоз. Наномолярные концентрации 25ГХ подавляют нейротрансдукцию, тогда как микромолярные концентрации обладают стимулирующим действием, которое опосредуется активацией LX-рецепторов, связанных с липидными рафтами. Оказалось, что эти пресинаптические рецепторы могут запускать сигнальный путь ЭР α /G $_i$ -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/ФЛС/Ca $^{2+}$ /ПКС. Кроме того, 25ГХ может действовать как прооксидант, увеличивая АФК в Ca $^{2+}$ -зависимой манере; далее генерируемые АФК могут дополнительно способствовать экзоцитозу СВ (рис. 13). Этот LX-рецептор-зависимый путь может быть новым регуляторным механизмом, с помощью которого иммунные клетки, продуцирующие 25ГХ, влияют на нейротрансдукцию и моторную функцию.

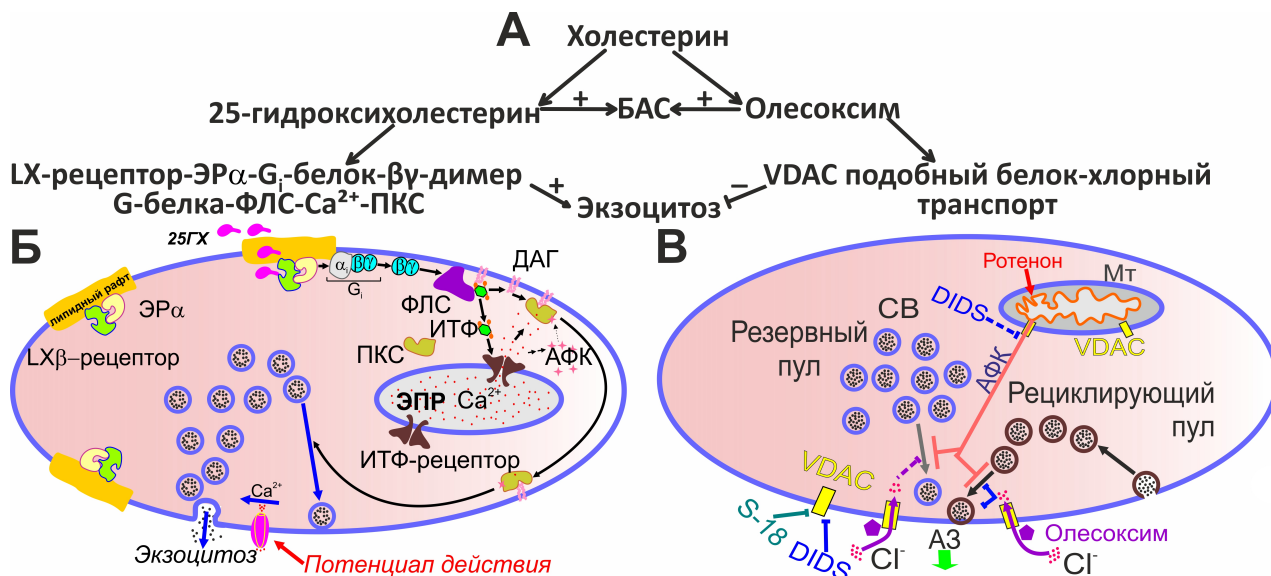


Рис. 13. Механизм действия 25ГХ и олесоксима на вовлечение синаптических везикул в экзоцитоз в НМС. Б – 25ГХ активирует связанные с липидными рафтами LX-рецепторы, которые через ЭР α могут активировать сигнальный путь G $_i$ -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/ФЛС, что приводит к зависимому от ИТФ-рецептора высвобождению Ca $^{2+}$ из ЭПР и затем к активации ПКС, что может увеличить мобилизацию СВ во время активности. Ca $^{2+}$ -индуцированная продукция АФК может усилить этот эффект, вероятно, через дополнительную стимуляцию ПКС. В – стимуляция анион-транспортного белка (предположительно, VDAC) плазматической мембраны олесоксимом увеличивает проницаемость мембраны для хлора (Cl $^-$). Повышенный приток Cl $^-$ в нервную терминаль может подавлять вызванный экзоцитоз СВ и их мобилизацию в сайты экзоцитоза (А3). Как мембранопроникающий (DIDS), так и мембранонепроницающий (S-18) блокаторы белка VDAC могут полностью устранить влияние олесоксима как на экзоцитоз СВ, так и на уровни

