

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ – ОБОСОБЛЕННОЕ
СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Закирьянова Гузалия Фаритовна

Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую
передачу в нервно-мышечном соединении мышцы

1.5.2 – биофизика

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор биологических наук А.М. Петров

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Процесс синаптической передачи в нервно-мышечном соединении.....	14
1.1.1 Механизмы, обуславливающие процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул.....	15
1.1.2 Процессы, лежащие в основе постсинаптического электрогенеза.....	16
1.2 Классификация и функциональное значение пулов синаптических везикул	19
1.3 Нарушение синаптической передачи при БАС	21
1.4 Роль холестерина в регуляции синаптической передачи	24
1.5 Оксистерины как особый класс производных холестерина	25
1.6 25-гидроксихолестерин: физиологическое значение и эффекты.....	27
1.7 Олесоксим как синтетический нейропротектор	30
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Объект исследования и содержание животных.....	34
2.2 Растворы и реактивы	35
2.2.1 25ГХ и фармакологические вещества.....	35
2.2.2 Использование 25ГХ у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза.....	37
2.2.3 Олесоксим и фармакологические вещества.....	37
2.3 Электрофизиологический метод регистрации потенциалов концевой пластинки.....	38
2.4 Оптический метод.....	38
2.4.1 Флуоресцентные подходы для оценки экзоцитоза.....	38
2.4.2 Чувствительные к липидному микроокружению красители	43
2.4.3 Анализ уровня холина/ацетилхолина во внеклеточном растворе	45
2.5 Статистическая обработка результатов	46
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ	48
3.1 25ГХ и синаптическая передача.....	48
3.1.1 Влияние 25ГХ на электрофизиологические параметры	48
3.1.2 Влияние 25ГХ на кинетику экзоцитоза FM1-43.....	51

3.1.3 Зависимость эффектов 25ГХ от глутаматных NMDA- и LX-рецепторов	53
3.1.4 Роль липидных рафтов в эффектах 25ГХ и локализация LX-рецепторов в НМС.....	56
3.1.5 Значение липидных рафтов в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ	59
3.1.6 Влияние 25ГХ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и роль Ca^{2+} в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ.....	60
3.1.7 Роль внутриклеточного Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы С в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ.....	63
3.1.8 Сигнальные молекулы, участвующие в эффекте 25ГХ на выгрузку FM1-43.....	64
3.1.9 Активные формы кислорода модулируют эффект 25ГХ на выгрузку FM1-43.....	66
3.2 Боковой амиотрофический склероз и 25ГХ	68
3.2.1 Уровень внеклеточного холина во внеклеточном растворе	68
3.2.2. Различия в свойствах мембран синаптического и внесинаптического региона	70
3.2.3 Различия в поглощении флуоресцентного церамида у мышей с моделью БАС	73
3.2.4 Влияние острой аппликации оксистерина на свойства мембран.....	74
3.2.5 Эффекты хронического введения 25ГХ у mSOD мышей	77
3.3 Олесоксим.....	81
3.3.1 Влияние модуляторов VDAC на спонтанное и вызванное высвобождение нейромедиатора.....	81
3.3.2 Влияние модуляторов VDAC на кинетику экзоцитоза красителя FM1-43	85
3.3.3 Участие митохондрий в эффекте олесоксима на экзоцитоз СВ	89
3.3.4 Анион (Cl ⁻) -зависимый эффект олесоксима	94
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ	98
4.1 Механизм действия 25ГХ на нервно-мышечную передачу	98
4.1.1 Потенциальная роль 25ГХ в скелетной мышце.....	98
4.1.2 Ключевые этапы синаптической передачи, чувствительные к 25ГХ.....	99
4.1.3 Рецепторы и сигнальные молекулы, вовлеченные в эффект 25ГХ	100
4.1.4 Роль Ca^{2+} в эффекте 25ГХ на синаптическую передачу	101

4.1.5 Роль АФК и альтернативные пути сигнализации в эффекте 25ГХ	103
4.2 Вовлечение 25ГХ в боковой амиотрофический склероз	104
4.2.1 Ранние липидные альтерации в патологии БАС	104
4.2.2 Предполагаемый механизм изменения мембранных свойств при БАС. Связь с нарушениями нервно-мышечной передачи.....	105
4.2.3 Эффект 25ГХ на мембранные свойства при БАС	107
4.3 Механизм действия синтетического производного холестерина олесоксима	110
4.3.1 Предполагаемая роль VDAC в эффекте олесоксима	110
4.3.2 Роль мембранной проницаемости для анионов в эффектах олесоксима	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХ – ацетилхолин

АХЭ – ацетилхолинэстераза

α -БТ – α -бунгаротоксин

АФК – активные формы кислорода

БАС – боковой амиотрофический склероз

24ГХ – 24-гидроксистерин

25ГХ – 25-гидроксистерин

ДАГ - диацилглицерин

ИТФ - инозитолтрифосфат

ИФН – интерферон

М β ЦД – метил- β -циклодекстрин

НМС – нервно-мышечное соединение

nXP – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

о.е. – относительные единицы

ПОЛ – перекисное окисление липидов

Ри – риадиновый рецептор

СВ – синаптическая везикула

ФИ-ФЛС – фосфатидилинозитол-специфическая ФЛС

ФХ-ФЛС – фосфодитилхолин-специфичная ФЛС

ХТ-В – субъединица В холерного токсина

ЭР α – рецептор эстрогена α

CH25H – холестерин-25-монооксигеназа

EGTA – этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота

HRP – пероксидаза хрена

LX-рецептор – X-рецептор печени

mSOD – мыши с моделью БАС

mPTP – комплекс митохондриальной транзитной поры

MuSK – мышечно-специфическая тирозинкиназа

NO – оксид азота

PTX – коклюшный токсин

RRP – немедленно готовый к высвобождению пул

SOD1 – супероксиддисмутаза-1

VDAC – потенциал-зависимый анионный канал

ВВЕДЕНИЕ

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.

Положения, выносимые на защиту

1. 25ГХ двунаправленно модулирует нервно-мышечную передачу, действуя пресинаптически через изменения в мобилизации СВ. Способность 25ГХ усиливать мобилизацию СВ зависит от ассоциированных с липидными рафтами LX-рецепторов, активация которых запускает сигнальный путь $\text{ЭР}\alpha/\text{G}_i\text{-белок}/\beta\gamma\text{-димер G-белка}/\text{ФЛС}/\text{Ca}^{2+}/\text{ПКС}$ путь.

2. 25ГХ способен препятствовать альтерациям свойств синаптических мембран у мышей с моделью БАС. В частности, 25ГХ предотвращает разрушение липидных рафтов при остром применении, а при хроническом введении дополнительно препятствует появлению признаков дисфункции нервно-мышечного соединения (повышение уровня внеклеточного холина, перекисное окисление липидов, фрагментация кластеров никотиновых ацетилхолиновых рецепторов).

3. Нейропротекторная молекула олесоксим ограничивает высвобождение нейромедиатора через активацию анион-транспортного белка пресинаптической мембраны, транспорт хлора через который подавляет экзоцитоз и мобилизацию синаптических везикул.

Научная новизна работы

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 оксистерин 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 мыши), 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 мыши.

Научно-практическая значимость работы

В работе впервые получены данные, расширяющие представление о влиянии производных холестерина, 25ГХ и олесоксима, на синаптическую передачу, в частности на нервно-мышечную. 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 и методы исследования

В экспериментах применялось несколько методов, позволяющих оценить взаимосвязанные аспекты синаптической передачи. Эксперименты проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши. Использовали электрофизиологический метод для регистрации миниатюрных (МПКП) и вызванных (ПКП) потенциалов концевой пластинки с помощью стеклянных микроэлектродов. Для слежения за динамикой везикулярных процессов экзо-эндоцитоза использовали краситель FM1-43. Для раскрытия механизма действия оксистеринов применяли различные флуоресцентные красители: MitoSox и CM-H2DCFDA (детекция активных форм кислорода), MEQ (изменение уровня хлора), Oregon Green® 488 BAPTA-1 (изменение уровня цитозольного кальция), Amplex® Red Hydrogen Peroxide Kit (изменение уровня перекиси водорода), Amplex® Red Acetylcholine Assay Kit (изменение уровня холина). Также применялись чувствительные к липидному микроокружению красители: субъединица В холерного токсина (ХТ-В), BODIPY FL C5-ганглиозид

GM1, 22NBD-холестерин, F2N12S, BODIPY™ FL C5-церамид, Image-iT BODIPY 581/591 C11.

Степень достоверности и апробация результатов

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.

Результаты диссертации представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: I всероссийская конференция и школа с международным участием "Оптогенетика и оптофармакология" (Санкт-Петербург, 2018); всероссийская научно-практическая конференции с международным участием "Фундаментальная и клиническая электрофизиология сердца" (Казань, 2018); FENS Forum (Berlin, Germany, 2018); всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых "Биосистемы: организация, поведение, управление" (Нижний Новгород, 2019, 2021); международный молодежный научный форум "ЛОМОНОСОВ-2019" (Москва, 2019); X всемирный конгресс нейробиологов IBRO (Южная Корея, 2019; Польша, 2020); VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Москва, 2020).

Публикации

По материалам диссертации было опубликовано 20 работ, среди которых 11 статей в журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Личный вклад диссертанта в исследования

Планирование исследования, разработка схем эксперимента, выполнение экспериментов, обработка и анализ полученных данных и оформление публикаций проходили при личном участии диссертанта.

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 источника. В работе представлены 1 таблица и 30 рисунков.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Процесс синаптической передачи в нервно-мышечном соединении

Химические синапсы высвобождают нейромедиатор из СВ кальций-зависимым путем (рис. 1). СВ сливаются с плазматической мембраной и высвобождают молекулы нейромедиатора (экзоцитоз). Молекулы нейромедиатора диффундируют в синаптическую щель, что приводит к активации или ингибированию постсинаптического компартмента (Stojilkovic, 2005). Далее СВ вновь образуются из пресинаптической мембраны (в процессе эндоцитоза), после чего приобретают готовность повторно участвовать в экзоцитозе. Данный процесс носит название «рециклирование СВ» (Rizzoli, 2014).

Периферический нервно-мышечный синапс является удобным объектом для исследования нейротрансмиссии, в частности пресинаптических процессов, поскольку в отличие от большинства центральных синапсов он содержит намного больше СВ. Особенностью нервно-мышечного синапса является устройство синаптической щели, содержащей базальную мембрану, и постсинаптический аппарат, представленный складчатой мембраной (Slater, 2017).

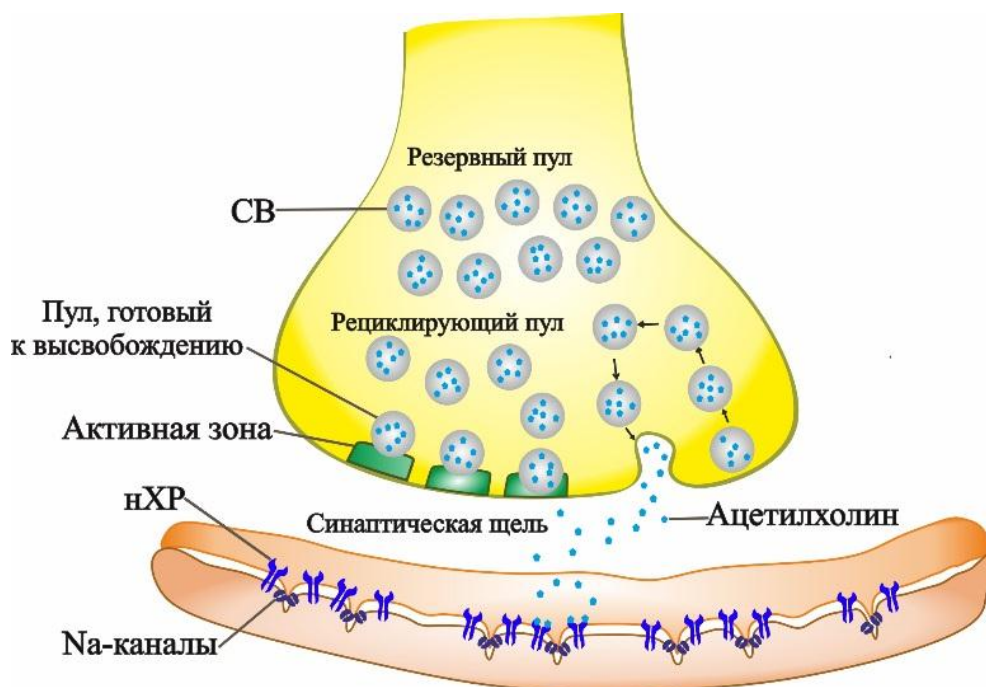


Рис. 1. Схематическое изображение нервно-мышечного синапса. В пресинаптической области СВ формируют скопления пулов (резервный,

рециклирующий пул, пул, готовый к высвобождению). СВ содержат нейромедиатор, который высвобождается в синаптическую щель после слияния СВ с пресинаптической мембраной в активной зоне. Нейромедиатор связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами, находящимися на гребнях складок постсинаптической мембраны, вызывая деполяризацию мембраны, с последующей активацией потенциал-зависимых Na-каналов (располагаются в углублениях складок).

1.1.1 Механизмы, обуславливающие процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул

Экзоцитоз СВ включает себя несколько этапов и происходит с участием белкового SNARE-комплекса и регулируется синаптотагмином, Ca^{2+} -связывающим белком, встроенным в мембрану СВ (Sollner, 2003). На этапе докиривания белки VAMP, закрепленные в мембране СВ, образуют связи с белками плазматической мембраны синтаксином и SNAP25 (Rothman, Warren, 1994). В результате образования такого комплекса происходит скручивание SNARE-белков (VAMP, синтаксин, SNAP25), приводящее к максимальному сближению СВ и пресинаптической мембран вплоть до их слияния (Zefirov et al., 2009). Вход ионов кальция активирует синаптотагмин, что приводит к доскручиванию SNARE-комплекса и экзоцитозу. После слияния синаптических везикул образованный белковый комплекс очень стабилен, и для нового раунда слияния необходима его разборка с участием шаперона NSF и энергии гидролиза АТФ (Rizo, 2018).

После экзоцитоза и высвобождения нейромедиатора происходит образование СВ из пресинаптической мембраны эндоцитозом. Один из основных путей эндоцитоза зависит от сборки белкового покрытия из клатрина и адаптерных белков. Клатрин узнает адаптерные белки эндоцитоза (AP-2, AP-180, амфифизин, эпсин, аррестин). Субъединицы главного адаптерного белка AP-2 образуют макромолекулярный комплекс, напоминающий голову с двумя гибкими симметрично расположенными придатками/ушками (Kirchhausen, 2002). AP-2 соединяется с фосфолипидами мембраны, а также взаимодействует с определенными аминокислотными последовательностями (эндоцитозными

мотивами) и целыми доменами некоторых поглощаемых белков синаптических везикул. AP-2 с помощью Eps15 образует многоточечный крепеж (четыре AP-2×Eps15) для привлечения и последующей сборки клатринового покрытия (Benmerah et al., 1998). Такой комплекс привлекает к себе другие клатриновые адапторы и везикулярные белки. На начальных этапах сборки клатрина с AP-2 взаимодействуют дополнительные белки AP180/CALM и эпсин. Связывание Eps15 с AP-2 и AP-180 запускает быструю полимеризацию клатрина. За счёт вытеснения эпсина в краевую область покрытой мембраны запускается формирование мембранных ямок. После достижения оптимальной кривизны в плазматической мембране образуется структура, напоминающая шею – это место разделения мембран, где присутствуют белки эндофилин, амфифизин и динамин. После разделения мембран везикулы быстро теряют клатриновое покрытие и происходит разборка поверхности с помощью ауксина и шаперона Hsc70 (Zefirov et al., 2009). Динамин составляет ядро комплекса разделения мембран, который обеспечивает отпочкование покрытых клатрином везикул от пресинаптической мембраны (Shupliakov, Brodin, 2010).

1.1.2 Процессы, лежащие в основе постсинаптического электрогенеза

Молекулы нейромедиатора после экзоцитоза диффундируют к рецепторам на постсинаптической мембране, приводя их в активное состояние (Waxenbaum et al., 2021). Плотность постсинаптических рецепторов может меняться, поскольку рецепторы перемещаются в синаптическую мембрану и из нее с высокой скоростью. Движение рецепторов регулируется взаимодействием рецепторов с каркасными белками, которые также очень динамичны. Вдобавок, липиды могут выступать как потенциальные модуляторы синаптической передачи, влияя на активность и сигнализацию рецепторов (Krivoi, Petrov, 2019). Распределение холестерина в плазматической мембране неоднородно. Холестерин, как один из основных компонентов мембран большинства клеток млекопитающих, составляет 10–45% липидных молекул плазматической мембраны и имеет неоднородное распределение (Yeagle, 1985). Он образует богатые холестерином домены,

называемые липидными рафтами, как в пре-, так и в постсинаптической мембране. В липидных рафтах кластеризуется множество белков, в том числе и рецепторы. (Levitan et al., 2010; Krivoi, Petrov, 2019). Многочисленные ионотропные рецепторы (например, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, NMDA-, AMPA-рецепторы и т.д.) локализуются в основном в липидных рафтах.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нХР) высоко экспрессируется в скелетных мышцах и нервной системе и представляет собой лиганд-управляемый ионный канал, который индуцирует быстрые деполяризационные реакции, вызывая возбуждение нейронов или сокращение скелетных мышц (Akaike, Izumi, 2018).

Постсинаптическая мембрана состоит из складок, на гребнях которых располагаются нХР. Немного глубже сосредоточены потенциал-зависимые натриевые каналы (рис. 1). Na-каналы совместно с нХР преобразуют химический сигнал от двигательного нейрона и ацетилхолина (АХ) в электрический. Связывание АХ с нХР вызывает локальную деполяризацию концевой пластинки, которая стимулирует Na-каналы, вызывающие потенциал действия, распространяющийся по мышечному волокну (Ruff, Lisak, 2018).

Было показано, что холестерин может быть ключевым модулятором кластеризации и функционирования нХР (Criado et al., 1982). Холестерин может влиять на структурные и функциональные свойства нХР, их перенос от места синтеза на поверхность клетки, кластеризацию в плазмалемме, скорость эндоцитоза, и даже на свойства нХР, как каналов (Barrantes, 2003, 2004, 2007). Холестерин важен не только для нХР, но и для других рецепторов. Например, было показано, что острое истощение холестерина из мембран культур клеток гиппокампа метил- β -циклодекстрином (М β ЦД) индуцировало значительное снижение вероятности открытия глутаматных NMDA-рецепторов, в то время как функция AMPA/каинатных-рецепторов не затрагивалась. Это показало, что естественный холестерин контролирует функцию NMDA-рецепторов (Korinek et al., 2015).

Кластеризации nXP в постсинаптической мембране – сложный процесс, в котором участвуют комплексы белков, локализованные в липидных рафтах. Для кластеризации nXP необходимы три молекулы: агрин (внеклеточный гликопротеин, фактор роста мотонейронов), MuSK (мышечно-специфическая тирозинкиназа) и рапсин (внутриклеточный белок, который взаимодействует с nXP). Агрин активирует фосфорилирование MuSK и впоследствии индуцирует активность нескольких внутриклеточных ферментов. Однако агрин связывается не напрямую с MuSK, а с LRP4 (белок 4, связанный с рецепторами липопротеинов низкой плотности). Для активации MuSK также необходим внутриклеточный адаптерный белок Dok7 (Krivoi, Petrov, 2019; Xing et al., 2020).

Рапсин напрямую взаимодействует с nXP и актином, тем самым nXP могут быть связаны с цитоскелетом. Действительно, ряд работ доказывает, что сети актина и микротрубочек участвуют в перемещении и кластеризации nXP (Dai et al., 2000; Lee et al., 2009; Schmidt et al., 2012).

Не последнее место в модуляции взаимодействия рецепторов с актиновым цитоскелетом играет белок коронин-6, который важен при агрин- и ламинин-индуцированной кластеризации nXP (Chen et al., 2014).

Ламинин – гетеродимерная молекула внеклеточного матрикса, встроенная в базальную мембрану. Ламинин в нервно-мышечном соединении играет ключевую роль в организации пре- и постсинаптических структур. Ламинин способен связывать рецепторы, включая интегрины, дистрогликан и потенциал-управляемые кальциевые каналы (Rogers, Nishimune, 2017). Комплекс агрин-ламинин-1 с участием дистрогликана задействован в кластеризации nXP. Агрин способен приводить к увеличению количества кластеров nXP, однако совместно с ламинином агрин увеличивает размер кластеров nXP (Zhang et al., 2016).

В свою очередь, дистрогликан функционирует как внеклеточный рецептор, который связывается с ламинином, а также с агрином, перлекином и нейрексином. β -цепочка дистрогликана связывает α -дистрогликан с белком дистрофином. Ламинины (цепи $\alpha 4$ и $\alpha 5$), по-видимому, ответственны за накопление дистрогликанового рецептора в постсинаптической мембране, что

важно для кластеризации nXP (Rogers, Nishimune, 2017). Также дистрогликан связывает дистрофин, образуя дистрогликановый комплекс, важный для поддержания структурной целостности мышечных волокон и стабильности нервно-мышечного синапса за счет связывания актинового цитоскелета с внеклеточным матриксом (Belhasan, Akaaboune, 2020).

1.2 Классификация и функциональное значение пулов синаптических везикул

В нервном окончании различных химических синапсов содержится от ста до нескольких сотен тысяч СВ. Некоторые пулы определяются функциональными характеристиками, другие структурными свойствами. Некоторые из них дискретны, некоторые являются «подмножествами», а третьи представляют собой объединения нескольких пулов (Fowler, Staras, 2015).

С функциональной точки зрения выделяют три пула везикул: немедленно готовый к высвобождению (ready releasable pool, RRP), рециклирующий (мобилизационный) и резервный (рис.1). Считается, что RRP находится в состоянии стыковки с пресинаптической активной зоной и в первую очередь рекрутируется в синаптическую передачу, благодаря чему высвобождение везикул происходит с короткой задержкой. К тому же считается, что размер RRP и вероятность высвобождения положительно коррелируют между собой (Dobrunz, Stevens, 1997; Murthy et al., 2001; Dobrunz, 2002; Matz et al., 2010). Рециклирующий пул продолжает высвобождаться при стимуляции с умеренной частотой. Везикулы в рециклирующем пуле составляют примерно 10-20% от общего количества везикул. Резервный пул представляет собой «депо» синаптических везикул, высвобождение которых происходит только при интенсивной стимуляции. Эти везикулы составляют обычно ~80-90% везикул в большинстве пресинаптических терминалей (Rizzoli, Betz, 2005).

Ранее полагалось, что везикулы спонтанного выброса не отличаются от везикул, участвующих в вызванном высвобождении. Однако в последние годы эта идея была подвергнута сомнению (Truckenbrodt, Rizzoli, 2014; Kavalali, 2015).

Вместо этого предполагают, что в спонтанном высвобождении участвует дискретный пул покоящихся везикул. Существуют доказательства, указывающие на то, что этот пул имеет специфический набор постсинаптических мишеней, различные механизмы слияния, пути рециклинга и молекулярный состав (Kavalali, 2015).

Также существуют везикулы, которые находятся в состоянии стыковки с активной зоной, и полагается, что данный пул входит в состав RRP. В небольших синапсах гиппокампа средний размер пула состоит из ~10 пристыкованных везикул (Harris, Sultan, 1995; Schikorski, Stevens, 1997). Но не все везикулы устанавливают тесный мембранно-мембранный контакт с активной зоной, что подразумевает неоднородность пула. Благодаря положению везикул исследователи определили пристыкованный пул, как возможную основу для изменений синаптических функций, связанных с болезнями и пластичностью, поскольку было продемонстрировано, что фармакологически можно увеличить число пристыкованных везикул и вероятность синаптического высвобождения (Murthy et al., 2001), также было обнаружено увеличение активных зон, что способствует стыковке большего количества везикул.

С использованием оптических методов был обнаружен новый пул – «суперпул», который функционально и организационно отличается от описанных выше. Суперпул состоит как из рециклирующих, так и из находящихся в состоянии покоя везикул (Darcy et al., 2006; Fernandez-Alfonso, Ryan, 2008). Суперпул перемещается вдоль аксона небольшими кластерами везикул путем свободной диффузии или транспорта, зависимо от актина или микротрубочек (Darcy et al., 2006; Westphal et al., 2008). Предполагается, что суперпул может представлять собой несинаптически рекрутируемый пул, который может поддерживать динамические изменения функциональных свойств терминали.

В поисках ответа на вопрос, по какому принципу идёт разделение везикул на пулы, начали изучать различия в белковом составе везикул. Было обнаружено, что везикулы резервного пула содержат высокие уровни VAMP7, а VGLUT1 и

VAMP2 оказались специфичными для рециклирующего пула (Hua et al., 2011). Также везикулы спонтанного выброса отличаются от везикул рециклирующего пула повышенными уровнями синтаксина 13 и VAMP4 и пониженными уровнями синаптотагмина 1, синапсина и VAMP2 (Revelo et al., 2014; Fowler, Staras, 2015).

1.3 Нарушение синаптической передачи при БАС

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – это неврологическое заболевание с летальным исходом, поражающее как верхние мотонейроны коры головного мозга (глутаматергические нисходящие нейроны), так и нижние мотонейроны (холинергические нейроны, иннервирующие скелетные мышцы). Следовательно, БАС приводит к прогрессирующей атрофии и слабости мышц и, в конечном итоге, к параличу. Чаще всего к летальному исходу ведет дыхательная недостаточность вследствие дисфункции диафрагмальной мышцы (главная респираторная мышца). Спорадический БАС составляет примерно 90% случаев, остальные 10% являются наследственными (Brown, Al-Chalabi, 2017). Открытие мутаций в гене супероксиддисмутазы-1 (SOD1), приводящий к БАС, в 1993 году привело к появлению трансгенных мышей, которые воспроизводят ключевые особенности болезни.

Мутации в SOD1 ответственны за ~25% случаев наследственного БАС. SOD1 экспрессируется во многих типах клеток, где он нейтрализует супероксидные радикалы и является компонентом окислительно-восстановительных сигнальных путей. Связанные с БАС мутации вызывают конформационные изменения в SOD1 из-за неправильной укладки белков (Bruijn et al., 1998) и аберрантных взаимодействий с другими белками (Urushitani et al., 2006). При БАС могут возникать такие нарушения, как глутаматная эксайтотоксичность, повышение образования активных форм кислорода, неправильная сборка белков и их агрегация, митохондриальная дисфункция, стресс эндоплазматического ретикулума (за счет накопления белковых агрегатов), нарушение аксонального транспорта, нейровоспаление, метаболический стресс (Turner et al., 2013; Vucic et al., 2014).

Глутаматная эксайтотоксичность вызвана чрезмерной стимуляцией глутаматергических NMDA- и AMPA-рецепторов в постсинаптических нейронах. Глутамат является очень мощным нейромедиатором, и важно, чтобы его действие было кратковременным. Однако, было показано, что у пациентов с БАС уровень глутамата может быть намного выше, чем у здоровых, что приводит к эксайтотоксичности и гибели клеток (Vejiux et al., 2018).

Также есть сведения о нарушении функционирования нервно-мышечных синапсов у трансгенных SOD1-мышей. На досимптомной стадии заболевания наблюдались атрофия мышц и нарушения в мышечных волокнах. Совместно с этим по мере прогрессирования заболевания происходило снижение количества синапсов, что подтвердилось снижением маркерного пресинаптического белка SV2 (гликопротеин, трансмембранный белок СВ, важен для экзоцитоза (Talbot, Kubilus, 2018)) в нервно-мышечном соединении (НМС) (Narai et al., 2009). Также было установлено, что может происходить изменение спонтанного выброса ацетилхолина в двигательных терминалях mSOD мышей (Naumenko et al., 2011). Вероятно, это связано с нарушением регулирования спонтанного экзоцитоза со стороны аденозиновых рецепторов A1 и A2, активация которых подавляет экзоцитоз (Nascimento et al., 2015).

При БАС наблюдаются глиальные изменения в НМС. Повышенная активация ацетилхолиновых мускариновых рецепторов приводит к усилению Ca^{2+} ответов в пресинаптических шванновских клетках при синаптической активности у mSOD мышей. В результате тормозится экспрессия генов, необходимых для репарации НМС, что нарушает стабильность НМС. Неадекватная активация мускариновых рецепторов, вероятно, может быть связана с перераспределением и изменением плотности самих рецепторов. Вдобавок, белок SOD1 может влиять на функциональность мускариновых рецепторов через путь, связанный с активацией ФЛС (Arbour et al., 2015).

У мышей с БАС присутствует гипополипидемия, которая может быть связана с нарушенным липидным метаболизмом, а не просто с феноменом нервно-

мышечной дегенерации или энергетическим дисбалансом. В плазме и спинномозговой жидкости изменяется уровень различных липидов, включая холестерин и его метаболитов. Было показано, что более высокий уровень общего холестерина коррелируют с более низким риском смертности от БАС (Dupuis et al., 2008).

При БАС патологические явления, включая гиперметаболизм, вызывают повышенную потребность в энергии, что приводит к большей затрате соответствующих метаболических субстратов в ЦНС. Доклинические исследования на мышах и клетках человеческого происхождения показывают, что происходят изменения в экспрессии генов метаболизма глюкозы и жирных кислот. Более того, снижается уровень глюкозы в головном и спинном мозге, подавляются транспорт и синтез лактата, повреждаются митохондрии нейронов, а митохондриальная электронно-транспортная цепь становится дисфункциональной у мышей и людей с БАС (Tracey et al., 2021).

У пациентов с БАС, а также у мышей, моделирующих БАС, наблюдается значительное усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). ПОЛ снижает текучесть мембран за счет модификации соотношения полиненасыщенных/насыщенных липидов и способствует образованию липид-липидных и липид-белковых связей. Изменения проницаемости, текучести и структуры мембран приводят к нарушению функций мотонейронов при БАС. Важно отметить, что нарушение структурных липидных компонентов запускает апоптоз клеток (Tracey et al., 2021). При БАС ПОЛ влияет на состав липидных рафтов. Так же происходит подавление активности белков, регулирующих метаболизм, везикулярный транспорт, рост нейритов и высвобождение/синтез нейромедиаторов (Zhai et al., 2009).

Имеются убедительные доказательства того, что биологические процессы, связанные с полиненасыщенными жирными кислотами, сильно нарушены при БАС, что может быть связано с LX-рецепторами. LX-рецептор специфически контролирует уровень холестерина и, следовательно, играет важную роль в

поддержании липидного баланса, в том числе в ЦНС (Endo-Umeda, Makishima, 2019). Дисфункция LX-рецепторов нарушает ряд сигнальных каскадов, что, в конечном итоге, приводит к повреждению как двигательных нейронов, так и глиальных клеток. Более того, нарушение LX-рецепторов вызывает воспалительные реакции, приводящие к потере двигательных нейронов и дефектам нервно-мышечных соединений (Tracey et al., 2021).

1.4 Роль холестерина в регуляции синаптической передачи

Холестерин – это липофильная молекула, важная составляющая клеточных мембран. Холестерин также является предшественником стероидных гормонов, окистеринов и желчных кислот. Присутствие холестерина в мембранах регулирует функцию многих белков (транспортеров, рецепторов и ионных каналов). Холестерин напрямую связывается со многими белками, тем самым влияя на их конформацию и функцию (Arenas et al., 2017). Также известно опосредованное действие холестерина за счёт физико-химического влияния на текучесть и толщину мембран, что, как следствие, воздействует на белковые процессы. Вдобавок, холестерин является ключевой молекулой в образовании липидных рафтов, участвующих во многих клеточных процессах, таких как апоптоз, передача сигналов и дифференцировка клеток (Krivoi, Petrov, 2019).

Синтез холестерина энергозатратен и требует участия более 30 ферментов. В период активной миелинизации в олигодендроцитах наблюдается более интенсивный синтез холестерина, чем в астроцитах и нейронах (Arenas et al., 2017). В постнатальный период способность нейронов к продукции холестерина сильно снижена, и нейроны зависят от поставки холестерина, синтезируемого в основном глией, в частности астроцитами (Pfrieger, Ungerer, 2011; Funfschilling et al., 2012). Исследования центральных и нервно-мышечных синапсов предполагают, что все этапы рециклирования СВ (экзоцитоз, эндоцитоз и везикулярный трафик) могут зависеть от содержания холестерина в пресинаптической мембране и мембране СВ (Egawa et al., 2016; Petrov et al., 2016). Пресинаптическая часть мотонейрона покрыта шванновской клеткой, которая

является лучшим кандидатом для обеспечения НМС холестерином, поскольку она может продуцировать аполипротеин и частицы, содержащие холестерин (Comley et al., 2011; Choi et al., 2013).

Источниками холестерина для скелетных мышц является как местный биосинтез, так и поглощение из кровотока холестеринсодержащих липопротеиновых частиц. При этом базальный синтез эндогенного холестерина важен, так как ингибирование продукции холестерина приводило к мышечной слабости и утомлению (Yokoama et al., 2007; Barrientos et al., 2017). Причиной может быть высокая потребность в холестерине для ремоделирования мембраны и важность промежуточных продуктов биосинтеза холестерина (убихинона, долихола, фарнезила и т.д.) (Norata et al., 2014). Скелетная мышца может накапливать эфиры холестерина в составе липидных капель, избыток которых может приводить к миопатии. Видимо, при физической нагрузке происходит выведение холестерина в форме оксистеринов за счет образования активных форм кислорода (АФК), которые могут окислять холестерин (Murphy, Johnson, 2008). Оксистерины, в свою очередь, активируют LX-рецепторы (Archer et al., 2014; Webb et al., 2017), которые запускают синтез или захват холестерина, что компенсирует выведение холестерина. Таким образом, метаболизм холестерина зависит от баланса между синтезом, потреблением, хранением и выведением.

1.5 Оксистерины как особый класс производных холестерина

Оксистерины могут модулировать множество процессов, связанных с воспалительными реакциями и нейродегенерацией (Egawa et al., 2016). Интересно отметить, что был выделен особый вариант гибели клеток, связанный с повышенным образованием оксистеринов – оксиапоптозофагия. Некоторые оксистерины (24-гидроксихолестерин, 7-кетохолестерин, 7 β -гидроксихолестерин) в цитотоксических концентрациях инициируют гибель клетки, связанную с оксидативным стрессом и некоторыми характеристиками апоптоза и аутофагии (Nury et al., 2021).

24S-гидроксихолестерин (24ГХ) синтезируется в головном мозге и проходит в кровоток через гематоэнцефалический барьер. Уровень 24ГХ понижается на симптомных стадиях ряда нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера (Arenas et al., 2017). В нервно-мышечных синапсах 24ГХ в концентрациях 0,4-4 мкМ при остром воздействии способен усиливать синаптическую передачу за счет ускорения рециклинга СВ. 24ГХ снижает продукцию NO (оксид азота) эндотелиальной NO-синтазой, активность которой зависит от ее ассоциации с липидными рафтами (Kasimov et al., 2017). У мышей с БАС 24ГХ также снижал продукцию NO, но имел обратный эффект на синаптическую передачу, поскольку повышение NO приводило к ускорению рециклинга СВ у мышей с БАС, в отличие от мышей дикого типа, у которых NO угнетал синаптическую передачу (Mukhutdinova et al., 2018).

Другой оксистерин – 5 α -холестан-3-он, продуцируется как промежуточный стерол в пути биосинтеза холестерина. Уровни 5 α -холестан-3-она были повышены у пациентов с церебротендинальным ксантоматозом (DeBarber et al., 2011), характеризующийся мышечной дисфункцией. 5 α -холестан-3-он (0,2 мкМ) снижает количество вовлекаемых в экзо-эндоцитоз СВ, что было связано с уменьшением целостности липидных рафтов в нервно-мышечных синапсах лягушки и мыши (Kasimov et al., 2015, 2016). Напротив, полученный синтетическим способом нейропротекторный оксистерин олесоксим (холест-4-ен-3-он, оксим; TRO19622) увеличивает вызванное высвобождение АХ, а также количество СВ, вовлеченных в экзо- и эндоцитоз, и скорость рециклинга СВ в НМС лягушки. Более того, олесоксим был способен увеличивать целостность липидных рафтов в этих синапсах (Kasimov et al., 2016).

Таким образом, можно предполагать, что окисленные метаболиты холестерина могут представлять новый класс пресинаптических модуляторов высвобождения нейромедиатора, которые могут способствовать адаптации мышечной активности к текущему физиологическому состоянию организма (Krivoi, Petrov, 2019).

1.6 25-гидроксихолестерин: физиологическое значение и эффекты

Холестерин-25-гидроксилаза (CH25H) принадлежит к семейству окислительно-восстановительных ферментов, в основном локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и аппарате Гольджи и катализирует окисление холестерина до 25ГХ (Walther, Farese, 2012). CH25H увеличивается при воспалительных процессах, например, в макрофагах и дендритных клетках при стимуляции липополисахаридами. Также было показано, что экспрессия CH25H может стимулироваться интерфероном (ИФН) через путь STAT1. В данном случае 25ГХ единственный синтезируемый и секретируемый макрофагом окистерин (Blanc et al., 2013). 25ГХ сам по себе способен активировать экспрессию CH25H, что приводит к формированию петли положительно-обратной связи, и этот эффект зависит от LX-рецепторов, которые являются ядерными рецепторами для 25ГХ (Liu et al., 2018). Кроме того, воспалительный цитокин интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли α и IL-6 также могут способствовать экспрессии CH25H через транскрипционный фактор STAT1 в инфицированных вирусом макрофагах человека (Magoro et al., 2019). Уровень 25ГХ в плазме человека и мышей не высок (≥ 0.1 мкМ) (Karuna et al., 2015), однако при стимуляции вирусными инфекциями и при БАС концентрация 25ГХ может увеличиваться до 1 мкМ (Bauman et al., 2009; Shen et al., 2017).

Хорошо изученная роль 25ГХ – это модулирование иммунного ответа, где он имеет разнонаправленные эффекты в зависимости от концентрации и других условий. С одной стороны, 25ГХ индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов в моноцитах/макрофагах, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL5 и макрофагальный колониестимулирующий фактор. С другой стороны, 25ГХ подавляет активность инфламмасом путем индукции ИФН1, который обладает мощной противовирусной активностью, оказывает ингибирующее действие на иммунитет, предотвращая неконтролируемое воспаление, приводящее к значительным повреждениям тканей при некоторых острых вирусных инфекциях (Kobasa et al., 2007; Morens, Fauci, 2007) и аутоиммунных

заболеваниях (Trinchieri, 2010; Inoue, Shinohara, 2013). Противоположный эффект 25ГХ, вероятно, имеет концентрационно-зависимый характер, поскольку 25ГХ в наномолярных концентрациях оказывает противовоспалительное действие, а в микромолярных способствует провоспалительному эффекту (Jang et al., 2016).

Повышенная концентрация 25ГХ была обнаружена при БАС. В этих условиях была увеличена экспрессия ферментов важных для синтеза и метаболизма 25ГХ. Об участии данного оксистерина в патогенезе БАС свидетельствуют данные о том, что 25ГХ индуцировал митохондриально-зависимый апоптоз клеток посредством активации киназы GSK-3 β (Choi et al., 2008), фермента, который, как считается, участвует в прогрессировании БАС. При БАС увеличивается экспрессия Toll-подобного рецептора-4 в глии спинного мозга. В свою очередь, 25ГХ продуцируется в макрофагах и глии ферментом в ответ на передачу сигналов через Toll-подобный рецептор-4 (Zhang et al., 1997; Diczfalussy et al., 2009; Olah et al., 2012). Однако несмотря на многочисленные важные эффекты 25ГХ, его роль в БАС остается неизвестной.

25ГХ является лигандом для ядерных LX-рецепторов, которые регулируют метаболизм холестерина через изменение транскрипции генов. Следовательно, 25ГХ может модулировать метаболизм холестерина путем активации LX-рецепторов (Lehmann et al., 1997). Лиганды LX-рецепторов повышают экспрессию мембранных транспортеров холестерина, таких как ABCA1 и ABCG1, которые опосредует отток клеточного холестерина и фосфолипидов, а также являются мишенями для терапии атеросклероза (Zhu et al., 2012). LX-рецептор-зависимым образом 25ГХ индуцирует экспрессию ИФН γ , а затем ИФН γ увеличивает экспрессию CH25H (Liu et al., 2018), а повышенный уровень CH25H впоследствии способствует продукции 25ГХ (Diczfalusy et al., 2009). В результате, 25ГХ может регулировать не только гомеостаз липидного метаболизма, но также опосредованные через ИФН γ иммунные ответы по LX-рецепторному пути (Glass, Saijo, 2010).

В качестве эндогенного лиганда 25ГХ также может связываться с такими рецепторами, как орфанные рецепторы, рецепторы ретиноевой кислоты, рецепторы эстрогена α ($\text{ЭР}\alpha$), рецепторы 183, связанные с G-белком. В дополнение к рецепторам, 25ГХ способен связывать некоторые белки, связывающие оксистерины: индуцированный инсулином ген (INSIG), белок Ниманна-Пика (NPC), семейство оксистерин-связывающих белков (ORP) и стероидогенный регуляторный белок переноса липидов (START). Более подробно в таблице 1 (данные взяты из источника Cao et al., 2020).

Таблица 1. Таргетные белки для 25ГХ (данные взяты из источника Cao et al., 2020).

Рецепторы	Роль	Функции
Х-рецепторы печени (LX α -, LX β -рецепторы)	Агонист для LX α -, LX β -рецепторы	1. Отрицательно регулирует биосинтез холестерина и способствует оттоку холестерина (Janowski et al., 1999; Liu et al., 2018; Endo-Umeda, Makishima, 2019; Leussink et al., 2020). 2. Воспалительная регуляция (Leussink et al., 2020). 3. Способствует пироптозу (Derangere et al., 2014).
Ретиноидные орфанные рецепторы (ROR α , ROR β , ROR γ)	ROR α – лиганд ROR γ – агонист	Дифференцировка Т-хелперов-17 (Dzhagalov et al., 2004; Soroosh et al., 2014; Zhao et al., 2019).
Рецептор эстрогена α ($\text{ЭР}\alpha$)	Агонист	Опосредует изменения экспрессии генов и ростовые реакции в раковых клетках груди и яичников (Lappano et al., 2011).
Рецептор, связанный с G-белком 183 (GPR183, EBI2)	Агонист	Направляет миграцию иммунных клеток (Hannedouche et al., 2011; Liu et al., 2011).
Индукцированный инсулином ген 1 (INSIG)	Лиганд	Удерживает SREBP в ЭПР и подавляет биосинтез холестерина (Ouyang et al., 2020).
Белок Ниманна-Пика	Лиганд	Клиренс холестерина в лизосомах

C1 (NPC1)		(Frolov et al., 2003; Feng et al., 2019; Wheeler, Sillence, 2020).
Семейство оксистерин-связывающих белков 8 (ORP8)	Лиганд	1. Отток холестерина в макрофагах (Yan et al., 2008). 2. Вызывает апоптоз клеточных линий гепатомы (гепатоцеллюлярная карцинома) (Li et al., 2016).
Стероидогенный острый регуляторный белок переноса липидов (START)	Лиганд	Поддержание гомеостаза клеточного холестерина (Alpy, Tomasetto, 2005; Rodriguez-Agudo et al., 2005; Rodriguez-Agudo et al., 2006).

Как упоминалось ранее, 25ГХ усиленно вырабатывается при вирусной инфекции. Его мощная способность подавлять инвазию вируса в клетку осуществляется посредством ряда механизмов (Zhao et al., 2020). Метаболизм холестерина имеет большое значение для проникновения некоторых вирусов в клетку хозяина, их репликации и высвобождения, последнее происходит зависимым от липидных рафтов образом (Pombo, Sanyal, 2018). 25ГХ может напрямую изменять положение, ориентацию и доступность холестерина в мембране, тем самым блокируя проникновение вируса. Кроме того, 25ГХ может встраиваться в клеточную мембрану, изменять её стабильность и целостность рафтов, тем самым ингибируя слияние вируса и мембраны клетки-хозяина (Bielska et al., 2014). В дополнение, 25ГХ может также непосредственно ингибировать репликацию вируса (Shibata et al., 2013).

1.7 Олесоксим как синтетический нейропротектор

4-холестен-3-он, оксим (олесоксим или TRO19622) – холестерин-подобное соединение, полученное синтетическим способом во время скрининга веществ для лечения нейродегенеративных расстройств. Один из механизмов действия олесоксима связан с ингибированием комплекса митохондриальной транзиторной поры (mPTP), который приводит к гибели клетки посредством высвобождения кальция и цитохрома С из митохондрий. Структура mPTP включает в себя белки наружной и внутренней митохондриальных мембран: VDAC (потенциал-

зависимый анионный канал), TSPO (белок-транслокатор) и ADP/АТР-антипортер. TSPO и VDAC являются мишенями олесоксима. TSPO участвует в различных клеточных функциях, включая транспорт холестерина и синтез стероидных гормонов, открытие mPTP, митохондриальное дыхание, апоптоз, пролиферация, онкогенез и воспаление. Взаимодействие олесоксима и VDAC предотвращает образование комплекса mPTP, окислительного стресса и апоптоза (Bordet et al., 2007; Bordet et al., 2010; Martin et al., 2011; Weber et al., 2019; Rovini et al., 2020). Кроме того, VDAC локализованы в плазматической мембране нейронов, особенно в микродоменах, богатых холестерином (Bahamonde, Valverde, 2003; Baker et al., 2004; Rahbar, Fenselau, 2004; Elinder et al., 2005; Marin et al., 2007; Ramirez et al., 2009). Функции VDAC плазматической мембраны могут быть связаны с контролем проницаемости для анионов, объема клеток, апоптоза, амилоидной токсичности, окислительно-восстановительного статуса и сигнализации, зависимой от ЭР α (De Pinto et al., 2010; Gonzalez-Gronow et al., 2013; Li et al., 2014). Кроме того, VDAC были обнаружены в протеоме пресинаптической мембраны, в активных зонах и CB (Morciano et al., 2005; Takamori et al., 2006; Morciano et al., 2009; Volkandt, Karas, 2012; Lassek et al., 2014). Однако значение VDAC в пресинаптической функции до сих пор не изучено. В то же время фундаментальная роль VDAC во многих клеточных процессах подразумевает возможное значение для нейротрансмиссии, в частности, для регуляции высвобождения нейромедиатора.

Еще один из возможных механизмов действия олесоксима может быть связан со снижением окислительного стресса. Обе мишени олесоксима, VDAC и TSPO, участвуют в ответе и модуляции окислительного стресса (Batoko et al., 2015), а избыточная продукция АФК может запускать формирование mPTP. Действительно, существуют исследования, подтверждающие влияние олесоксима на производство АФК (Bordet et al., 2010; Ma et al., 2014; Magalon et al., 2016).

Некоторые нейродегенеративные заболевания сопровождаются изменением содержания холестерина в митохондриальной мембране (Eckmann et al., 2012),

что может быть связано с изменениями текучести мембраны и индукцией апоптоза (Colell et al., 2003). Олесоксим приводил к снижению текучести мембраны, а также восполнял аномально низкие уровни холестерина в митохондриальных мембранах (Eckmann et al., 2014).