внутриклеточного Ca^{2+} . Ротенон вызывает митохондриальную дисфункцию, которая связана с усилением продукции АФК и открытием митохондриальной поры. Это может нарушить вовлечение СВ в вызванный экзоцитоз. Блокирование VDAC с помощью мембранопроницающего соединения DIDS может частично предотвращать действие ротенона на уровень митохондриального АФК и мобилизацию СВ. Олесоксим и S-18 не противодействуют эффекту ротенона. Эти результаты предполагают, что олесоксим влияет на вызванный экзоцитоз СВ, воздействуя на VDAC пресинаптической мембраны.

Моторная функция нарушается при БАС. Так же известно, что уровни 25ГХ повышаются при развитии этого нейродегенеративного заболевания, но значение этого оксистерина при данной патологии непонятно. Исследование показало, что 25ГХ может предотвратить изменения свойств мембран (нарушение липидных рафтов, увеличение захвата церамида, перекисное окисление липидов), увеличение уровня холина и нарушение кластеризации nHP в НМС у мышей с моделью БАС. Это указывает на возможное протективное значение 25ГХ при данном нейродегенеративном заболевании. Более того, НМС модельных мышей с БАС характеризовались высокой способностью связывать 25ГХ. Следовательно, 25ГХ не только модулятор нервно-мышечной передачи, но и соединение, способствующее поддержанию структурных свойств нервно-мышечного синапса.

С другой стороны, было обнаружено, что нейропротективная молекула олесоксим может негативно регулировать нейротрансдукцию, подавляя вызванный экзоцитоз СВ и их рекрутирование в сайты экзоцитоза. Механизм, лежащий в основе действия олесоксима, связан с активацией анионного транспортного белка (предположительно VDAC) на пресинаптической мембране и увеличением проницаемости мембраны для анионов (Ca^{2+}). Установление опосредованного олесоксимом механизма подавления нейротрансдукции позволило обнаружить новый механизм пресинаптического ингибирования, основанный на изменении анионной проницаемости мембраны.

Таким образом, два производных холестерина, действуя через разные механизмы, в субмикромольных концентрациях могут разнонаправленно регулировать нервно-мышечную передачу. Это открывает новые возможности для направленной коррекции дисфункций нервно-мышечной передачи за счет применения 25ГХ и олесоксима.

ВЫВОДЫ

1. 25ГХ оказывает разнонаправленный эффект на нейротрансдукцию при умеренно-частотной активности: в низких концентрациях потенцирует, а в высоких угнетает секрецию нейромедиатора и экзоцитоз синаптических везикул. Основным процессом, на который

действует 25ГХ, является мобилизация синаптических везикул. При этом 25ГХ не имеет постсинаптических эффектов.

2. Потенцирующий эффект 25ГХ на мобилизацию синаптических везикул и их последующий экзоцитоз зависит от активации мембранных LX-рецепторов с дальнейшим запуском сигнального пути рецептор эстрогена α/G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/фосфолипаза C/ Ca^{2+} /протеинкиназа C. В дополнение, Ca^{2+} -зависимое увеличение продукции активных форм кислорода под влиянием 25ГХ вносит вклад в усиление мобилизации синаптических везикул.

3. 25ГХ подавляет ранние альтерации свойств синаптических мембран (нарушение липидных рафтов, перекисное окисление липидов, усиленный захват церамида), а также ранние признаки дисфункции нервно-мышечного синапса (повышение уровня внеклеточного холина и фрагментацию кластеров никотиновых ацетилхолиновых рецепторов) в модели бокового амиотрофического склероза.