Свои нейропротективные свойства олесоксим проявлял при БАС, также он был протестирован в качестве терапевтического средства для лечения других неврологических заболеваний, таких как болезнь Хантингтона и Паркинсона (Weber et al., 2019).

Первые данные о терапевтическом потенциале олесоксима при БАС появились в ходе доклинического исследования, проведенного Bordet и его коллегами в 2007 году. Введение олесоксима предотвращало потерю веса тела и двигательную дисфункцию у mSOD мышей (мыши с моделью БАС), увеличивало длительность жизни за счет отложенной манифестации заболевания (Bordet et al., 2007). У mSOD мышей олесоксим задерживает денервацию икроножных мышц и снижает астроглиоз, а также микроглиоз спинного мозга (Sunyach et al., 2012). В моторных нейронах, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с БАС, олесоксим противодействовал гибели мотонейронов (Yang et al., 2013).

В рамках представленной работы мы сосредоточились на схожей по строению молекуле 25ГХ. 25ГХ в наномолярных концентрациях присутствует в норме в нервной ткани, однако ее 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 БАС (Zakutjanova et al., 2021), который сопровождается ранним нарушением нервно-мышечной передачи, предшествующий гибели нейронов и тяжелой мышечной атрофии (Kim et al., 2017). До настоящего времени влияние 25ГХ на нервно-мышечную передачу не было изучено, хотя этот гидроксистерин может связывать изменения синаптической передачи с воспалительными

реакциями и нейродегенеративными патологиями, сопровождающиеся нейровоспалением. Также синтетическое производное холестерина – олесоксим (4-холестен-3-он оксим) попало в поле наших интересов, поскольку имеет нейропротекторные свойства в моделях нейродегенеративных заболеваний, в том числе при БАС (Weber et al., 2019). При этом нет данных о его влиянии на синаптическую передачу у млекопитающих. Хотя ранние работы нашей лаборатории указывали на его способность усиливать участие СВ в экзоцитозе и стабилизировать липидные микродомены в пресинаптических нервных окончаниях лягушки (Kasimov et al., 2016).

Таким образом, ряд литературных данных свидетельствует о том, что 25ГХ имеет эффекты касательно иммунного ответа и усиленно вырабатывается при БАС. В свою очередь, олесоксим имеет нейропротекторные свойства при различных нейродегенеративных заболеваниях за счет угнетения образования митохондриальной поры. Однако неизвестно, каким образом эти гидроксистерины могут влиять на нервно-мышечную передачу.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования и содержание животных

В экспериментах использовались изолированные нервно-мышечные препараты диафрагмальной мышцы взрослых мышей (возраст 4-6 месяцев). Животных содержали в условиях 12 часов света/12 часов темноты; вода и еда были предоставлены в свободном доступе. Для минимизации страданий мышей анестезировали с помощью внутривентральной инъекции Na^+ -пентобарбитала (40 мг/кг) и декапитировали гильотиной, после чего диафрагма с нервным окончанием быстро извлекалась. Протокол был одобрен комитетом по биоэтике Казанского медицинского университета и соответствует требованиям Директивы ЕС 2010/63/EU, а также Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы № 123, г. Страсбург, 1985).

В экспериментах по исследованию БАС использовались трансгенные mSOD мыши линии B6SJL-Tg (SOD1^{G93A})dl1Gur/J с экспрессией мутантной формы G93A (в 93 кодоне глицин заменен на аланин) человеческой супероксиддисмутазы-1 (SOD1); порода №002300, закуплены в лаборатории Джексона) и содержались как гемизиготные линии для разведения (Коллекция биоресурсов отделения РАН Института биоорганической химии Московской области). Использовали только гемизиготных мышей первого поколения F1 после скрещивания гемизиготных мышей-самцов Tg(SOD1^{G93A})dl1Gur/J с нетрансгенными самками линии мышей дикого типа B6SJL (Лаборатория Джексона). Соответствующие по полу мыши линии B6SJL одного помёта служили контролем дикого типа. Проявление начальных симптомов заболевания в генотипе SOD1^{G93A} происходит с задержкой, по сравнению с исходной линией (SOD1^{G93A})1Gur с высоким числом копий, признаки БАС отсутствуют до 3-месячного возраста (Pfohl et al., 2015). Эта модель мыши использовалась, чтобы сосредоточить внимание на ранних стадиях заболевания. У этих мышей парализуется, по крайней мере, одна конечность в возрасте 6-7 месяцев, а

ожидаемая продолжительность жизни обычно составляет 4-6 недель после начала паралича (Gurney et al., 1994; Pfohl et al., 2015).

2.2 Растворы и реактивы

Нервно-мышечный препарат диафрагмы быстро выделяли сразу после эвтаназии. Диафрагма была рассечена на две полудиафрагмы с отдельными нервами. Срезанный конец диафрагмального нерва свободно втягивали во всасывающую пипетку со стимулирующими электродами. Полудиафрагмы прикрепляли ко дну камеры с силиконовой подкладкой (объем ванночки 5 мл), которую непрерывно перфузировали со скоростью 5 мл·мин⁻¹ физиологическим солевым раствором, насыщенным карбогеном и содержащим: NaCl-129 mM, KCl-2 mM, CaCl₂-2 mM, MgSO₄-1 mM, NaH₂PO₄-1 mM, NaHCO₃-20 mM, глюкоза-11 mM и HEPES-3 mM; pH=7.4.

2.2.1 25ГХ и фармакологические вещества

25ГХ (Sigma) растворяли в ДМСО и затем разводили в физиологическом растворе для получения конечной концентрации. Конечная концентрация ДМСО в рабочем растворе была крайне низкой, менее 0.0001% от объема. Сам по себе ДМСО (0.0001%) не менял ни один из оцениваемых параметров, что соответствует нашим предыдущим данным (Kasimov et al., 2016; Kasimov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2019). Результаты, полученные с ДМСО, были объединены с контролем.

Для раскрытия механизма действия 25ГХ были использованы следующие химические вещества: GSK 2033 (10 мкМ; 2,4,6-триметил-N-[[3'-(метилсульфонил)[1,1'-бифенил]-4-ил]метил]-N-[[5-(трифторметил)-2-фуранил]метил] бензенсульфонамид; антагонист LX-рецепторов, Tocris); D-AP5 (40 мкМ; D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота, антагонист NMDA-рецепторов, Sigma); NIBR 189 (1 мкМ, (2E)-3-(4-бромфенил)-1-[4-4-метоксибензоил]-1-пиперазинил]-2-пропен-1-он, антагонист рецептора EBI2 (GPR183), Tocris); дантролен (20 мкМ, 1-[(5-(п-Нитро-фенил)-фурфурил-иден)-

амино] – гидантоин натриевая соль, антагонист рианодиновых рецепторов, Sigma); TMB8 (5 мкМ, 8-(диэтиламино)октил-3,4,5-триметоксибензоат гидрохлорид, блокатор инозитолтрифосфатных рецепторов, Sigma); миристоилированный пептид ингибитора ПКС (75 мкМ, Myr-RFARKGALRQKNV, Sigma); хелеритрин хлорид (1 мкМ, ингибитор ПКС; Tocris); D609 (100 мкМ, ингибитор фосфатидилхолин-специфической ФЛС (ФХ-ФЛС); Tocris); U-73122 (10 мкМ, ингибитор фосфатидилинозитол-специфической ФЛС (ФИ-ФЛС), Sigma); галлеин (10 мкМ, 3',4',5',6'-тетрагидроксиспиро [изобензофуран-1(3H),9'-(9H)ксантен]-3-дин, ингибитор субъединицы $\beta\gamma$ -димера G-белка, Tocris); NAC (200 мкМ N-ацетил-L-цистеин, антиоксидант, Sigma). GSK 2033, D-AP5, NIBR 189, дантролен, TMB8, пептидный ингибитор ПКС, хелеритрин, D609, U-73122, галлеин и NAC были добавлены в раствор за 20 мин до аппликации 25ГХ и оставались в перфузате на протяжении всего эксперимента.

В некоторых экспериментах для оценки влияния внеклеточного Ca^{2+} препараты инкубировались в физиологическом солевом растворе без Ca^{2+} , содержащий EGTA (1 мМ, этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота, Sigma), в течение 20 мин до и во время аппликации 25ГХ. Для проверки влияния внутриклеточного Ca^{2+} препараты предварительно обрабатывали клеточно-проницаемым Ca^{2+} хелатором EGTA-AM (0.2 мМ, EGTA Acetoxymethyl ester, Thermo Fisher Scientific) в физиологическом растворе без Ca^{2+} в течение 40 мин, после чего EGTA-AM отмывали в течение 40 мин обычным физиологическим раствором перед обработкой 25ГХ. Перфузия с МВЦД (0.1 мМ, Sigma) в течение 20 мин перед добавлением 25ГХ или иммунофлуоресцентным мечением LX-рецепторов использовалась для частичного разрушения липидных рафтов (Kasimov et al., 2015). При добавлении МВЦД, EGTA или EGTA-AM корректировалась осмолярность растворов. Для ингибирования G_i -белка мышам за 72 ч до выделения препаратов делали внутрибрюшинную инъекцию коклюшного токсина (150 мкг/кг) в натрий-фосфатном буфере (Odnoshivkina et

al., 2017). Контрольных животных обрабатывали соответствующим количеством растворителя.

2.2.2 Использование 25ГХ у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза

Базальная концентрация 25ГХ в плазме низкая (<0.1 мкМ) и может увеличиваться до 1 мкМ в ответ на индукцию воспалительного ответа (Bauman et al., 2009; Shen et al., 2017). Таким образом, концентрация 1 мкМ и соответствующая доза для внутрибрюшинной инъекции (0.4 мг/кг) были выбраны для острого и хронического использования 25ГХ, соответственно. Острая аппликация 25ГХ длилась 1.5 ч до начала мечения флуоресцентными индикаторами. Для оценки длительного воздействия вводились внутрибрюшинные инъекции 25ГХ (0.4 мг/кг), разведенного в физиологическом растворе (общий объем 0.2 мл), один раз в четыре дня в течение одного месяца (всего восемь инъекций), в то время как контрольной группе животных вводили тот же раствор без 25ГХ. Хроническое введение 25ГХ продолжалось от 4.5 до 9-недельного возраста. Последствия лечения ювенильных мышей были изучены с целью оценки влияния 25ГХ на появление у mSOD мышей аномалий на ранней стадии заболевания до появления двигательных симптомов.

2.2.3 Олесоксим и фармакологические вещества

Предварительная обработка олесоксимом 0.4 мкМ (Tocris) длилась 20 мин до стимуляции нерва при частотах 20 Гц или 5 Гц. Олесоксим растворяли в ДМСО (Tocris), и конечная концентрация растворителя составляла 0.001%. Использовали *DIDS* (50 мкМ, 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфат, Tocris) (Benítez-Rangel et al., 2015; Ben-Hail, Shoshan-Barmatz, 2016) и *S-18* (1 мкМ, рандомерный олигонуклеотид фосфоротиоата S-18, Trilink) (Tan et al., 2007; Stein et al., 2008) в качестве блокаторов белка VDAC и добавляли их в ванночку с раствором за 5 мин до аппликации олесоксима. Эти блокаторы VDAC присутствовали в растворе на протяжении всего эксперимента. Ротенон (10 мкМ,

30-минутная аппликация, Sigma) использовался для индукции митохондриальной дисфункции (Ragheb et al., 2003). (-)Везамикол (2 мкМ, Sigma) использовали в качестве блокатора везикулярного переносчика ацетилхолина, который отвечает за наполнение СВ ацетилхолином (Searl et al., 1991).

2.3 Электрофизиологический метод регистрации потенциалов концевой пластинки

Постсинаптические сигналы, ПКП и МПКП, регистрировались с помощью микроэлектродной техники (Mukhutdinova et al., 2018; Giniatullin et al., 2019). Внутриклеточные стеклянные микроэлектроды (сопротивление 3-5 МОм и диаметр кончика ~1 мкм) заполняли 2.5М КСl и помещали в синаптическую зону. Для предотвращения мышечных сокращений в раствор (за 20 минут до записи) добавляли блокатор мышечных потенциал-зависимых натриевых каналов μ -conotoxin-GIIIB (0.5 мкМ, Alamone Lab). Диафрагмальный нерв стимулировали сверхпороговыми импульсами длительностью 0.1 мс через всасывающий электрод с частотой 0.2, 0.5 или 20 Гц. Постсинаптические ответы были оцифрованы на частоте 50 кГц и проанализированы в автономном режиме с использованием программного обеспечения Elph (Zakharov, 2019). Записывающая аппаратура состояла из усилителя Axoclamp 900 А (Molecular devices, США) и платы цифрового ввода-вывода LA II (Пущино, Россия). МПКП или ПКП (при частоте 0.2 Гц) были зарегистрированы в 25-30 различных мышечных волокнах. Затем данные отдельных мышечных волокон были объединены для получения средних значений параметров МПКП и ПКП в мышце. Электрофизиологические эксперименты проведены совместно с к.б.н. Ценцевым А.Н. (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН).

2.4 Оптический метод

2.4.1 Флуоресцентные подходы для оценки экзоцитоза

Изображения регистрировали с помощью микроскопа (BX51WI Olympus), оснащенного конфокальным вращающимся диском (Olympus) и объективами

UPLANSapo 60xw/LumPlanPF 100xw. Изображения были получены с помощью CCD-камеры DP71 (Olympus) под управлением программы CellSens (Olympus). ImagePro (Media Cybernetics) использовался для анализа изображений.

FM1–43. Для оценки темпа экзоцитоза СВ использовали краситель FM1–43 (7 мкМ, Thermo Fisher). Этот краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и затем захватывается эндоцитозом в СВ (Betz, Bewick, 1993). Чтобы загрузить FM1–43 в СВ, диафрагмальный нерв стимулировали с частотой 20 Гц в течение 3 минут или 5 Гц в течение 10 минут. Препараты подвергали воздействию FM1–43 во время и в течение 5 минут после окончания стимуляции, а затем перфузировали солевым раствором без красителя, содержащим 30 мкМ ADVASEP-7 (Biotium), в течение 20 минут для улучшения отмывки поверхности мембраны от красителя FM1–43. После воздействия веществ на препараты диафрагмальный нерв повторно стимулировали с частотой 20 Гц или 5 Гц в течение 10 минут, чтобы вызвать экзоцитоз СВ, что приводило к снижению флуоресценции красителя в нервных окончаниях. Изображения были сделаны до начала стимуляции (0) и во время стимуляции в разные моменты времени (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 420, 600 с). Интересующие области освещались только в моменты съемки изображения. Флуоресценцию FM1–43 детектировали с помощью возбуждающего фильтра 480/10 нм, дихроичного зеркала 505 нм и эмиссионного фильтра 535/40 нм. Фоновый сигнал оценивался как средняя интенсивность флуоресценции в области вне НМС (4x30 мкм²). Сигнал нервных окончаний определялся как средняя интенсивность пикселей в интересующих областях после вычитания фонового значения (Petrov et al., 2008). Чтобы проиллюстрировать скорость потери красителя, начальное значение сигнала флуоресценции нервного окончания (до начала стимуляции) было принято равным 1.0. Эксперименты с использованием FM1–43 для оценки влияния олесоксима на экзоцитоз СВ частично выполнены с Гильмутдиновым А.И. (Казанский (Приволжский) федеральный университет).

MitoSox и CM-H2DCFDA для детекции активных форм кислорода. MitoSox использовался в качестве индикатора АФК в митохондриях. Краситель избирательно накапливается в митохондриях и излучает красную флуоресценцию после окисления супероксидом. Препараты инкубировали с MitoSox (2 мкМ) в течение 15 мин, а затем перфузировали физиологическим раствором (без красителя) в течение 40 мин (Odnoshivkina et al., 2015). Флуоресценцию визуализировали фильтром возбуждения 510/10 нм и фильтром эмиссии 590/20 нм.

Также временной ход продукции АФК определяли с помощью CM-H2DCFDA (производное H2DCFDA с меньшей пассивной утечкой из клеток; Invitrogen™). Этот краситель захватывается внутрь клетки после гидролиза до CM-H2DCF, флуоресценция которого усиливается при АФК-опосредованном окислении. Препараты инкубировали с CM-H2DCFDA (5 мкМ) в течение 25 мин, промывали физиологическим раствором в течение 40 мин и визуализировали. Флуоресценция красителя возбуждалась вспышками света длительностью 1 с при облучении светом 488/10 нм, а эмиссия регистрировалась с использованием фильтра 505-550 нм. Избегали избыточного освещения. Рассчитывали относительное изменение флуоресценции, по сравнению с исходным уровнем ($\Delta F/F_0$) (Giniatullin et al., 2019).

Уровень внутриклеточного Cl^- . Изменение уровня внутриклеточного Cl^- визуализировали с помощью MEQ (AAT Bioquest). Флуоресценцию MEQ возбуждали светом с длиной волны 360–370 нм и регистрировали с помощью эмиссионного фильтра 420IF. Использовалось дихроичное зеркало 410 нм. Флуоресценция MEQ заметно подавляется в зависимости от концентрации Cl^- без смещения спектров излучения (Biwersi, Verkman, 1991; Chub et al., 2006). Для загрузки красителя в нервные окончания MEQ вводили на 3 часа в отрезанный конец диафрагмального нерва (около 2 мм в длину), используя кончик аспирационной пипетки, заполненный красителем (50 мМ, разведенный в натрий-фосфатном буфере). Молекулы красителя проникают в аксоны и переносятся к

пресинаптическим окончаниям. Затем диафрагмальный нерв удаляли из отсасывающей пипетки путем приложения слабого положительного давления и препараты перфузировали в течение 20 минут физиологическим раствором. Культия нерва была повторно введена во всасывающий электрод, не содержащий красителя, чтобы избежать утечки красителя. Анализ интенсивности флуоресценции MEQ проводили в НМС. Начальная точка флуоресценции нервных окончаний принималась равной 0. Чтобы контролировать фотобликинг MEQ, флуоресценцию регистрировали без стимуляции при тех же условиях освещения, что и при стимуляции нервов полудиафрагм с частотой 20 Гц.

Цитозольный кальций. Oregon Green®488 BAPTA-1 (Thermo Fisher Scientific) – это высокоаффинный клеточно-проницаемый индикатор Ca^{2+} ($K_d \sim 170$ нМ), который позволяет обнаружить небольшие изменения внутриклеточного Ca^{2+} в условиях, близких к состоянию покоя. Краситель возбуждался с помощью коротких (1 с) световых вспышек при 488/10 нм. Эмиссия регистрировалась с помощью полосового фильтра 505-550 нм. Oregon Green®488 BAPTA-1 был растворен в ДМСО и хранился в замороженном виде (не более двух недель). Непосредственно перед использованием добавляли плуроник F-127 для повышения растворимости индикатора в физиологическом солевом растворе. В загрузочном растворе концентрация Oregon Green®488 BAPTA-1 составляла 2 мкМ, а содержание плуроник F-127 и ДМСО были менее 0.03%. Мышцы окрашивались красителем в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем образцы промывали физиологическим солевым раствором в течение 40 мин и проводили измерения флуоресценции в синаптических областях. Значение флуоресценции до добавления 25ГХ было приравнено к 1. Эксперименты по оценке уровня цитозольного кальция в ответ на 25ГХ частично проведены с Кузнецовой Е.А. (Казанский (Приволжский) федеральный университет).

Уровень перекиси водорода. Уровень внеклеточного H_2O_2 оценивали с помощью набора Amplex® Red Hydrogen Peroxide Kit (Molecular Probes), содержащего 10-цетил-3,7-дигидроксифеноксазин (реагент Amplex Red) и

пероксидазу хрена (HRP). В присутствии HRP реагент Amplex Red реагирует с H_2O_2 (стехиометрия 1:1) с образованием стабильного красно-флуоресцентного резорубина, флуоресценция которого возбуждалась при 535/10 нм и регистрировалась при 590 нм. Базальные уровни H_2O_2 определяли при инкубации образцов в физиологическом растворе (общий объем 300 мкл), содержащим Amplex Red (100 мкМ) и HRP (0.2 ед.акт./мл). Во время инкубации раствор постоянно перемешивали с помощью рециркуляционного механизма (общий объем 1.2 мл). Флуоресценцию регистрировали после инкубации собранного раствора (в темноте) при комнатной температуре в течение 50 мин. Калибровку проводили с набором различных концентраций H_2O_2 . Фоновая флуоресценция, полученная в результате реакций, не связанных с H_2O_2 , вычиталась из каждого значения (Kumar et al., 2007). Чтобы оценить 25ГХ-опосредованное увеличение уровня H_2O_2 , реагент Amplex Red и HRP добавляли одновременно с 25ГХ (в течение 20 мин).

Иммунофлуоресценция. Для иммунофлуоресцентного окрашивания мышцы фиксировали 3.7% параформальдегидом в течение 40 минут, пермеабилizировали с 1% Triton X-100 в PBS (натрий-фосфатный буфер) в течение 30 минут и затем инкубировали в блокирующем буфере (2% нормальная козья сыворотка, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween 20 и 1% бычий сывороточный альбумин в PBS) в течение 1 ч (Petrov et al., 2014). Для иммуномечения VDAC и LX-рецепторов фиксированные образцы инкубировали в первичных кроличьих антителах против VDAC (1:400; #V2139, Sigma) и в первичных кроличьих анти-LX β -рецептор антителах (1:500; #ab28479, Abcam), соответственно, при 4°C в течение ночи. В качестве маркера синаптической области использовали конъюгированный с родамином α -бунгаротоксин (α -БТ) (1 нг/мл, Molecular Probes). Воздействие вторичных конъюгированных с AlexaFluor 488 антител против кролика (1:1000, Abcam) длилось 1 час. Все процедуры проводились при комнатной температуре, за исключением инкубации в первичных антителах. Первичные и вторичные антитела разводили в PBS, содержащим 1% BSA, 0.05% Triton X-100 и 0.05%

Tween 20. После каждого этапа процедуры иммуномечения мышцы промывали четыре раза в PBS в течение 1.5 ч. Флуоресцентное окрашивание VDAC не было обнаружено без добавления первичных антител. Флуоресценцию AlexaFluor 488 (родамина) возбуждали светом с длиной волны 480 нм (555 нм), а эмиссию регистрировали с использованием светофильтра 530/15 нм (630/20 нм).

2.4.2 Чувствительные к липидному микроокружению красители

Субъединица В холерного токсина (ХТ-В). Липидные рафты были помечены ХТ-В, конъюгированным с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). ХТ-В специфически связывается с кластером ганглиозидов GM1, в основном содержащиеся в липидных рафтах. Мышцы подвергались воздействию физиологического солевого раствора с ХТ-В (1 мкг/мл) в течение 20 минут; затем образцы промывались в течение 30 минут и визуализировались (Kasimov et al., 2015; Petrov et al., 2017).

BODIPY FL C5-ганглиозид GM1. Для слежения за распределением ганглиозида GM1 в мембранах использовали зелено-флуоресцентный BODIPY FL C5-ганглиозид GM1 в комплексе с бычьим сывороточным альбумином (Molecular Probes) (Kasimov et al., 2016; Bryndina et al., 2018). BODIPY-ганглиозид GM1 разводили в физиологическом растворе. Мышцы инкубировали в течение 20 мин с флуоресцентным ганглиозидом GM1 (0.1 мкМ) и затем промывали в течение 30 мин перед регистрацией флуоресценции.