4. Олесоксим, не влияя на постсинаптические процессы, угнетает секрецию нейромедиатора, мобилизацию и рециклирование синаптических везикул путем активации анион-транспортирующего белка плазматической мембраны и усиления потока ионов хлора в двигательные нервные окончания при синаптической активности.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Bryndina, I.G. Early Lipid Raft-Related Changes: Interplay between Unilateral Denervation and Hindlimb Suspension / I.G. Bryndina, M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, **G.F. Zakirjanova**, A.M. Petrov // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22, №5. (Scopus Q1, WoS Q1).
2. **Zakyrjanova, G.F.** Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol / G.F. Zakyrjanova, A.R. Giniatullin, K.A. Mukhutdinova, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // *Life Sci.* – 2021. – Vol.273. – P.119300. (Scopus Q1, WoS Q1).
3. **Zakyrjanova, G.F.** Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism / G.F. Zakyrjanova, A.N. Tsentsevitsky, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // *Free Radic Biol Med.* – 2021. – Vol.174. – P.121-134. (Scopus Q1, WoS Q1).
4. Tsentsevitsky, A.N. Cadmium desynchronizes neurotransmitter release in the neuromuscular junction: Key role of ROS / A.N. Tsentsevitsky, **G.F. Zakyrjanova**, A.M. Petrov // *Free Radic Biol Med.* – 2020. – Vol.155. – P.19-28. (Scopus Q1, WoS Q1).
5. **Zakyrjanova, G.F.** Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant restrains synaptic vesicle exocytosis in the mice motor nerve terminals: Possible role of VDACs / G.F. Zakyrjanova, A.I. Gilmutdinov, A.N. Tsentsevitsky, A.M. Petrov // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2020. – Vol.1865, №9. – P.158739. (Scopus Q1, WoS Q1).
6. Mukhutdinova, K.A. Oxysterol modulates neurotransmission via liver-X receptor/NO synthase-dependent pathway at the mouse neuromuscular junctions / K.A. Mukhutdinova, M.R. Kasimov, **G.F. Zakyrjanova**, M.R. Gumerova, A.M. Petrov // *Neuropharmacology.* – 2019. – Vol.150. – P.70-79. (Scopus Q1, WoS Q1).
7. Petrov, A.M. Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse / A.M. Petrov, M.N. Shalagina, V.A. Protopopov, V.G. Sergeev, S.V. Ovechkin, N.G.

- Ovchinina, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, **G.F. Zakirjanova**, I.G. Bryndina // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol.20, №19. (Scopus Q1, WoS Q1).
8. Chibalin, A.V. Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension / A.V. Chibalin, B. Benziane, **G.F. Zakyrjanova**, V.V. Kravtsova, Krivoi, II // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol.233, №10. – P.6329-6336. (Scopus Q1, WoS Q1).
 9. Mukhutdinova, K.A. 24S-hydroxycholesterol suppresses neuromuscular transmission in SOD1(G93A) mice: A possible role of NO and lipid rafts / K.A. Mukhutdinova, M.R. Kasimov, A.R. Giniatullin, **G.F. Zakyrjanova**, A.M. Petrov // *Mol Cell Neurosci.* – 2018. – Vol.88. – P.308-318. (Scopus Q2, WoS Q2).
 10. Kasimov, M.R. Similar oxysterols may lead to opposite effects on synaptic transmission: Olesoxime versus 5alpha-cholestan-3-one at the frog neuromuscular junction / M.R. Kasimov, **G.F. Zakyrjanova**, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol.1861, №7. – P.606-616. (Scopus Q1, WoS Q1).
 11. 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 // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – Vol.456, №1. – P.145-150. (Scopus Q1, WoS Q2).