22NBD-холестерин. 22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3 β -Ol (22NBD-холестерин; Molecular Probes) – это чувствительный к окружающей среде зонд, флуоресценция которого усиливается в ответ на увеличение текучести мембраны, т.е. при изменении фазы мембраны от рафтовой к нерафтовой фракции. Мышцы инкубировали в течение 20 мин с 22NBD-холестерином в концентрации 0.2 мкМ в физиологическом растворе, а затем перфузировали в течение 30 мин физиологическим раствором без красителя (Kasimov et al., 2016; Petrov et al., 2017).

F2N12S. (A35137T, ThermoFisher) – это фиолетовый флуоресцентный зонд для детекции снижения упорядоченности мембран и (или) асимметрии плазматической мембраны. Этот зонд избирательно связывается с внешним слоем плазматических мембран (Oncul et al., 2010). Препарат подвергали воздействию *F2N12S* (0.2 мкМ) в течение 5 мин, затем кратковременно перфузировали физиологическим раствором без красителя в течение 5 мин. Флуоресценцию *F2N12S* регистрировали в течение 20 мин, используя возбуждение при свете 405/15 нм и детекцию эмиссии при 510/30 нм (зеленый канал) и 585/30 нм (красный канал). Рассчитывали соотношение флуоресценции красного/зеленого каналов. Уменьшение упорядоченности и (или) асимметрии мембраны приводит к уменьшению соотношения красного/зеленого каналов (Oncul et al., 2010; Petrov et al., 2019).

Поглощение церамида и холестерина. Для оценки встраивания церамида в плазматические и внутриклеточные мембраны использовали зелено-флуоресцентный BODIPYTM FL C5-церамид в комплексе с бычьим сывороточным альбумином (ThermoFisher) (Petrov et al., 2019). BODIPY-церамид растворяли в физиологическом растворе (конечная концентрация 0.1 мкМ). Препараты перфузировали в течение 1^{1/2} ч раствором, содержащим BODIPY-церамид (1 мл·мин⁻¹), а затем промывали (при скорости перфузии 5 мл·мин⁻¹) в течение 1^{1/2} ч физиологическим раствором без красителя для удаления несвязанного флуоресцентного церамида. Для проверки способности поглощать холестерин и 25ГХ использовали 25-(C4 TopFluor®) 25-ОН-холестерин (BODIPY-холестерин; Avanti). Этот зонд имеет сходное с холестерином поведение (распределение в мембране, внутриклеточный трафик и хранение) и перемещается оксистерин-связывающими белками (Holtta-Vuori et al., 2008; Jansen et al., 2011). Мышцы подвергались воздействию в течение 1.5 ч с 25-(C4 TopFluor) 25-ОН-холестерина (1 мкМ), затем краситель отмывался в течение 1^{1/2} ч перед регистрацией флуоресценции. Флуоресценция BODIPY (C4 TopFluor) возбуждалась светом

488/10 нм, а эмиссия регистрировалась с помощью полосового фильтра 505-545 нм.

Анализ перекисного окисления липидов. Сенсор Image-iT (реагент BODIPY 581/591 C11) использовался в качестве ратиометрического индикатора перекисного окисления липидов (Molecular Probes). При перекисном окислении мембранных липидов флуоресценция iT-сенсора изменяется от красного (590 нм) к зеленому (510 нм), что свидетельствует об окислении мембранных липидов. Мышцы инкубировали в красителе (10 мкМ) в течение 30 мин, промывали физиологическим раствором в течение 30 мин. Затем регистрировали изображения с использованием эмиссионных фильтров для флуоресцеина изотиоцианата и Texas Red. Исходя из интенсивности зеленой и красной флуоресценции рассчитывали соотношение между красным и зеленым сигналами (Giniatullin et al., 2019; Oncul et al., 2010).

α-бунгаротоксин. Мечение родамин-конъюгированным α-БТ, специфическим маркером постсинаптических нХР, позволяло идентифицировать синаптическую область. α-БТ (100 нг/мл, ThermoFisher) добавляли в ванночку с раствором на 15 минут. α-БТ детектировали с помощью возбуждающего фильтра 555/15 нм и полосового эмиссионного фильтра 630/20 нм. Флуоресценция в синапсе определялась по свечению α-БТ, внесинаптический сигнал оценивали на площади (~200 мкм²) за пределами синаптической мембраны. Флуоресценция ХТ-В, BODIPY-ганглиозида, BODIPY-церамида и 22-NBD-холестерина возбуждалась светом 488/10 нм, эмиссия регистрировалась с использованием полосовых фильтров (505-545 нм или 510-590 нм).

2.4.3 Анализ уровня холина/ацетилхолина во внеклеточном растворе

Набор Amplex® Red Acetylcholine Assay Kit (Molecular Probes) использовали для оценки холина/АХ (ацетилхолин), гидролизуемого эндогенной ацетилхолинэстеразой (АХЭ) в диафрагме мышцы. Свежевыделенные мышцы инкубировали в течение короткого периода времени (15 мин) в физиологическом

растворе (0.4 мл), содержащим холиноксидазу (ЕС 1.1.3.17, 1 ед.акт/мл), HRP (ЕС 1.11.1.7, 2 ед.акт/мл) и 400 мкМ Amplex® Red при 37°C. Раствор непрерывно перемешивали с помощью рециркуляционного механизма. Подход основан на измерении холина, образуемого в результате гидролиза АХ эндогенной АХЭ в синаптической щели. Холиноксидаза расщепляет холин до бетаина и H_2O_2 ; затем HRP, утилизируя H_2O_2 , катализирует окисление реагента Amplex® Red до стабильного флуоресцентного соединения резорруфина. Кроме того, общие внеклеточные уровни АХ оценивали в тех же условиях, но с добавлением экзогенной АХЭ (1 ед.акт/мл; Е.С. 3.1.1.7.) в реактивную смесь. Экзогенная АХЭ разрушает остаточный негидролизированный АХ (часть, которого не подвергается ферментативной деградации эндогенной АХЭ). После 15-минутной инкубации раствор из ванночки собирали и хранили в темноте в течение 45 минут перед измерением конечного сигнала резорруфина (спектры возбуждения – 535 нм и эмиссии – 590 нм). Для каждого измерения мы вносили поправку на неспецифический сигнал, вызванный эндогенной H_2O_2 из-за реакций, отличных от окисления холина. Уровень холина определяли по калибровочным кривым, которые строили по флуоресценции при 590 нм в зависимости от возрастающих концентраций АХ в присутствии смеси реагентов (плюс экзогенная АХЭ 1 ед.акт./мл). В некоторых экспериментах для насыщения мембраны холином мышцы подвергались воздействию комплекса МβЦД-холестерин (5 мМ) в течение 15 минут, а затем промывались перед измерением холина (Kasimov et al., 2017; Petrov et al., 2017).

2.5 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Origin Pro. Исключение выбросов не проводилось. Данные представлены как среднее±стандартное отклонение; размер выборки (n – количество независимых экспериментов на отдельных мышцах отдельных мышей) и количество проанализированных мышечных волокон указаны в надписях к каждому рисунку. Статистическая значимость различий между средними значениями оценивалась с

помощью параметрических (t-критерий Стьюдента, дисперсионный анализ ANOVA с коррекцией методом Бонферрони) и непараметрических тестов (U-критерий Манна-Уитни). Выбор теста происходил на основании оценки нормальности распределения и вариации дисперсии. Статистическая значимость определялась как $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ и $***P < 0.001$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 25ГХ и синаптическая передача

3.1.1 Влияние 25ГХ на электрофизиологические параметры

Влияние 25ГХ на высвобождение нейромедиатора. Мы оценили влияние 25ГХ в различных концентрациях (0.1, 1 и 10 мкМ) на постсинаптические сигналы, возникающие в результате квантового выброса нейромедиатора. Инкубация 25ГХ (0.1-10 мкМ) не влияла на амплитуду МПКП и их временные характеристики, что свидетельствует об отсутствии изменений свойств постсинаптических нХР (рис. 2А). Мембранный потенциал покоя в данных условиях был стабилен. Частота МПКП также не изменилась, за исключением ее незначительного снижения в ответ на 25ГХ в концентрации 10 мкМ (рис. 3А). Эти данные свидетельствуют о том, что только высокая концентрация 25ГХ (10 мкМ) может негативно модулировать спонтанное высвобождение АХ.

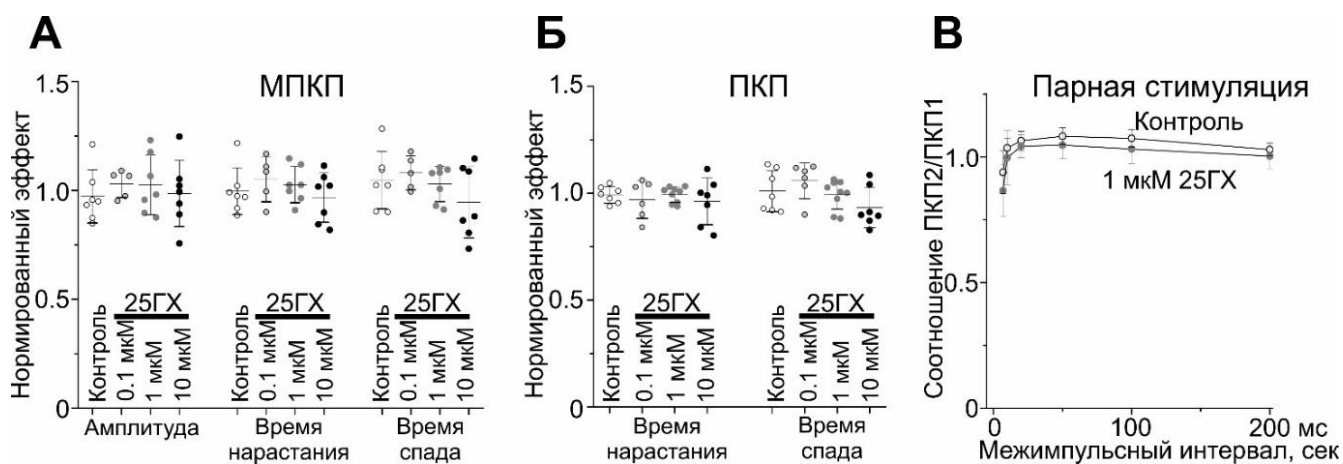


Рис. 2. Влияние 25ГХ на параметры постсинаптических потенциалов. А – амплитудно-временные параметры МПКП. Б – временные параметры ПКП при стимуляции с частотой 0.2 Гц. А, Б: ось Y – нормированный эффект 25ГХ, исходное значение до добавления 25ГХ установлено как 1.0. Б – изменения амплитуды ПКП в результате парной стимуляции в контрольных и обработанных 25ГХ НМС. В – соотношение амплитуд ПКП, вызванных парными импульсами (ПКП2/ПКП1), построенные в зависимости от межимпульсных интервалов. n=9 мышей на группу.

Вызванное высвобождение нейромедиатора. ПКП вызывали низкочастотной стимуляцией нерва (0.2 Гц), которая высвобождает СВ,

принадлежащих к готовому к высвобождению пулу. Оценка квантового состава (путем деления ПКП на амплитуду МПКП) показала, что 25ГХ (0.1-10 мкМ) не изменяет вызванный выброс нейромедиатора при низкой частоте стимуляции нерва (рис. 3Б). Также 25ГХ не влиял на параметры ПКП (при 0.2 Гц) (рис. 2Б). Соответственно, 25ГХ не влиял на экзоцитоз СВ в ответ на одиночные стимулы. Аналогично, 25ГХ в концентрации 1 мкМ не изменял угнетение и облегчение при парной стимуляции, что свидетельствует об отсутствии выраженного изменения вероятности экзоцитоза (рис. 2В).

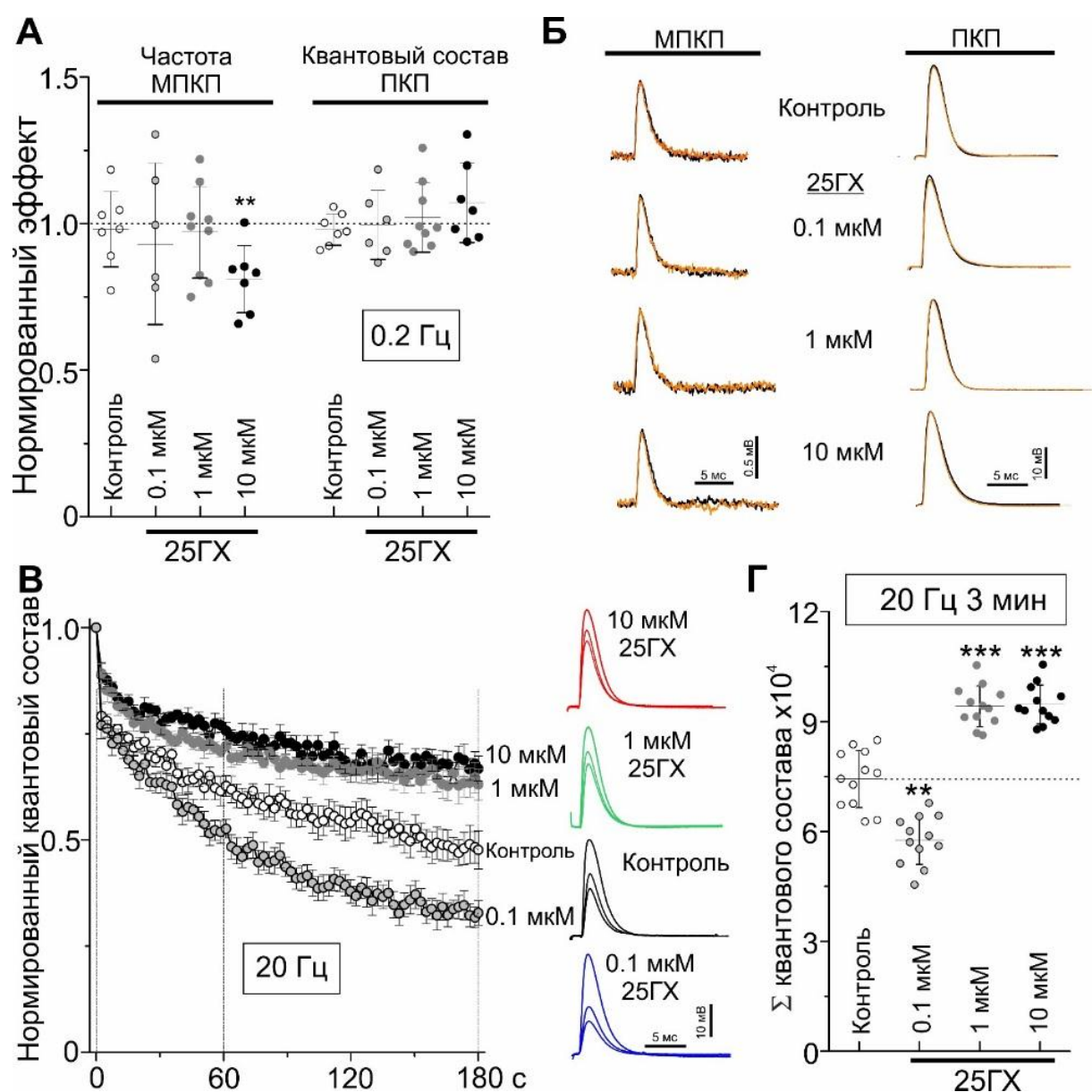


Рис. 3. Влияние 25ГХ на высвобождение нейромедиатора. А – концентрационно-зависимое влияние 25ГХ на частоту МПКП и квантовый состав ПКП в отдельных синапсах. Ось Y – нормированный эффект 25ГХ (1.0 –

значение непосредственно перед аппликацией 25ГХ). $n=6-9$ на каждую группу. Б – примеры МПКП и ПКП до и через 20 мин после аппликации 25ГХ (оранжевый). В – нормированная кривая изменения квантового состава ПКП в течение 3-минутной стимуляции с частотой 20 Гц до и после добавления 25ГХ. $n=12$ на каждую группу. Справа ПКП записанные на 0, 60, 180 с стимуляции (20 Гц). Ось Y – квантовый состав относительно начального значения (1.0), полученного непосредственно перед началом стимуляции. Г – суммарное количество квантов, высвобожденных при стимуляции с частотой 20 Гц в течение 3 мин. А, В и Г – результаты выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. $n=6-12$ на группу. $**P<0.01$, $***P<0.001$, по сравнению с контролем.

Высвобождение нейромедиатора при стимуляции с частотой 20 Гц. По сравнению с низкочастотной стимуляцией, длительная активность двигательного нерва на более высоких частотах вызывает мобилизацию СВ из рециклирующего и резервного пулов. В таких условиях эффективность нейротрансмиссии зависит от доставки СВ к сайтам экзоцитоза. При стимуляции с частотой 20 Гц квантовый состав ПКП быстро уменьшался, а затем снижался медленнее, достигая значений $47.6 \pm 14.2\%$ ($p<0.001$, $n=12$) к 3 минуте стимуляции (рис. 3В). Такое изменение квантового состава отражает доставку СВ к активной зоне после быстрого истощения готового к высвобождению пула.

При низкой концентрации 25ГХ (0.1 мкМ) усиливалась депрессия квантового высвобождения во время активности с частотой 20 Гц. В частности, в этих условиях скорость снижения квантового состава была заметно выше, начиная с ~ 30 с после стимуляции (рис. 3В). В результате, оценка общего количества квантов, высвобожденных за 3 мин при частоте 20 Гц, показала, что 25ГХ в концентрации 0.1 мкМ снижает высвобождение нейромедиатора на $\sim 23\%$ ($p<0.01$; $n=12$) (рис. 3Г). Напротив, более высокие концентрации (1 и 10 мкМ) 25ГХ уменьшают депрессию квантового состава ПКП во время стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 3С), тем самым вызывая увеличение общего количества квантов ($\sim 27\%$; $p<0.001$, $n=12$ для каждой группы), выделяемых в течение 3 мин стимуляции (рис. 3Г). Таким образом, 25ГХ может модулировать высвобождение нейромедиатора при умеренно-частотной активности в концентрационно-

зависимой манере: низкая концентрация (0.1 мкМ) уменьшает высвобождение АХ, более высокие концентрации (1 и 10 мкМ) увеличивают его.

3.1.2 Влияние 25ГХ на кинетику экзоцитоза FM1-43

Для оценки влияния 25ГХ на экзоцитоз использовали краситель FM1-43. Терминали двигательных нервов первоначально загружали красителем FM1-43 и после 40-минутного периода покоя нерв повторно стимулировали с частотой 20 Гц, чтобы вызвать высвобождение FM1-43 из СВ в процессе экзоцитоза (выгрузка) (рис. 4А и Б). В низких концентрациях (0.1 и 0.01 мкМ) 25ГХ снижал скорость выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 4А), и через 3 мин после стимуляции потеря красителя из нервных терминалей была ниже на $43 \pm 8\%$ ($p < 0.001$, $n = 15$) и $57 \pm 4\%$ ($p < 0.001$, $n = 15$), соответственно, по сравнению с контролем (рис. 4В). Напротив, более высокие концентрации (1 и 10 мкМ) 25ГХ ускоряли выгрузку FM1-43 (рис. 4Б), и через 3 мин после стимуляции потеря FM1-43 была выше на $33 \pm 8\%$ ($p < 0.001$, $n = 15$) и $44 \pm 6\%$ ($p < 0.001$, $n = 15$), соответственно, по сравнению с контролем (рис. 4В).

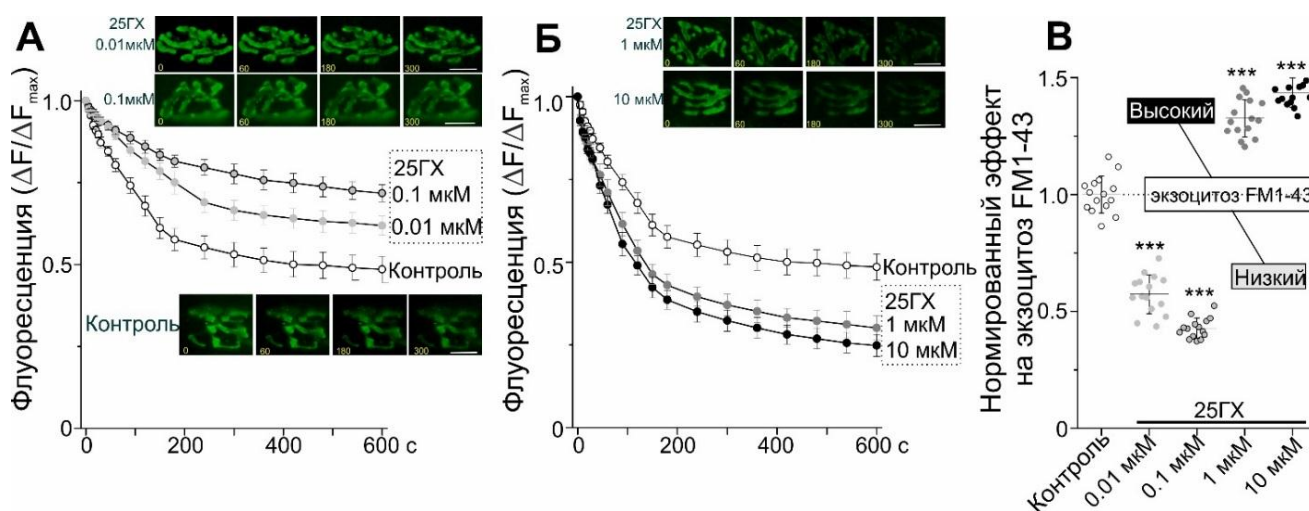


Рис. 4. Влияние 25ГХ на выгрузку красителя FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц. А и Б – кинетика потери красителя FM1-43 во время стимуляции двигательного нерва. После 20-минутного воздействия низких (А) или высоких (Б) концентраций 25ГХ НМС, предварительно загруженные FM1-43, стимулировали (20 Гц) для массивного экзоцитоза СВ, что приводило к высвобождению FM1-43 вместе с нейромедиатором. Снизу и сверху от кривых характерные изображения НМС, загруженных FM1-43, непосредственно перед

стимуляцией (0) и в разные временные точки (60, 180, 300 с) во время стимуляции. Масштабные линейки – 10 мкм. Временной ход выгрузки FM1-43 в контроле показан на А и Б. А-Б: ось Y – интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\max}$) относительно значения перед началом стимуляции с частотой 20 Гц. Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; n=13-15 для каждой группы. В – влияние 25ГХ на выгрузку красителя FM1-43, высвобожденного во время 180-секундной стимуляции с частотой 20 Гц, относительно потери красителя в контроле за тот же период стимуляции. Значения нормированы относительно контроля. Более низкие концентрации 25ГХ снижали относительную выгрузку красителя за 3 мин стимуляции, тогда как более высокие концентрации увеличивали. *** $P < 0.001$, 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. Следует обратить внимание, что эффекты 25ГХ были более четко выражены в экспериментах по выгрузке FM1-43, по сравнению с регистрацией постсинаптических потенциалов. Обработка препаратов 25ГХ в концентрациях 0.01-10 мкМ (без стимуляции, в течение 20 мин в период покоя), предварительно загруженных FM1-43, не влияла на флуоресценцию терминалей двигательных нервов (по сравнению с контролем), что указывает на отсутствие значительных изменений в потере FM1-43 вследствие спонтанного высвобождения (рис.5).

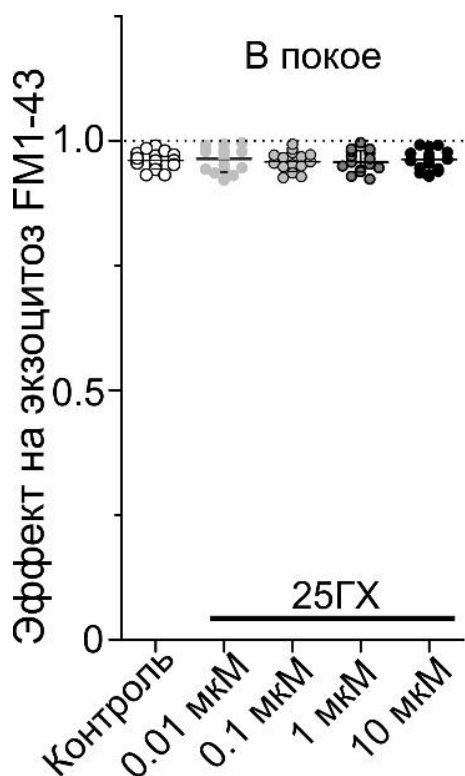


Рис.5. Влияние 25ГХ на спонтанную выгрузку FM1-43 (без стимуляции). $n=15$ для каждой группы. Изменение флуоресценции FM1-43 в растворе с различными концентрациями 25ГХ и без 25ГХ после аппликации в течение 20 мин. Ось Y – нормированный эффект, где 1.0 – интенсивность свечения до экспозиции в растворе с 25ГХ и без него.

3.1.3 Зависимость эффектов 25ГХ от глутаматных NMDA- и LX-рецепторов

В базальном состоянии концентрация 25ГХ в плазме и тканях очень низкая и может увеличиваться до 1 мкМ во время воспалительных реакций, поэтому в данной работе внимание было сосредоточено на изучении влияния 25ГХ в концентрации 1 мкМ на динамику экзоцитоза СВ при стимуляции с частотой 20 Гц. 25ГХ может модулировать глутаматные NMDA-рецепторы в ЦНС (Linsenhardt et al., 2014) и является мощным агонистом ядерных LX-рецепторов (Cyster et al., 2014). Последние также могут присутствовать в плазматической мембране в эндотелиальных клетках и тромбоцитах (Ishikawa et al., 2013; Unsworth et al., 2018). Считается, что и NMDA-, и LX-рецепторы необходимы для стабильности и функционирования НМС (Bigini et al., 2010; Personius et al., 2016; Kasimov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2019).

GSK 2033, селективный антагонист LX-рецепторов, не влиял на скорость выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц, но устранял 25ГХ-опосредованное усиление выгрузки FM1-43 (рис. 6А). Более того, в этих условиях 25ГХ снижал скорость потери красителя при активности с частотой 20 Гц (рис.

6А). D-AP5, специфический блокатор NMDA-рецепторов, немного увеличивал выгрузку красителя. В присутствии антагониста NMDA-рецепторов 25ГХ дополнительно ускорял скорость потери FM1-43 (рис. 6Б). Таким образом, потенцирующий выгрузку эффект 25ГХ в НМС может зависеть от LX-, но не от NMDA-рецепторов.

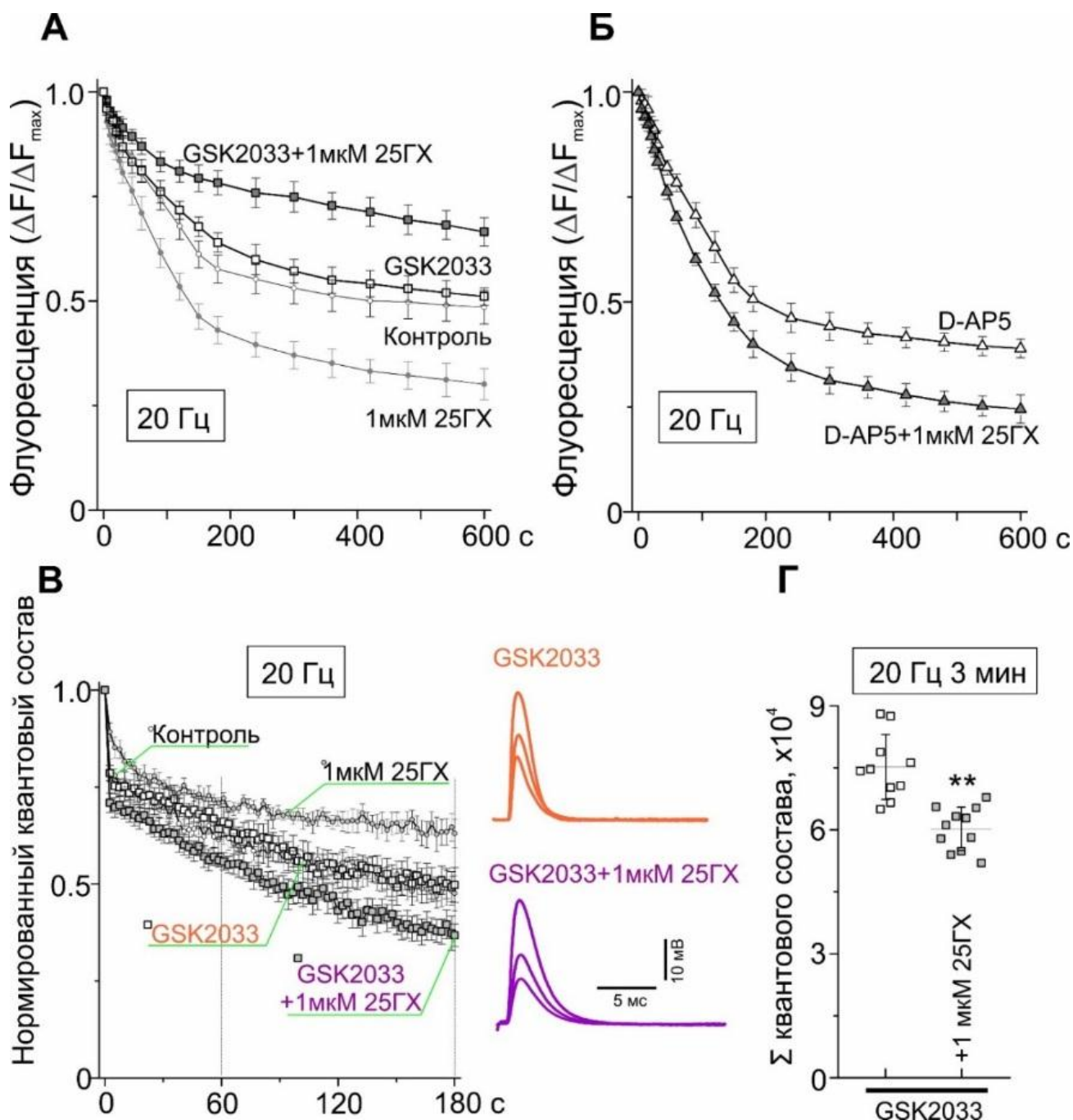


Рис. 6. Участие LX- и NMDA-рецепторов в реализации эффекта 25ГХ (1 мкМ) на экзоцитоз при частоте 20 Гц. А, Б – временной ход выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц. Показано влияние антагонистов LX- (GSK2033) и NMDA-рецепторов (D-AP5), а также влияние 25ГХ в присутствии этих

антагонистов на выгрузку FM1-43. Ось Y – относительная флуоресценция ($\Delta F/\Delta F_{\text{макс}}$), где значение до начала 20 Гц стимуляции установлено как 1.0. $n=14-15$ для каждой кривой. Контрольная кривая и действие 25ГХ (из рис. 3) показаны на А. В – снижение квантового состава при стимуляции (20 Гц). Показана динамика в присутствии антагониста LХ-рецепторов отдельно и в комбинации с 25ГХ. $n=10-11$ для каждой кривой. Справа показаны примеры ПКП на 0, 60, 180 с стимуляции с частотой 20 Гц. Ось Y – нормированный квантовый состав, где исходное значение непосредственно перед стимуляцией принято за 1.0. Кроме того, указаны контрольные кривые и кривые при аппликации 25ГХ (из рис. 3В). Г – кумулятивные кривые квантового состава, показывающие общее количество квантов, высвобожденных за 3 мин стимуляции с частотой 20 Гц (из В). $**P<0.01$, по сравнению с контролем. На рисунках А-Г данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Электрофизиологические эксперименты подтвердили роль LХ-рецепторов в опосредовании эффекта 25ГХ (1 мкМ) на высвобождение нейромедиатора в ответ на стимуляцию с частотой 20 Гц. В соответствии с нашими предыдущими данными (Mukhutdinova et al., 2019) антагонист LХ-рецепторов не изменял параметры МПКП и ПКП (при 0.2 Гц) (рис. 7), а также динамику снижения квантового состава при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 6В). Ослабляющий эффект 25ГХ на депрессию секреции квантов устранялся в присутствии антагониста LХ-рецепторов при стимуляции с частотой 20 Гц. Более того, при ингибировании LХ-рецепторов 25ГХ усиливал снижение квантового состава во время стимуляции (рис. 6В), вызывая снижение общего количества квантов, высвобождаемых к 3 минуте тетануса (рис. 6Г). Следовательно, при блокировании LХ-рецепторов эффект 25ГХ на нейропередачу был обратным и напоминал эффект более низких концентраций 25ГХ.

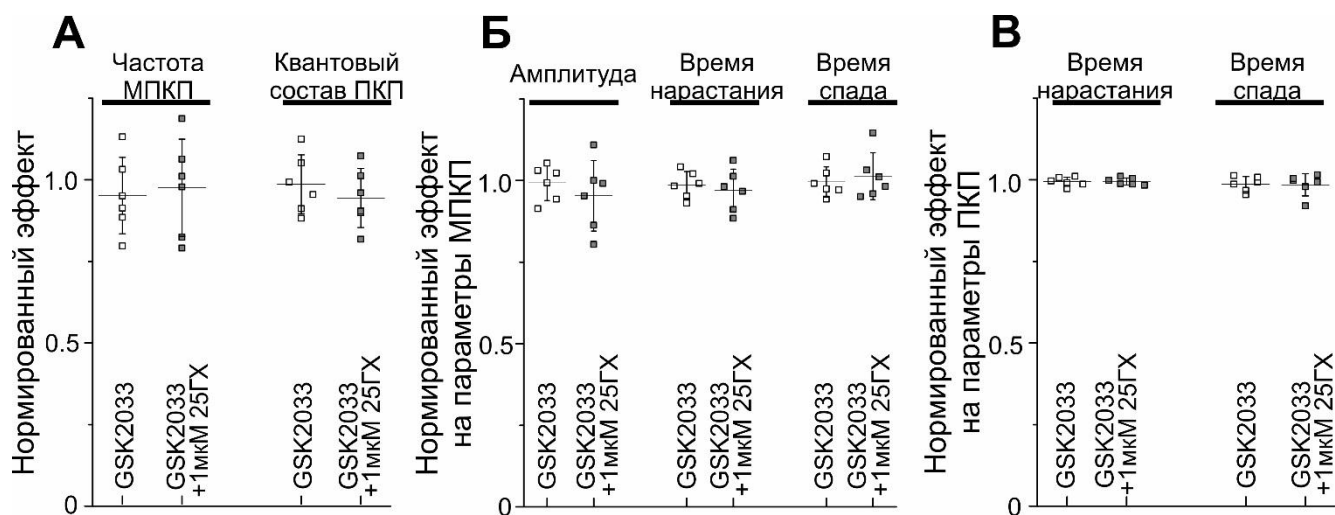


Рис. 7. Влияние ингибитора LX-рецепторов (GSK2033) отдельно и в комбинации с 25ГХ (1 мкМ). А – влияние на частоту МПКП и квантовый состав ПКП. Б, В – влияние на параметры МПКП и ПКП. А-В: ось Y – нормированный эффект, где значение до аппликации веществ (GSK2033 или 25ГХ+GSK2033) принимается за 1.0.

3.1.4 Роль липидных рафтов в эффектах 25ГХ и локализация LX-рецепторов в НМС

Существует две изоформы LX-рецепторов – α и β . LX α -рецепторы в основном экспрессируются в печени, макрофагах, почках, жировой ткани и надпочечниках, тогда как LX β -рецепторы экспрессируются повсеместно (Wang, Tontonoz, 2018). Кроме того, было обнаружено, что мыши с нокаутом LX β -рецепторов страдают от БАС-подобной патологии, связанной с потерей НМС (Bigini et al., 2010). Принимая во внимание эти наблюдения, была оценена иммуноэкспрессия LX β -рецепторов в НМС. В НМС наблюдались LX β -рецептор-позитивные флуоресцентные точки, что указывает на локализацию этих рецепторов в плазматических мембранах (верхние изображения на рис. 8А). Это согласуется с расположением неядерных LX β -рецепторов в богатых холестерином липидных рафтах, наблюдаемых в сосудистых эндотелиальных клетках (Ishikawa et al., 2013). Действительно, предварительная обработка препаратом, снижающий уровень холестерина, МВЦД в низкой концентрации (0.1 мМ) нарушала картину точечного окрашивания, размывая флуоресцентный сигнал (нижние изображения на рис. 8А). Мечение маркером липидных рафтов

ХТ-В также показало точечное окрашивание в НМС, а МβЦД заметно уменьшал окрашивание ХТ-В (рис. 8Б). Это согласуется с нашими предыдущими данными, указывающими на способность МβЦД (0.1 мМ) частично дестабилизировать липидные рафты в НМС грызунов (Petrov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2018). Таким образом, LXβ-рецептор может находиться в липидных рафтах пресинаптической мембраны в НМС.

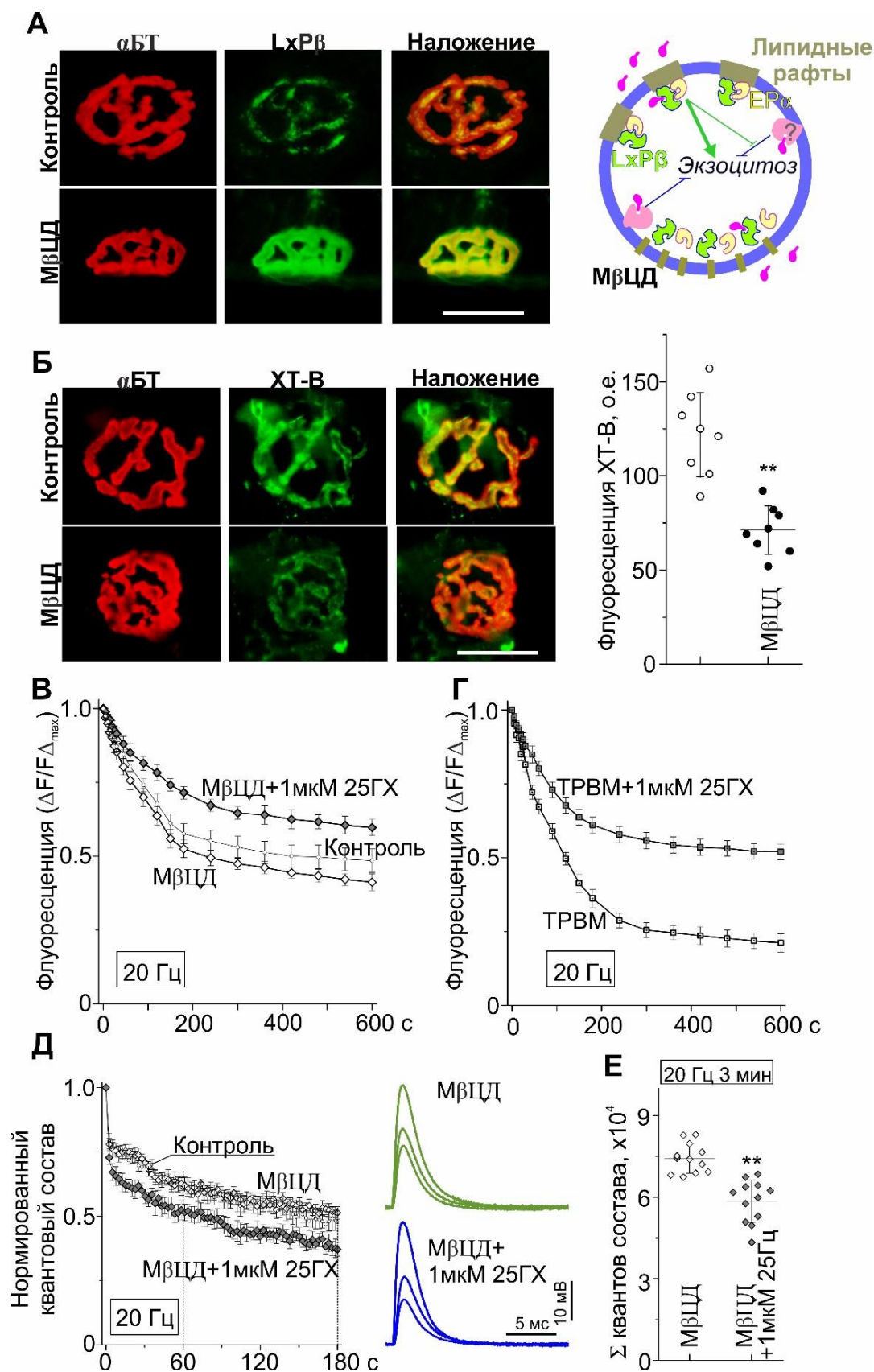


Рис. 8. Роль липидных рафтов и ЭРα в эффекте 25ГХ (1 мкМ), а также локализация LxPβ-рецепторов в НМС. А – иммулокализация LxPβ-рецепторов в НМС в контрольных и МβЦД-обработанных препаратах. Показана флуоресценция образцов, меченных родамин-конъюгированным α-БТ (красный –

синаптический маркер) и антителами против $LX\beta$ -рецепторов (зеленый). Б – окрашивание липидных рафтов в НМС контрольных мышц и мышц, обработанных МВЦД. Показана флуоресценция α -БТ (красный) и ХТ-В (зеленый – маркер липидных рафтов). Справа – количественная оценка флуоресценции ХТ-В (в о.е.). $n=8$ на группу (214 и 221 НМС для контроля и группы МВЦД, соответственно). А, Б: масштабная линейка – 20 мкм. В, Г – влияние 25ГХ на кинетику выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в препаратах, предварительно обработанных МВЦД (В) и ингибитором ЭР α ТВРМ (Г). Контрольная кривая (из рис. 4А) показана на В. Ось Y – относительная интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\text{макс}}$). $n=13-14$ для каждой группы. Д, Е – влияние 25ГХ на квантовую секрецию в препаратах, обработанных МВЦД. Д – изменение нормированного квантового состава при стимуляции с частотой 20 Гц. Справа – характерные ПКП на 0, 60, 180 с стимуляции с частотой 20 Гц. Ось Y – квантовый состав ПКП, где исходное значение перед стимуляцией установлено как 1.0. Контрольная кривая (из рис. 3В) показана на Д. Е – суммарный квантовый состав, указывающий на общее количество квантов, высвобожденных при стимуляции с частотой 20 Гц в течение 3 мин (из Д). Б-Е – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; Б, Е: $**P<0.01$, по сравнению с контролем. В верхней части справа показана примерная схема, иллюстрирующая расположение LX -рецепторов в липидных рафтах и их взаимодействие с ЭР α , также показаны последствия предварительной обработки МВЦД.

3.1.5 Значение липидных рафтов в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ

Чтобы проверить значение липидных рафтов в реализации эффектов 25ГХ, использовали агент МВЦД (0.1 мМ), оказывающий разрушающее действие на рафты. В соответствии с нашими предыдущими данными (Kasimov et al., 2015) предварительная обработка МВЦД (0.1 мМ) сама по себе не оказывала заметного влияния на скорость потери FM1-43 (рис. 8В). В то же время эта предварительная обработка предотвращала 25ГХ-зависимое (1 мкМ) усиление выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 8В).

Неядерные LX -рецепторы могут непосредственно активировать ЭР α в липидных рафтах эндотелиальных клеток (Ishikawa et al., 2013). ТВРМ, селективный ингибитор ЭР α , значительно увеличивал скорость выгрузки красителя, и он, как и предварительная обработка МВЦД, предотвращал 25ГХ-опосредованное увеличение скорости выгрузки FM1-43 (рис. 8Г). Можно

предположить, что целостность липидных рафтов и активация ЭР α необходимы для способности 25ГХ потенцировать вовлечение содержащих краситель СВ в экзоцитоз. Отметим, что в условиях ингибирования LX-рецепторов как после предварительного воздействия МВЦД, так и в присутствии ингибитора ЭР α , 25ГХ подавлял выгрузку FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц, по сравнению с соответствующими контрольными группами. В совокупности эти данные подтверждают идею о том, что 25ГХ в концентрации 1 мкМ активирует LX-рецепторы, которые могут взаимодействовать с ЭР α в липидных рафтах.

Микроэлектродная регистрация постсинаптических потенциалов, как и эксперименты по выгрузке FM1-43, указывает на зависимость стимулирующего эффекта 25ГХ от состояния липидного рафта. Действительно, предварительная обработка МВЦД существенно не изменяла динамику квантового выброса при частоте 20 Гц, но предотвращала способность 25ГХ ускорять высвобождение нейромедиатора (рис. 8Д и Е). Более того, после воздействия МВЦД 25ГХ вызывал более заметное снижение содержания квантов ПКП при частоте 20 Гц и уменьшал количество квантов, высвобождаемых в течение 3 мин стимуляции (рис. 8Д и Е).

3.1.6 Влияние 25ГХ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и роль Ca^{2+} в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ

Ключевые этапы рециклирования СВ, включая мобилизацию СВ, зависят от внутриклеточного Ca^{2+} и активности Ca^{2+} -зависимых ферментов (Rizzoli, 2014). Для проверки влияния 25ГХ (1 мкМ) на цитозольный Ca^{2+} использовали индикатор Ca^{2+} Oregon Green BAPTA 1. Добавление 25ГХ вызывало транзиторное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} с пиковым уровнем (на 1½ мин), за которым следовало возвращение к базальному уровню в течение 7-9 мин (рис. 9А). Этот подъем $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ был частично ослаблен антагонистом LX-рецепторов и не изменился в присутствии блокатора NMDA-рецепторов (рис. 9Б). 25ГХ может активировать G-белок-связанный рецептор GPR183 (известный как EBI2), который экспрессируется в основном в иммунных клетках и необходим для

управления миграцией В-клеток и дендритных клеток (Cyster et al., 2014). NIBR 189, селективный антагонист GPR183, не изменял эффект 25ГХ на внутриклеточный уровень Ca^{2+} (рис. 9Б). Таким образом, 25ГХ-опосредованное увеличение цитозольного Ca^{2+} может частично происходить из-за активации LХ-рецепторов.

Приток внеклеточного Ca^{2+} через кальциевые каналы плазматической мембраны и высвобождение Ca^{2+} из ЭПР через рианодиновые рецепторы (Ри-рецептор) или инозитолтрифосфатные рецепторы (ИТФ-рецептор) являются основными путями повышения цитозольного Ca^{2+} в синапсе. 25ГХ-индуцированное увеличение цитозольного Ca^{2+} сохранялось в растворе без Ca^{2+} , содержащим внеклеточный буфер Ca^{2+} (EGTA), а также в присутствии блокатора Ри-рецепторов дантролена (рис. 9В). ТМВ-8, ингибитор ИТФ-рецепторов, предотвращал увеличение цитозольного Ca^{2+} в ответ на аппликацию 25ГХ (рис. 9В). Таким образом, 25ГХ может провоцировать высвобождение Ca^{2+} из ЭПР через ИТФ-рецепторы.