Тезисы докладов

1. **Zakiriianova G.** 25-hydroxycholesterol as a modulator of synaptic transmission in the mice neuromuscular junctions / Zakiriianova G., Petrov A. // *Neuronus IBRO Neuroscience Forum.* – Krakow, Poland, 2020.
2. **Закирьянова Г.Ф.** Липидное окружение в нервно-мышечном синапсе после терапии 25-гидроксистеролином SOD1-G93a мышей / Закирьянова Г.Ф., Мухутдинова К.А., Петров А.М. // *Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых, Нижний Новгород, Россия, 2019.* – С. 91.
3. **Закирьянова Г.Ф.** Механизм действия 25-гидроксистеролина в модуляции нервно-мышечной передачи / Закирьянова Г.Ф., Петров А.М. // *Материалы VII Молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, опубликованные в журнале «Гены и клетки»; Том XV, №3. ISSN 2313-1829.* – Санкт-Петербург, Россия, 2020. – С. 161.
4. **Zakiryjanova G.** Effect of 25-hydroxycholesterol on synaptic transmission in skeletal muscle / Zakiryjanova G., Petrov A. // *The 10 th IBRO World Congress of Neuroscience.* – Daegu, South Korea, 2019.
5. **Закирьянова Г.Ф.** Модулирующая роль 25-гидроксистеролина в экзоцитозе синаптических везикул и механизмы действия // *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019».* – Москва, Россия, 2019.
6. **Zakyrjanova G.F.** Effect of 24S-hydroxycholesterol on synaptic vesicle cycling in the neuromuscular junction of SODG93A mice / Zakyrjanova G.F., Mukhutdinova K.A., Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Petrov A.M. // *FENS Forum – Berlin, Germany, 2018.*
7. **Закирьянова Г.Ф.** Хлорный транспорт в пресинаптических нервных окончаниях аксонов мотонейронов: связь с эффектом олесоксима на экзоцитоз / Закирьянова Г.Ф., Гильмутдинов А.И., Ценцевицкий А.Н., Зефиоров А.Л., Петров А.М. // *Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием "Оптогенетика и оптофармакология": Сборник научных трудов. Под общ. редакцией М.Л. Фирсова. Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ".* – Санкт-Петербург, Россия, 2018. – С. 71-72.
8. **Закирьянова Г.Ф.** Оценка роли хлорного транспорта в реализации эффекта олесоксима на экзоцитоз синаптических везикул / Закирьянова Г.Ф., Гильмутдинов А.И., Ценцевицкий А.Н., Петров А.М. // *Фундаментальная и клиническая электрофизиология сердца. Актуальные вопросы аритмологии: Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной А.Ф. Самойлову. Казань: Медицинский издательский дом "Практика".* – Казань, Россия, 2018. – С. 18-19.
9. Гильмутдинов А.И. Влияние на экзо-эндоцитоз синаптических везикул в нервных окончаниях мотонейронов ингибитора анионного транспорта и нейропротектора олесоксима / Гильмутдинов А.И., **Закирьянова Г.Ф.**, Петров А.М. // *Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых.* – Нижний Новгород, Россия, 2017. – С. 42.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю *Алексею Михайловичу Петрову* за ценные советы, новые знания, помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертации. Также автор искренне благодарен за помощь в выполнении экспериментальной работы *А.Н. Ценцевицкому, А.Р. Гиниатуллину, А.Р. Гильмутдинову, Е.А. Кузнецовой*.

Автор сердечно благодарен *И.В. Ковязиной* за внимательное прочтение и рецензирование данной работы, высказанные замечания и предложения. Автор глубоко признателен за поддержку и высказанные предложения по диссертационной работе *Э.А. Бухараевой, А.Р. Гиниатуллину, Р.Р. Нигматуллиной, А.И. Маломужу*.

Автор глубоко признателен всем сотрудникам лаборатории биофизики синаптических процессов КИББ ФИЦ КазНЦ РАН и кафедры нормальной физиологии КГМУ за поддержку, доброжелательность и интерес к работе.