1) в синаптической зоне. Показаны эффекты 25ГХ в контроле и в условиях ингибирования NMDA- (D-AP-5), LХ-рецепторов (GSK2033), GPR183 (NIBR189), Ри-рецепторов (дантролен), ИТФ-рецепторов (ТМВ8), а также удаления внеклеточного Ca^{2+} (физиологический солевой раствор без Ca^{2+} , содержащий внеклеточный Ca^{2+} буфер EGTA). В верхнем правом углу показаны изображения, иллюстрирующие изменения флуоресценции в синаптической области в ответ на обычный раствор (контроль) или раствор с 25ГХ. Также показаны флуоресцентные изображения, полученные до аппликации (0'); масштабная линейка – 10 мкм. На схеме указаны молекулярные мишени для используемых фармакологических веществ. А-В: ось Y – нормированная флуоресценция, где значение, соответствующее 1 мин (до аппликации 25ГХ или обычного раствора), принимается за 1.0. Момент начала аппликации 25ГХ (или контрольного раствора) указан стрелкой. n=10-11 для каждой кривой. Г-Е – временной ход выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц. Графики иллюстрируют влияние 25ГХ в условиях внутриклеточного хелатирования Ca^{2+} медленным буфером EGTA-АМ (Г) и ингибирования ПКС ингибиторным пептидом (Д) или хелеритрином (Е). n=14 для каждой кривой. Контрольная кривая (из рис. 4А) показана пунктирной линией. Ось Y – относительная интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\text{макс}}$). А-Е – данные выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

3.1.7 Роль внутриклеточного Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы С в стимулирующем экзоцитоз эффекте 25ГХ

Для проверки роли цитозольного Ca^{2+} в эффекте 25ГХ (1 мкМ) на экзоцитоз предварительно загруженные FM1-43 нервно-мышечные препараты загружали медленным внутриклеточным Ca^{2+} буфером EGTA-АМ. В контроле хелатирование цитозольного Ca^{2+} существенно не изменяло динамику выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц. Это согласуется с данными о том, что в отличие от быстрого цитозольного Ca^{2+} буфера ВАРТА-АМ, EGTA-АМ не влияет на высвобождение нейромедиатора в ответ на высокочастотную стимуляцию в НМС мышей (Miteva et al., 2020). Предварительная обработка EGTA-АМ устраняла 25ГХ-опосредованное увеличение скорости выгрузки FM1-43. В этих условиях 25ГХ не оказывал заметного влияния на выгрузку красителя (рис. 9Г). Таким образом, увеличение цитозольного Ca^{2+} может способствовать 25ГХ-зависимому усилению мобилизации СВ.

Повышение цитозольного Ca^{2+} может влиять на нейропередачу через активацию сигнальных ферментов. Учитывая, что 25ГХ-индуцированное повышение Ca^{2+} зависело от активации ИТФ-рецепторов, мы проверили участие ПКС в эффекте 25ГХ. Мембранопроницаемый пептидный ингибитор Ca^{2+} и фосфолипид-зависимой ПКС сам по себе не влиял на выгрузку FM1-43, но полностью предотвращал эффект 25ГХ на потерю красителя при частоте 20 Гц (рис. 9Д). Аналогично, хелеритрин хлорид, мощный изоформ-неспецифический ингибитор ПКС, предотвращал 25ГХ-опосредованные изменения в выгрузке FM1-43 (рис. 9Е). Таким образом, 25ГХ может модулировать участие СВ в экзоцитозе Ca^{2+} и ПКС-зависимым образом.

Отметим, что отсутствие собственных эффектов ингибиторов ПКС свидетельствует об отсутствии выраженной ПКС-опосредованной регуляции мобилизации СВ в базальных условиях в НМС мышей. В то же время ингибирование ПКС не влияло на KCl-индуцированную выгрузку FM1-43 в НМС лягушки (Petrov et al., 2015).

3.1.8 Сигнальные молекулы, участвующие в эффекте 25ГХ на выгрузку FM1-43

В целом, приведенные выше данные свидетельствуют о том, что 25ГХ (1 мкМ) увеличивает скорость экзоцитоза СВ через активацию LX-рецепторов, которые стимулируют нисходящий путь, приводящий к высвобождению Ca^{2+} из ЭПР, а затем к активации ПКС. Далее был проведен ряд экспериментов для выявления сигнальных молекул, которые могут образовать мост между LX-рецепторами и ПКС.

Потенциально, комплекс LX-рецептор/ЭР α на плазматической мембране может влиять на сигнальный путь G_i -белков, поскольку мембранно-ассоциированный ЭР α может напрямую связывать и активировать G_i -белок (Kumar et al., 2007). Фармакологическое ингибирование G_i -белков путем предварительной обработки коклюшным токсином не повлияло на кинетику выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц, но отменило 25ГХ-

опосредованное увеличение скорости потери FM1-43 (рис. 10А). Таким образом, LХ-рецептор-зависимая активация G_i -белков может быть вовлечена в стимулирующий экзоцитоз эффект 25ГХ.

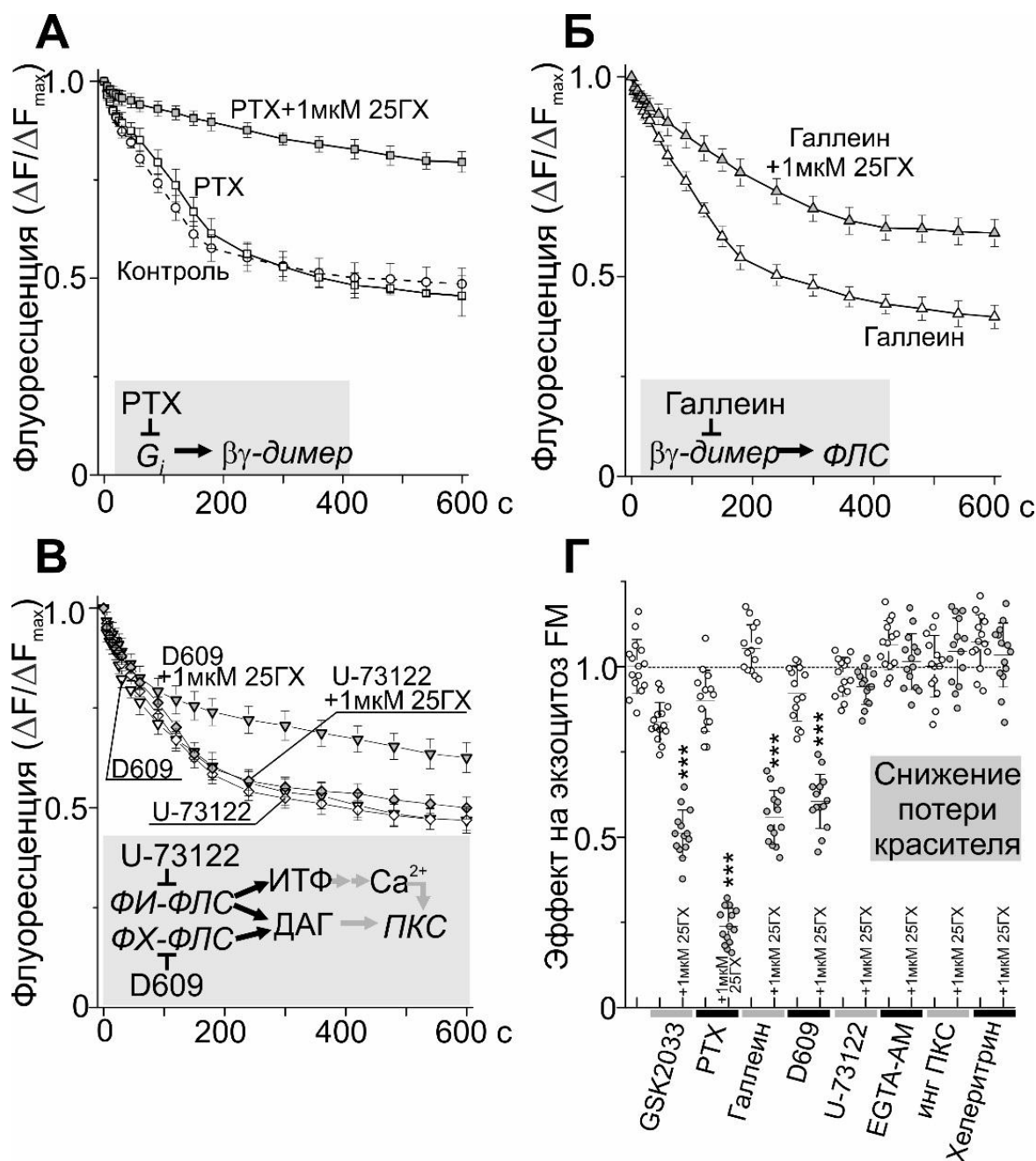


Рис. 10. Вовлечение сигнального пути G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/ФЛС в эффект 25ГХ (1 мкМ) на скорость экзоцитоза СВ. А-В – кинетика выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в препаратах, предварительно обработанных ингибиторами G_i -белка (PTX), $\beta\gamma$ -димера G-белка (галлеин) и ФЛС (D609 и U-73122). $n=14$ для каждой кривой. Ось Y – относительная интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\max}$). Г – нормированный эффект 25ГХ на выгрузку FM1-43 после стимуляции с частотой 20 Гц в течение 3 мин. Этот график указывает на

количество красителя, высвобожденного за 3 мин стимуляции при частоте 20 Гц, по сравнению с контролем. *** $P < 0.001$, по сравнению с контролем. А-Г – данные выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. ДАГ – диацилглицерин, РТХ – коклюшный токсин.

Возможная молекулярная связь между G_i -белком и ПКС может основываться на способности $\beta\gamma$ -димера G_i -белка активировать ФЛС (Smrcka, 2008). В соответствии с этой идеей галлеин (ингибитор $\beta\gamma$ -димера), D609 (ингибитор ФХ-ФЛС) и U-73122 (ингибитор ФИ-ФЛС) действовали так же, как и ингибирование G_i -белка (рис. 10Б). В частности, ингибиторы $\beta\gamma$ -димера или ФЛС предотвращали 25ГХ-индуцированное увеличение выгрузки FM1-43, тогда как сами по себе ингибиторы не влияли на потерю красителя. Следует обратить внимание, что 25ГХ оказывал обратный эффект (подавлял высвобождение FM1-43 при активности с частотой 20 Гц) при ингибировании G_i -белка, $\beta\gamma$ -димера G -белка или ФХ-ФЛС (рис. 7С).

Таким образом, потенцирующий эффект 25ГХ на участие СВ в экзоцитозе может вовлекать G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G -белка/ФХ-ФЛС, ФИ-ФЛС/ $[Ca^{2+}]_{in}$ /ПКС путь. В то же время 25ГХ может подавлять нейротрансдукцию, когда эти сигнальные молекулы (за исключением ФИ-ФЛС, $[Ca^{2+}]_{in}$, ПКС) блокируются (рис. 10Г).

3.1.9 Активные формы кислорода модулируют эффект 25ГХ на выгрузку FM1-43

Повышение уровня $[Ca^{2+}]_{in}$, а также активация ПКС могут привести к увеличению продукции АФК. В свою очередь, АФК могут повышать как уровень цитозольного Ca^{2+} , так и активность ПКС (Gorlach et al., 2015; Ursan et al., 2020). Таким образом, АФК может служить потенциальным усилителем Ca^{2+} -ПКС сигнализации. Аппликация 25ГХ вызывало увеличение флуоресценции CM-H2DCF (индикатор АФК) с пиком через 5-6 мин после добавления 25ГХ (рис. 11А). Это говорит о том, что повышение уровня цитозольной АФК происходит после увеличения $[Ca^{2+}]_{in}$. Более того, хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} (с помощью EGTA-AM) предотвратило увеличение флуоресценции CM-H2DCF в ответ на 25ГХ (рис. 11Б). Аналогично, эксперименты с AmplexRed,

чувствительным к H_2O_2 , также показали, что 25ГХ может увеличивать внеклеточный уровень H_2O_2 в Ca^{2+} -зависимой манере (рис. 11В). АФК может играть как физиологическую, так и патологическую роль. Перекисное окисление мембранных липидов является одним из проявлений или последствий токсического действия АФК. Оценка ПОЛ с помощью ратиометрической метки *iT* показала отсутствие окислительного повреждения липидов в результате применения 25ГХ (рис. 11Г). Это согласуется с данными о том, что низкая концентрация H_2O_2 не способна вызвать ПОЛ в НМС мышей (Giniatullin et al., 2019).

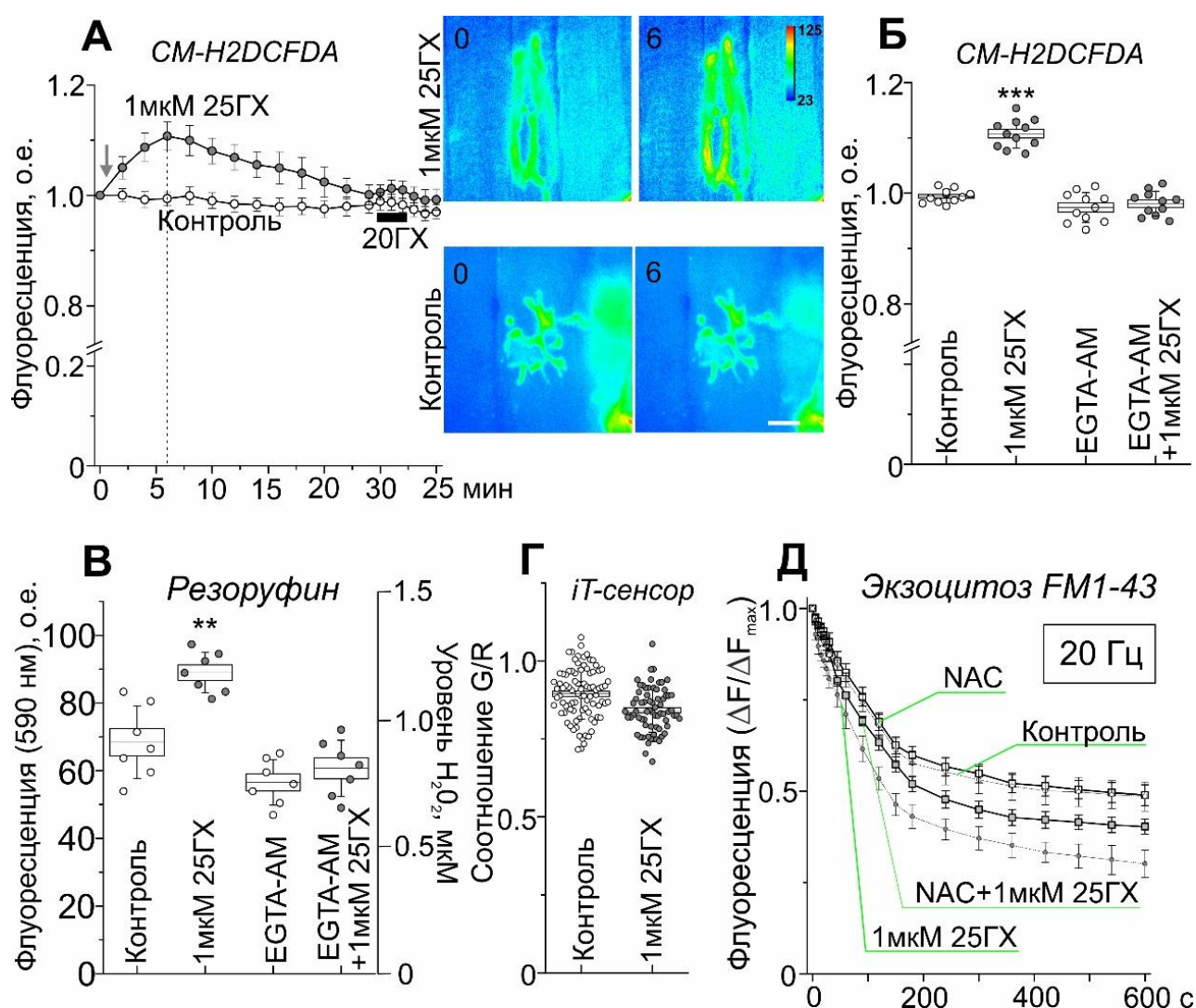


Рис. 11. Влияние 25ГХ (1 мкМ) на продукцию АФК. А – динамика флуоресценции индикатора АФК (CM-H2DCFDA) в ответ на 25ГХ или ДМСО. Момент добавления обозначен стрелкой; жирная горизонтальная линия обозначает стимуляцию при частоте 20 Гц. n=11 на каждую кривую. Справа

представлены изображения, иллюстрирующие изменения флуоресценции в синаптической зоне; масштабная линейка – 10 мкм. Б – изменения флуоресценции CM-H2DCFDA в контроле и в ответ на 25ГХ в условиях нормального внутриклеточного Ca^{2+} и хелатирования $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ с помощью EGTA-AM. Ось Y – нормированная флуоресценция, значения до 25ГХ и ДМСО установлены как 1.0. В – флуоресценция резорурфина (индикация внеклеточного уровня H_2O_2). Ось Y – флуоресценция при 590 нм в о.е. Г – соотношение зеленой/красной флуоресценции iТ-сенсора (соотношение G/R – показатель ПОЛ). n=6 мышей для каждой группы (88/70 НМС в группах контроль/25ГХ). Д – временной ход выгрузки FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в мышцах, обработанных НАС (антиоксидант). n=12-14 для каждой кривой. Ось Y – относительная интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\text{макс}}$). Также обозначены кривые контроля и 25ГХ (из рис. 3). А-Д – данные выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, по сравнению с контролем.

Увеличение АФК может модулировать многочисленные пресинаптические аспекты нейротрансмиссии в НМС (Petrov et al., 2014; Giniatullin et al., 2019; Tsentssevitsky et al., 2020). Чтобы проверить вклад АФК, был использован антиоксидант НАС. Сам НАС не оказывал заметного влияния на выгрузку FM1-43, но частично снижал 25ГХ-опосредованное ускорение потери красителя при активности с частотой 20 Гц (рис. 11Д). Это говорит о том, что АФК может частично способствовать влиянию 25ГХ на мобилизацию СВ, которая в основном зависит от внутриклеточного сигнального пути, включающего G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/ФЛС/ Ca^{2+} /ПКС.

3.2 Боковой амиотрофический склероз и 25ГХ

3.2.1 Уровень внеклеточного холина во внеклеточном растворе

В условиях покоя большая часть внеклеточного АХ поступает за счет невезикулярной (неквантовой) секреции, которая опосредуется транспортерами нейромедиаторов, встроенными в пресинаптическую мембрану (Fletcher, Forrester, 1975; Vyskocil et al., 2009; Petrov et al., 2011). В синаптической щели молекулы АХ быстро гидролизуются АХЭ, высвобождая ацетат и холин. Внеклеточный уровень холина точно отражает неквантовое высвобождение АХ в НМС (Petrov et al., 2011). Таким образом, был оценен внеклеточный уровень холина,

накопленный в течение 15 минут. Интересно отметить, что внеклеточное содержание холина было заметно выше (на $43 \pm 17\%$, $p=0.0009$) у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа (рис. 12А). Большинство модуляторов нервно-мышечной передачи (АТФ, глутамат, мускариновые агонисты) подавляют некантовое высвобождение в НМС млекопитающих (Vyskocil et al., 2009). Напротив, даже незначительное истощение мембранного холестерина может увеличить невезикулярное высвобождение АХ из-за повышенной активности транспортера АХ в пресинаптической мембране НМС крысы (Petrov et al., 2011). Соответственно, потенциальной причиной повышения уровня внеклеточного холина могут быть изменения, связанные с текучестью мембраны в НМС у mSOD мышей. В соответствии с этой идеей, насыщение мембраны экзогенным холестерином с использованием комплекса МβЦД-холестерин (Petrov et al., 2014; Petrov et al., 2017) снизило содержание внеклеточного холина у mSOD мышей до контрольного значения, в то время как добавление холестерина не оказало существенного влияния на уровень холина у мышей дикого типа (рис. 12А). Заманчиво предположить, что изменения свойств мембраны НМС могут проявляться на ранних стадиях БАС.

Остаточный АХ (негидролизированный эндогенной АХЭ) оценивали в экспериментах с добавлением экзогенной АХЭ (рис. 12Б). В этих экспериментах уровень холина был на $37 \pm 13\%$ ($p=0.0015$) выше, чем в условиях без добавления экзогенной АХЭ у мышей дикого типа. Это означает, что $\sim 37\%$ АХ не подвергалось действию эндогенной АХЭ. В присутствии экзогенной 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 у mSOD мышей, тогда как у мышей дикого типа не оказывало никакого эффекта (рис. 12Б). Эти результаты согласуются с данными, полученными без добавления экзогенной АХЭ, и указывают на увеличение высвобождения АХ в покоящихся нервно-мышечных препаратах. Отметим, что сходная степень увеличения уровня холина, оцененная без (рис. 12А) и с добавлением экзогенной АХЭ (рис. 12Б),

свидетельствует об отсутствии существенной разницы в активности эндогенной АХЭ у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа.

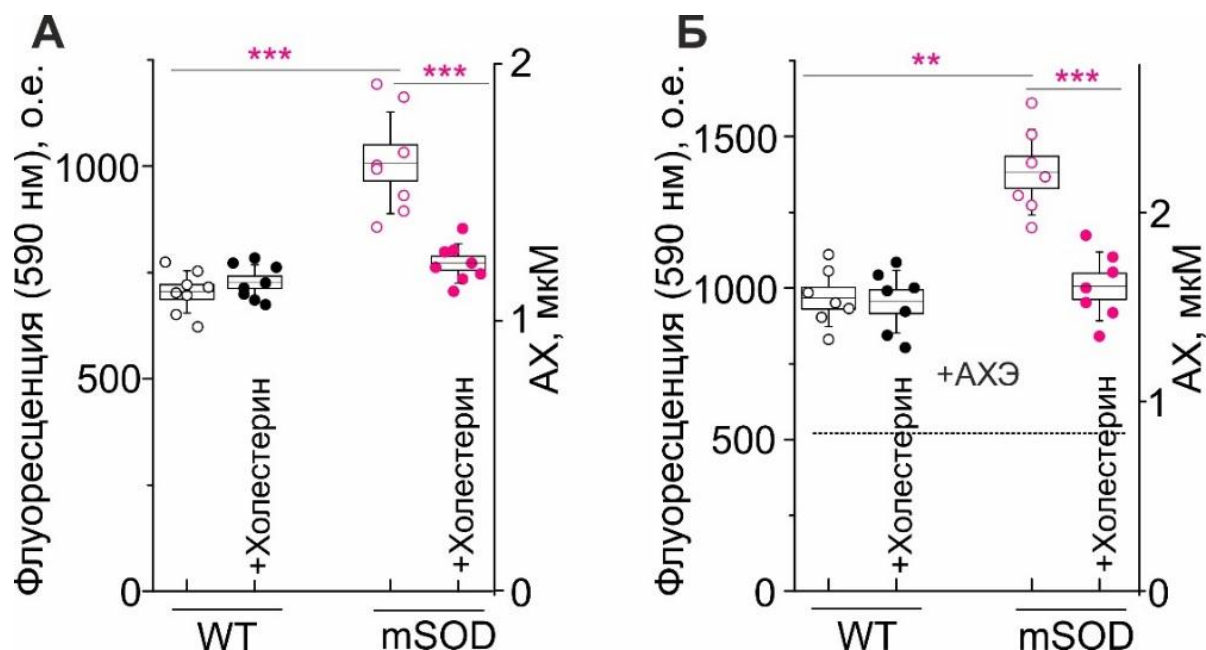


Рис. 12. Изменение уровня внеклеточного холина/АХ в состоянии покоя. А – показана флуоресценция резорурфина (при 590 нм; в о.е.), отражающая уровень холина во внеклеточном растворе после 15-минутной инкубации мышц мышей дикого типа (WT) и mSOD мышей. Б – те же измерения в присутствии экзогенной АХЭ, которая превращает остаточный АХ (негидролизированный эндогенной АХЭ) в холин. Некоторые мышцы были обогащены холестерином до начала 15-минутной инкубации (+холестерин). Флуоресценция сравнивалась с калибровочной кривой для АХ для оценки уровней АХ/холина (ось Y справа). n=7-8 мышей для каждой группы. Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение; **P<0.01, ***P<0.001.

3.2.2. Различия в свойствах мембран синаптического и внесинаптического региона

Флуоресцентные подходы позволяют селективно оценивать свойства мембран в синаптическом компартменте живых мышечных волокон. Для проверки гипотезы о том, что изменения липидных рафтов являются ранним событием при БАС, был использован флуоресцентно-меченный ХТ-В, который избирательно связывается с кластерами ганглиозида GM1, расположенными преимущественно в липидных рафтах (Margheri et al., 2014), и флуоресцентный

ганглиозид GM1, который преимущественно встраивается в липидные рафты (Ichikawa et al., 2009; Kasimov et al., 2016). Окрашивание плазматической мембраны ХТ-В было заметно ниже в синаптических областях (рис. 13А) у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа. Во внесинаптических областях флуоресценция ХТ-В существенно не отличалась ($p=0.185$) у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа. Флуоресценция ганглиозида GM1 была снижена как в синаптических, так и во внесинаптических регионах у mSOD мышей (рис. 13Б). Эти данные позволяют предположить, что снижение целостности липидных рафтов может происходить на ранних стадиях в НМС mSOD мышей. NBD-холестерин является красителем, чувствительным к окружающей среде, и повышение текучести мембран увеличивает флуоресценцию NBD-холестерина, встроенного в плазматическую мембрану (Ostasov et al., 2013; Kasimov et al., 2016; Petrov et al., 2016). У mSOD мышей флуоресценция NBD-холестерина была значительно выше, чем у животных дикого типа (рис. 13В). Следовательно, в плазматических мембранах mSOD мышей на стадии до начала заболевания может происходить увеличение текучести мембран, т.е. дезорганизация. Это согласуется с предполагаемым нарушением липидной упорядоченности мембран (липидных рафтов) в НМС mSOD мышей.

Чтобы дополнительно проверить различия в упорядоченности плазматических мембран, использовалась ратиометрическая метка F2N12S. Снижение соотношения красной и зеленой флуоресценции F2N12S указывает на увеличение липид-неупорядоченной фазы и (или) потерю асимметрии мембраны (Shynkar et al., 2007; Kilin et al., 2015; Petrov et al., 2019). У mSOD мышей это соотношение флуоресценции F2N12S уменьшилось в синаптических областях (рис. 13В). Таким образом, использование четырех различных красителей свидетельствует о выраженном снижении липидной упорядоченности (целостности рафтов) в мембранах диафрагмы у mSOD мышей до манифестации заболевания.

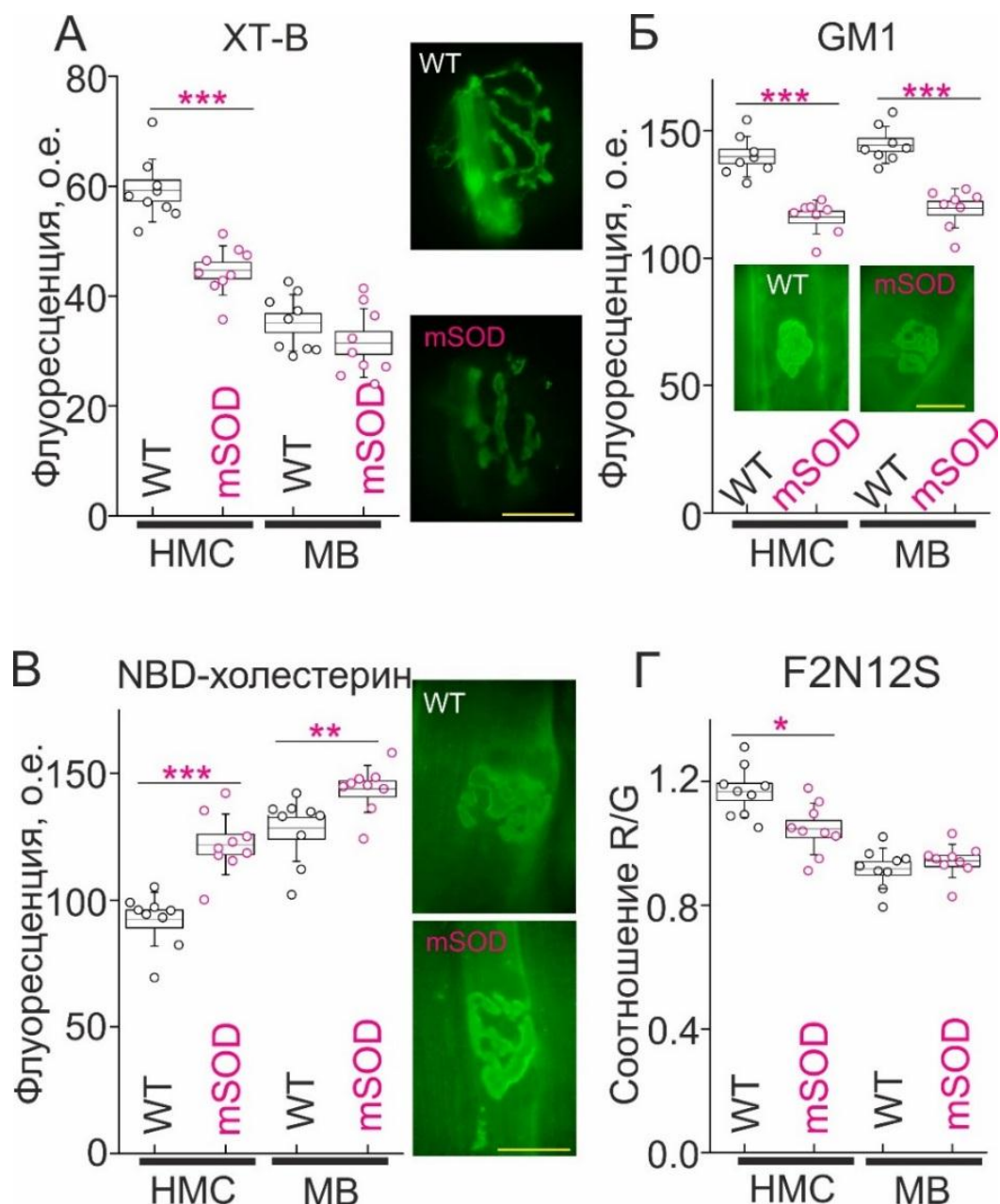


Рис. 13. Свойства плазматической мембраны в синаптической (HMC) и внесинаптической областях (MB) у mSOD мышей и мышей дикого типа. А – мечение липидных рафтов флуоресцентным XT-B. n=9 мышей на группу (258 и 263 мышечных волокон для мышей дикого типа (WT) и mSOD мышей, соответственно). Б – окрашивание флуоресцентным ганглиозидом GM1, нацеленным на липидные рафты. n=8 мышей на группу (209 и 231 мышечных волокон для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно). В – флуоресценция чувствительной к текучести мембран метки NBD-холестерина. Увеличение флуоресценции NBD-холестерина указывает на увеличение текучести мембраны (т.е. уменьшение упорядоченности липидов). n=9 мышей на группу (261 и 267 мышечных волокон для дикого типа и mSOD, соответственно). А-Б – представлены значения флуоресценции (в о.е.) и типичные флуоресцентные

изображения синаптической области; масштабные линейки – 20 мкм. Г – соотношение красной и зеленой флуоресценции красителя F2N12S – показатель упорядоченности и (или) асимметрии мембран. n=9 мышей на группу (202 и 214 мышечных волокон для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно). Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

3.2.3 Различия в поглощении флуоресцентного церамида у мышей с моделью БАС

Оценка уровня холестерина и церамида в гомогенате мышцы указала на отсутствие изменений в содержании холестерина, но повышение уровня церамида (Zakutjanova et al., 2021). Нарушенный метаболизм церамида и его накопление могут способствовать нарушению липидных рафтов, синаптической дисфункции, а также метаболической дисрегуляции в скелетных мышцах (Rohrbough et al., 2004; Bryndina et al., 2018; Petrov et al., 2019; Reidy et al., 2020). Содержание церамида было выше в мышцах диафрагмы у mSOD мышей, по сравнению с мышцами дикого типа.

Кроме того, использование BODIPY-церамида показало его большее накопление избирательно в синаптическом регионе у mSOD мышей (рис. 14). Флуоресцирующий церамид образовывал «горячие точки» флуоресценции в синаптической зоне у mSOD мышей. Это указывает на накопление церамида в плазматической и внутриклеточной мембранах (эндоплазматический ретикулум и эндосомы) в НМС. Соответственно, повышение уровня церамида и его синаптическое накопление могут происходить у mSOD мышей на ранней стадии.

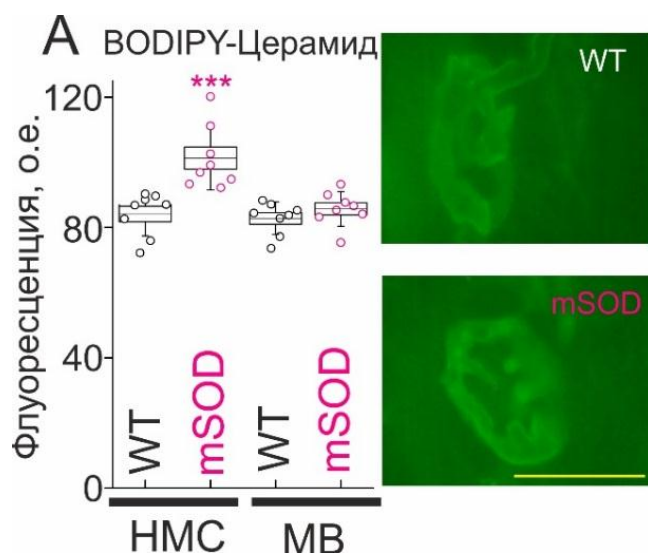


Рис. 14. Различия в поглощении флуоресцентного церамида у mSOD мышей и мышей дикого типа. Слева представлена флуоресценция (в о.е.) в синаптической и внесинаптической областях; справа – изображения синаптического компартмента, масштабная линейка – 20 мкм. n=8 мышей на группу (192 и 208 мышечных волокон для дикого типа (WT) и mSOD мышей, соответственно). Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение; ***P<0.001.

3.2.4 Влияние острой аппликации оксистерина на свойства мембран

Оксистерины могут влиять как на свойства синаптических мембран, так и на нервно-мышечную передачу (Kasimov et al., 2015; Kasimov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2018). Последние исследования свидетельствуют о вовлечении 25ГХ в БАС, связанного с иммунитетом, выработка которого индуцируется различными лигандами толл-подобных рецепторов и ИФН (Abdel-Khalik et al., 2017; Kim et al., 2017), а также гиперхолестеринемией и диетой, обогащенной холестерином (Johnson et al., 1994; Dias et al., 2018). Несмотря на многочисленные эффекты 25ГХ (антивирусный, кардиопротекторный, противораковый, регуляция гомеостаза холестерина), его роль в БАС остается неизвестной.

Воздействие 25ГХ (1 мкМ) в течение 1.5 ч не изменило ни окрашивания ганглиозида GM1 (рис. 15А), ни флуоресценцию NBD-холестерина (рис. 15Б) в синаптическом и внесинаптическом областях у мышей дикого типа. Напротив, у mSOD мышей 25ГХ заметно усиливал мечение ганглиозидом GM1 и снижал флуоресценцию NBD-холестерина в мембранах как синаптического, так и внесинаптического региона (рис. 15А, Б). Эти данные позволяют предположить, что 25ГХ может усиливать формирование мембранных микродоменов и снижать текучесть мембран у mSOD мышей. В подтверждение этого предположения, 25ГХ

увеличивал соотношение красной и зеленой флуоресценции F2N12S в синаптическом (более выраженное) и внесинаптическом регионе у mSOD мышей, но не у мышей дикого типа (рис. 15В). Это указывает на 25ГХ-индуцированное увеличение упорядоченности плазматических мембран у mSOD мышей. Таким образом, плазматические мембраны mSOD мышей более восприимчивы к 25ГХ, что может способствовать образованию мембранных микродоменов. Кроме того, 25ГХ снижал поглощение BODIPY-церамида в синаптической области у mSOD мышей (рис. 15Г). У мышей дикого типа 25ГХ не оказывал заметного влияния на флуоресценцию церамида.

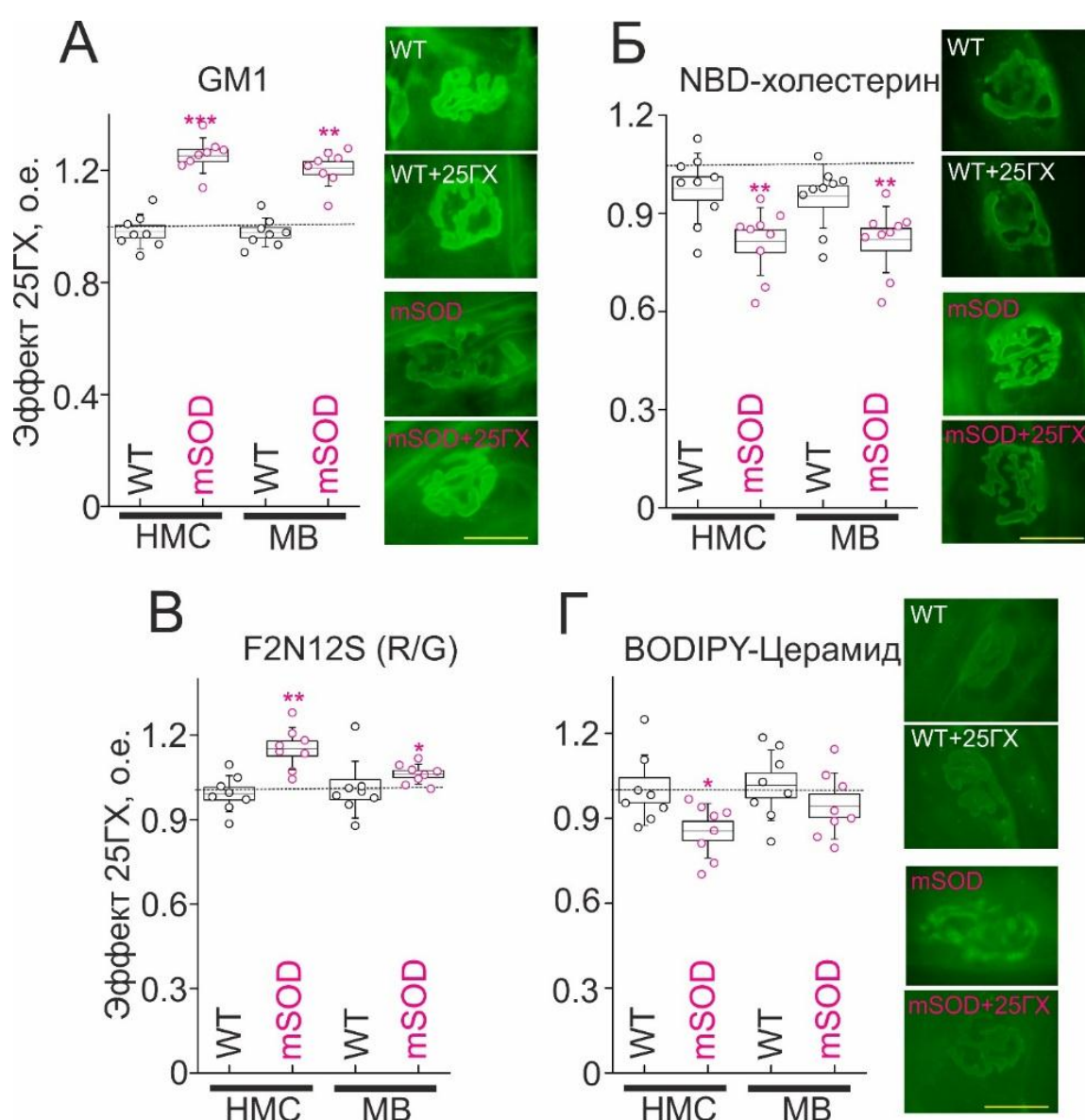


Рис. 15. Влияние острого воздействия 25ГХ на свойства мембран в синаптической и внесинаптической областях. Показан нормированный эффект на

флуоресценцию BODIPY-GM1 (А), NBD-холестерина (Б), красителя F2N12S (В), BODIPY-церамида (Г). По оси Y представлен нормированный эффект оксистерина (1.0 – среднее значение интенсивности флуоресценции (А, Б и Г) или соотношение красной/зеленой флуоресценции (В) в образцах мышей дикого типа (WT) или mSOD мышей без обработки 25ГХ). А, Б, Г: n=8 мышечных волокон (МВ) для каждой группы (А/Б/Г: 216/177/202 и 224/185/211 мышечных волокон (МВ) для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно). Б: n=9 в каждой группе (249 и 253 мышечных волокон для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно). Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Таким образом, 25ГХ изменяет свойства мембран, связанные с липидными рафтами (поглощение ганглиозида GM1, упорядоченность и текучесть мембраны) и поглощением церамида, противоположно, по сравнению с изменениями, наблюдаемыми в синаптических мембранах mSOD мышей. Заманчиво предположить, что повышение уровня 25ГХ может подавлять ранние изменения свойств мембран НМС, связанные с БАС.

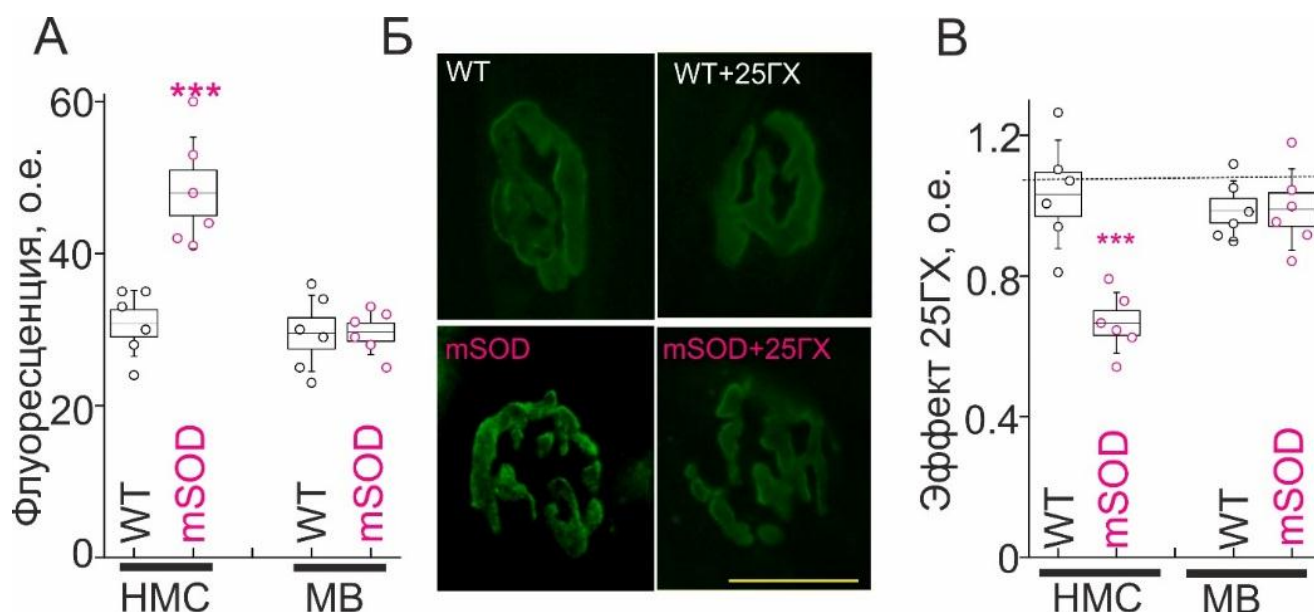


Рис. 16. Влияние 25ГХ на поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина. А – количественная оценка флуоресценции 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина. n=6 на группу (172 и 178 мышечных волокон для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно). Б – типичное флуоресцентное изображение синаптической области в контрольных и обработанных 25ГХ мышцах мышей дикого типа и mSOD мышей. Масштабная линейка – 20 мкм. В – влияние 25ГХ на поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина. По оси Y

представлен нормированный эффект 25ГХ (1.0 – среднее значение интенсивности флуоресценции в мышцах мышей дикого типа и mSOD мышей, не обработанных 25ГХ). $n=6$ для каждой группы (167 и 173 мышечных волокон для мышей дикого типа и mSOD мышей, соответственно); *** $P<0.001$.

Примечательно, что в отличие от mSOD животных 25ГХ не оказывал значительного влияния на свойства мембран у мышей дикого типа. Чтобы проверить возможность того, что 25ГХ может более эффективно связываться с мембранами mSOD мышей, использовался 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерин, который перемещается оксистерин-связывающими белками (Holtta-Vuori et al., 2008; Jansen et al., 2011), ответственными за внутриклеточный трафик эндогенного 25ГХ и холестерина (рис. 16). Поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина было значительно выше в синаптических областях у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа (рис. 16А, Б). Более того, предварительная обработка 25ГХ заметно ослабляла поглощение 25-(C4 TopFluor®)25-ОН-холестерина (рис. 16Б, В), что свидетельствует о конкуренции между этими двумя стеринами и, следовательно, об одном и том же механизме, ответственном за их накопление в НМС.

3.2.5 Эффекты хронического введения 25ГХ у mSOD мышей

Для оценки эффектов введения 25ГХ в течение месяца в очень низкой дозе (0,4 мг/кг; одна внутрибрюшинная инъекция раз в 4 дня) использовали F2N12S и флуоресцентный церамид. Как и острая аппликация, месячное введение 25ГХ привело к увеличению соотношения красной и зеленой флуоресценции F2N12S в синаптической области у mSOD мышей (рис. 17А).

В результате соотношение флуоресценции в синаптической областях было одинаковым у mSOD мышей, обработанных 25ГХ, и мышей дикого типа (1.26 ± 0.08 , $n=7$ и 1.15 ± 0.07 , $n=8$, соответственно). Поглощение флуоресцентного церамида в НМС уменьшалось под воздействием введения 25ГХ (рис. 17Б). В конечном итоге флуоресценция церамида в мышцах mSOD мышей, получавших 25ГХ, была такой же, как у мышей дикого типа (83.9 ± 4.7 , $n=9$ и 84.1 ± 6.7 , $n=8$).

Эти данные свидетельствуют о том, что хроническое введение 25ГХ действует так же, как и острая аппликация 25ГХ, и может предотвратить ранние мембранные нарушения у mSOD мышей. Кроме того, введение 25ГХ снизило общее содержание церамида в мышцах mSOD мышей, приблизив его к значению мышечной ткани дикого типа (Zakurjanova et al., 2021). Это указывает на высокий эффект лечения.

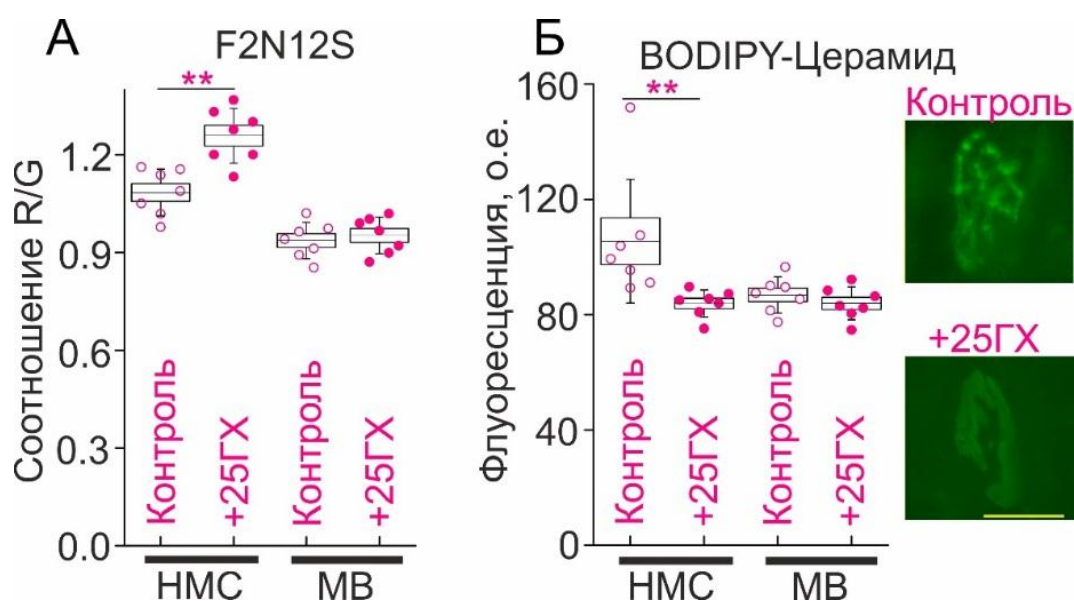


Рис. 17. Влияние хронического введения 25ГХ на мембранные свойства. Показаны данные, полученные от мышечной ткани, обработанной 25ГХ, и контрольных mSOD мышечной ткани. А и Б – соотношение красной и зеленой флуоресценции F2N12S и флуоресценции BODIPY-церамида в синаптической и внесинаптической областях. А, Б: n=7 мышечной ткани на группу (А/Б: 149/187 и 152/193 мышечных волокон для контроля mSOD и +25ГХ, соответственно). Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение; **P<0.01, ***P<0.001.

Кроме того, острая аппликация 25ГХ не повлияла на соотношение красной и зеленой флуоресценции F2N12S, а также на поглощение церамида в мышцах mSOD мышечной ткани, которым хронически вводили 25ГХ (рис. 18). Это предполагает, что острое и длительное введение 25ГХ может действовать на сходные мишени у mSOD мышечной ткани.

Также были проанализированы морфология (Chibalin et al, 2018), уровень АХ и перекисное окисление липидов в HMC на фоне длительного введения 25ГХ (рис. 19).

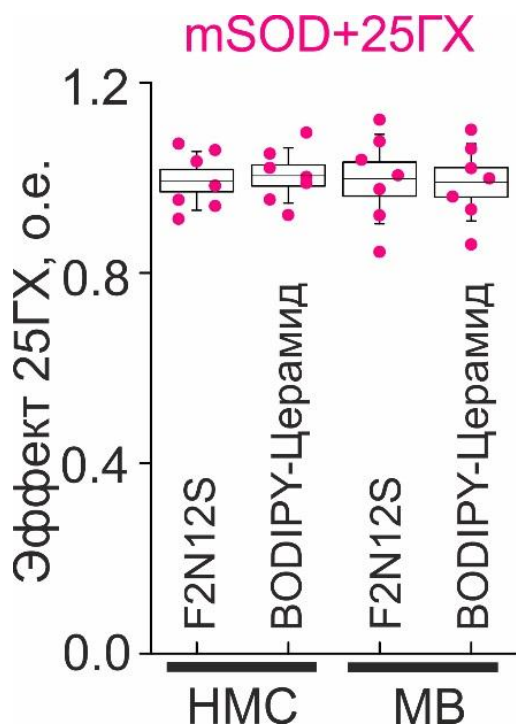


Рис. 18. Влияние острого воздействия 25ГХ на свойства мембран у mSOD мышей, получавших хроническое введение 25ГХ. Показано нормированное влияние 25ГХ на флуоресценцию F2N12S и BODIPY-церамида. По оси Y: 1.0 – среднее соотношение красной/зеленой флуоресценции (F2N12S) или интенсивности флуоресценции (BODIPY-церамида) у мышей с хроническим введением 25ГХ, но не подвергавшихся острой аппликации 25ГХ. n=7 мышей для каждой группы (F2N12S и BODIPY-церамид: 151 и 189 мышечных волокон, соответственно). Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение.

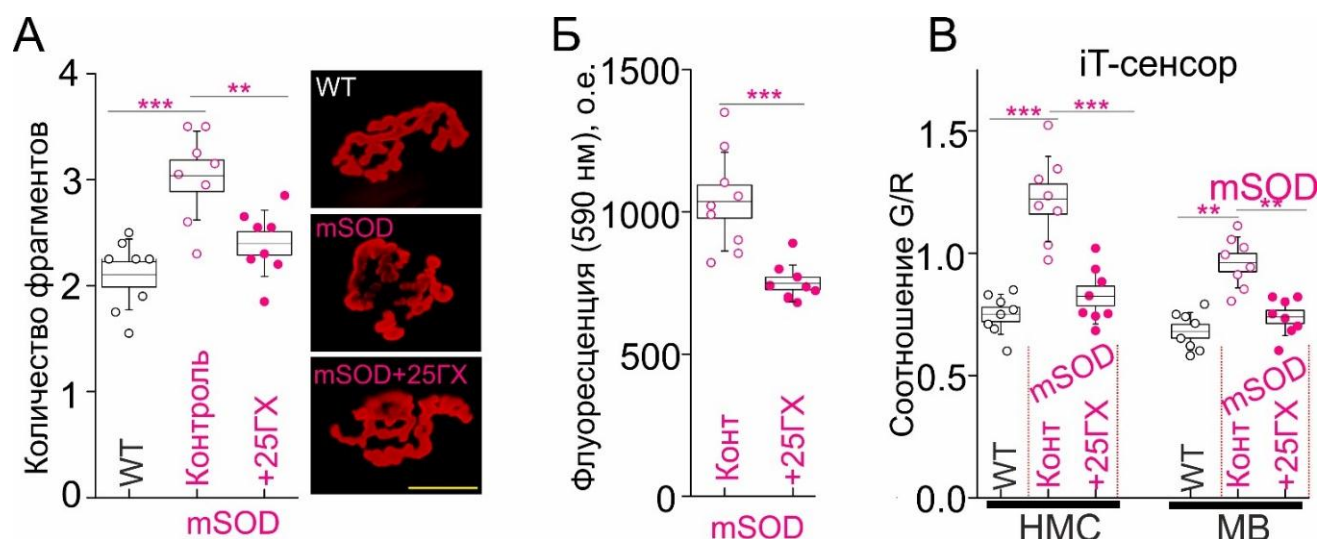


Рис. 19. Влияние хронического введения 25ГХ на патологические признаки в HMC у mSOD мышей. А – анализ фрагментации HMC (слева) и характерные изображения меченных αБТ HMC (справа) у мышей дикого типа и mSOD мышей (контроль и введение 25ГХ). Б – различия в уровне внеклеточного холина/AX. В – перекисное окисление липидов. Показано соотношение зеленой и красной флуоресценции iT-сенсора (G/R), индикатора перекисного окисления мембранных липидов. А, В: n=8 мышей для каждой группы (А/В: 225/164, 233/171 и 236/174 мышечных волокон для мышей дикого типа, контроля mSOD и +25ГХ, соответственно). Г: n=8 мышей на группу. Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение. **P<0.01, ***P<0.001.

Увеличение числа островков концевых пластинок (фрагментация) происходит с возрастом, а также на ранней стадии у мышей с моделью мышечной дистрофии (Li et al., 2011; van der Pijl et al., 2016) и у SOD^{G37R} мышей (Tremblay et al., 2017). Кроме того, фрагментация может быть вызвана повреждением мышечных волокон из-за механического давления или лазера (Rich, Lichtman, 1989; Li et al., 2011). У пациентов с БАС фрагментация постсинаптического аппарата наблюдается на ранней стадии заболевания (Bruneteau et al., 2015). У симптомных SOD^{G93A} мышей фрагментация концевой пластинки вместе с уменьшением плотности постсинаптических нХР наблюдалась в длинном разгибателе пальцев (Valdez et al., 2012), но не в камбаловидной мышце (Narai et al., 2009). В настоящее время фрагментация НМС может рассматриваться как форма регенерации (Slater, 2020). Морфометрический анализ распределения нХР показал увеличение количества островков концевых пластинок в диафрагме mSOD мышей (рис. 19А). Месячное введение 25ГХ предотвратило фрагментацию НМС у mSOD мышей. Средняя площадь НМС была одинаковой во всех группах (рис. 20). Важно отметить, что хроническое введение 25ГХ подавляло повышение внеклеточного уровня холина в мышцах mSOD мышей (рис. 19Б), что свидетельствует о снижении дисрегуляции некантового высвобождения нейромедиатора.

Окислительное повреждение липидов мембран является ранним признаком БАС, а также дисфункции НМС (Parakh et al., 2013; Tsentskevitsky et al., 2020). iT-индикатор показал усиление перекисного окисления липидов в синаптической области у mSOD мышей до начальной стадии заболевания (рис. 19В). Аналогичным образом уровень гидропероксида в мышцах (но не в спинном мозге) был в два раза выше у mSOD мышей, по сравнению с мышцами дикого типа (Zakutjanova et al., 2021). Длительное введение 25ГХ предотвратило увеличение соотношения зеленой и красной флуоресценции iT-сенсора в синаптических областях, что указывает на исключение окисления липидов. Таким образом, хроническое введение 25ГХ, по-видимому, смягчает ранние аномалии в диафрагмальных мышцах у mSOD мышей.

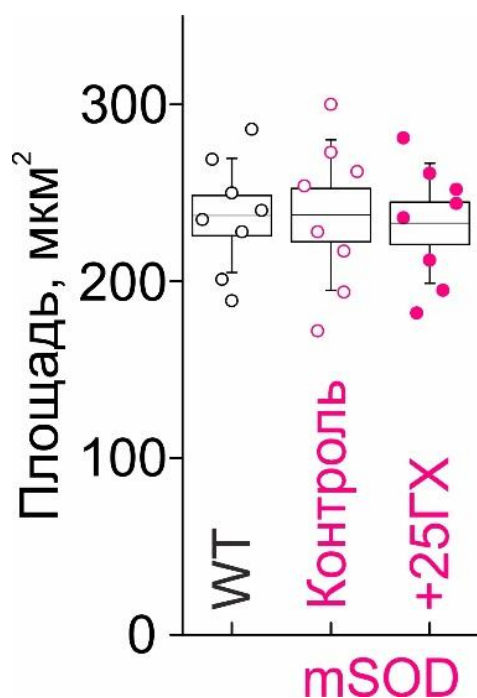


Рис. 20. Влияние 25ГХ на площадь α BT-меченых НМС. Показаны данные для мышей дикого типа, mSOD мышей (контроль и хроническое введение 25ГХ). $n=8$ мышей для каждой группы (225, 233 и 236 мышечных волокон для дикого типа, контроля и +25ГХ, соответственно). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

3.3 Олесоксим

3.3.1 Влияние модуляторов VDAC на спонтанное и вызванное высвобождение нейромедиатора

Олесоксим, связываясь с митохондриальным VDAC (потенциал-зависимый анионный канал), угнетает образование митохондриальной поры, тем самым оказывает нейропротекторный эффект. В данной работе мы рассмотрели эффект самого олесоксима и на фоне модуляторов VDAC на нервно-мышечную передачу.

Постсинаптические потенциалы, отражающие спонтанное (МПКП) и вызванное (ПКП, 0.5 Гц) высвобождение АХ, регистрировали до и после 20 мин аппликации веществ (рис. 21). В этих условиях мембранный потенциал покоя был стабилен. Олесоксим (0.4 мкМ) не изменял параметров МПКП, а именно амплитуду, время нарастания, время спада и частоту (рис. 21А).

Аналогично DIDS, ингибитор транспорта анионов, в том числе активности VDAC (Godbole et al., 2003; Benitez-Rangel et al., 2015), не влиял на параметры МПКП. Совместная аппликация олесоксима и DIDS не влияла на МПКП (рис. 23А). Олесоксим статистически значимо снижал амплитуду ПКП при низкочастотной стимуляции (0.5 Гц), не влияя на время нарастания и спада ПКП (рис. 23Б). Сам DIDS не влиял на амплитуду ПКП, но предотвращал угнетающее

действие олесоксима. Интересно, что олесоксим при более высоких концентрациях снижал амплитуду ПКП (без влияния на амплитуду МПКП) в той же степени, что и олесоксим (0.4 мкМ) (рис. 22А, Б). Следовательно, можно предположить, что эффект олесоксима в концентрации 0.4 мкМ был близок к максимальному.

Стимуляция двигательного нерва на более высокой частоте приводит к мобилизации синаптических везикул (СВ) из рециклирующего и резервного пулов (Rizzoli, Betz, 2005; Zefirov et al., 2009). Во время длительной стимуляции с частотой 20 Гц эффективность высвобождения нейромедиатора зависит от транспорта СВ к активной зоне и их рециклирования во время непрерывной активности. Стимуляция с частотой 20 Гц приводила к двухфазному изменению в амплитуде ПКП: после быстрого уменьшения амплитуда продолжала снижаться, но в более медленном темпе. Предварительная обработка олесоксимом в течение 20 мин вызвала более сильное снижение амплитуды ПКП, особенно это было выражено в начальный период (рис. 21В; рис. 22В). В результате кумулятивная кривая амплитуды ПКП снизилась примерно до 80% ($P < 0.001$), по сравнению с контролем, что позволяет предположить, что олесоксим подавляет вызванное высвобождение нейромедиатора при активности с частотой 20 Гц (рис. 21Г). Сам DIDS не изменял скорость снижения амплитуды ПКП при стимуляции с частотой 20 Гц, но предотвращал действие олесоксима (рис. 21В, Г; рис. 22В). Таким образом, олесоксим селективно подавляет вызванный выброс нейромедиатора в ответ на низкочастотную (0.5 Гц) и высокочастотную (20 Гц) активности, при этом не влияет на спонтанное высвобождение. Эти эффекты олесоксима блокировались антагонистом VDAC.

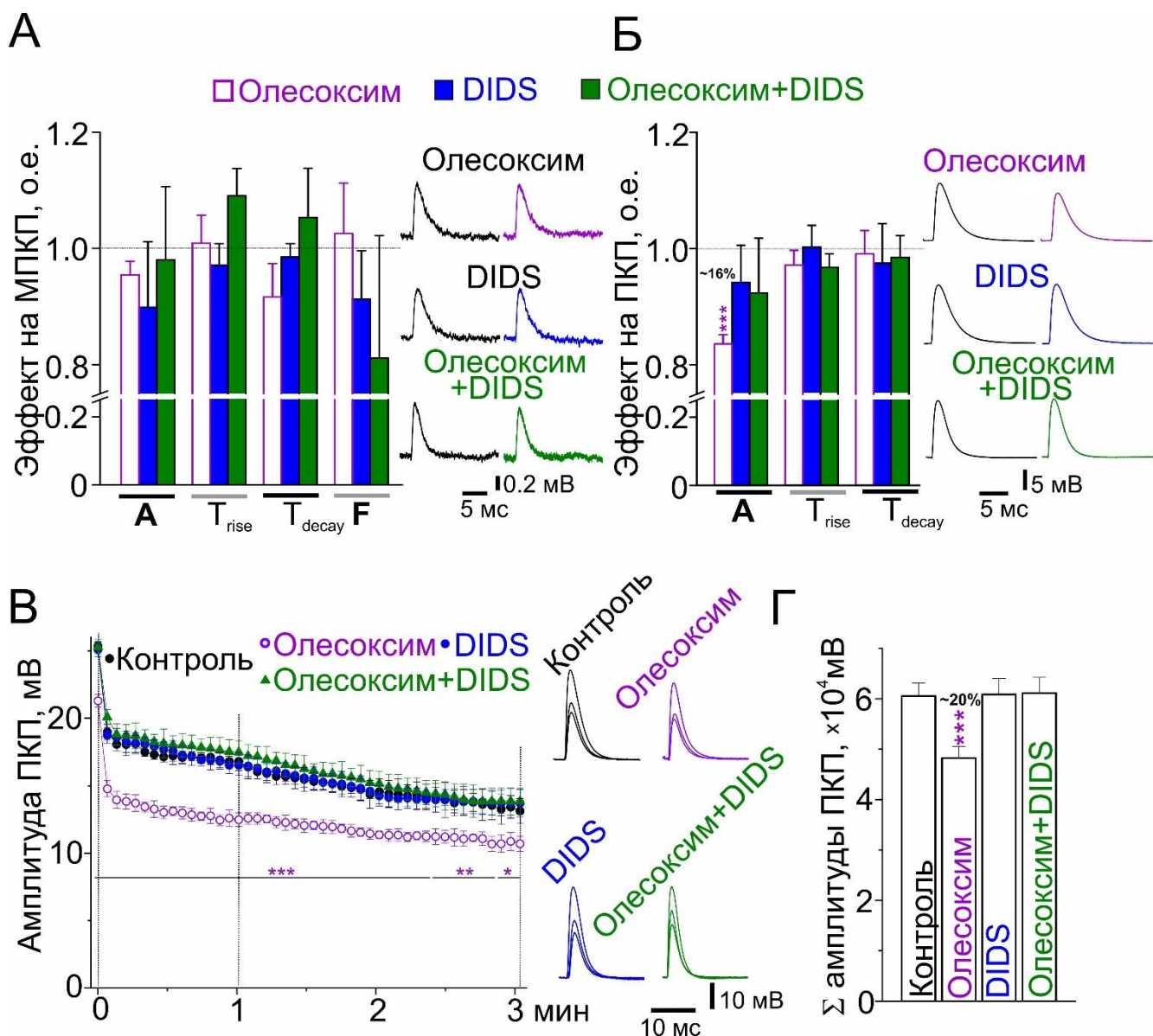


Рис. 21. Эффект олесоксима и блокатора анионного транспорта DIDS на спонтанный и вызванный выброс нейромедиатора. А, Б – гистограмма, показывающая эффект вещества на амплитуду (А), время нарастания (R_i), время спада (τ) и частоту (F) МПКП, а также на пик амплитуды, время нарастания и спада ПКП (Б). ПКП вызван стимуляцией с частотой 0.5 Гц. Ось Y – нормированный эффект вещества (1.0 – значение до добавления вещества). А, Б – справа представлены МПКП (А) и ПКП (Б) до и после 20 мин (в цвете) экспозиции вещества. В – депрессия амплитуды ПКП (мВ) при стимуляции с частотой 20 Гц в контроле и при обработке мышц веществом. Справа показаны ПКП на 0, 1, 3 мин при стимуляции с частотой 20 Гц. Г – кумулятивные амплитуды ПКП (мВ, получены путем суммации ПКП из графика В) при стимуляции с частотой 20 Гц. А-Г – все результаты представлены в средних значениях ± стандартная ошибка, посчитанные в каждом животном (n=8-11 на группу). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 – статистическая достоверность

оценивалась критерием Стьюдента или ANOVA для повторных измерений с последующей коррекцией Бонферрони (В). Числа над столбцами представляют снижение (в %) средних значений, по сравнению со значениями до аппликации вещества (Б) или со значениями в контрольной группе (Г).

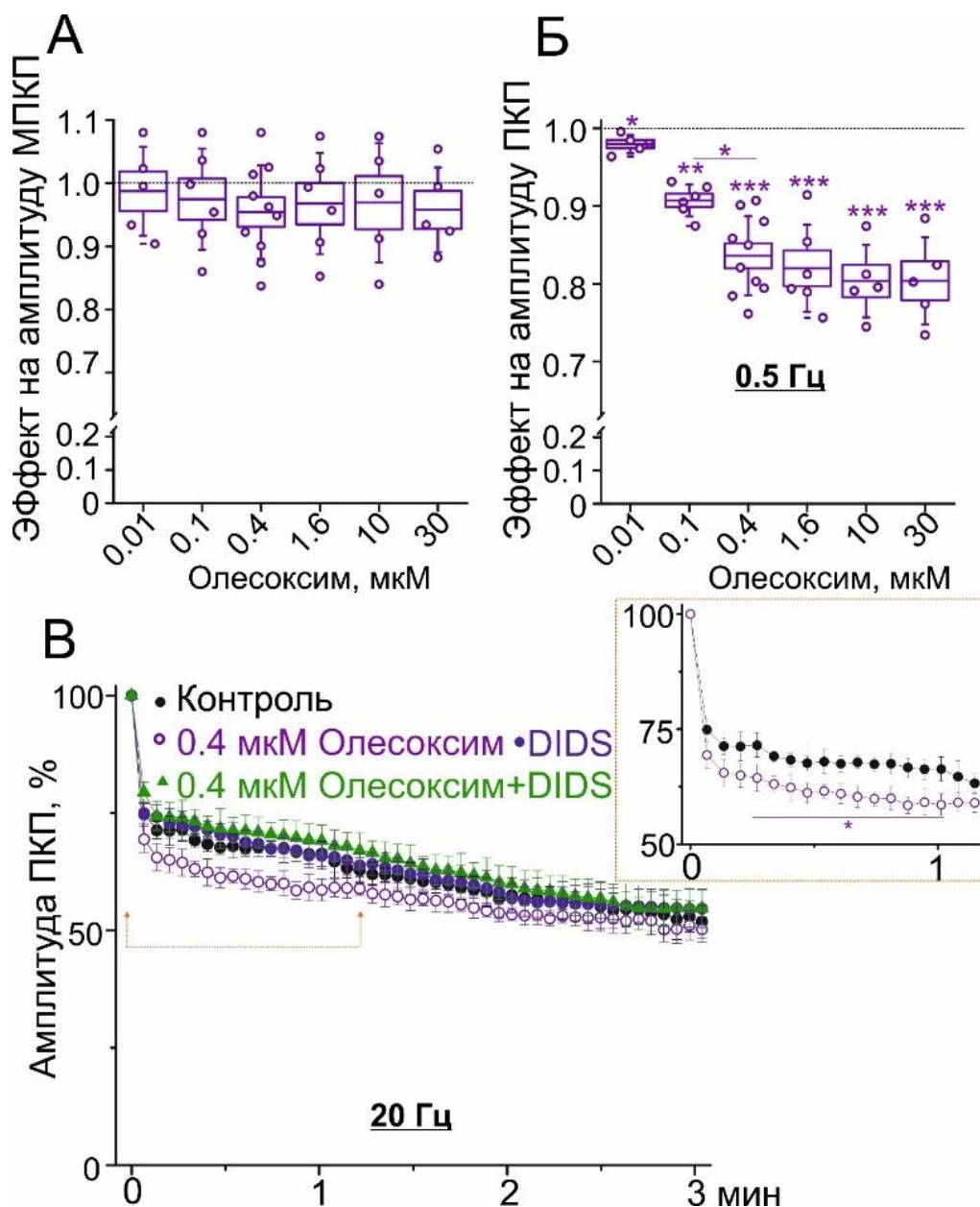


Рис. 22. Влияние модуляторов VDAS на амплитуды МПКП и ПКП. А, Б – влияние разных концентраций олесоксима на амплитуды МПКП и ПКП (при 0.5 Гц). Олесоксим не изменял амплитуду МПКП, но снижал амплитуду ПКП в дозозависимой манере. Олесоксим-индуцированное снижение амплитуды ПКП было схоже в диапазоне концентраций 0.4-30 мкМ. Каждое значение представлено для отдельных животных (кружки), диапазон прямоугольников – стандартная ошибка, отрезки – стандартное отклонение. Ось Y показывает нормированный эффект олесоксима (1.0 – значение до аппликации олесоксима). В

– уменьшение амплитуды ПКП во время стимуляции с частотой 20 Гц в контрольных мышцах и мышцах, предварительно обработанных веществом. Вставка в верхней правой части рисунка В показывает изменение амплитуд ПКП в течение первой минуты стимуляции. Результаты выражаются в процентах от исходного значения (100%), полученного до начала стимуляции с частотой 20 Гц. Результаты представлены в средних значениях $\pm$ стандартная ошибка для отдельных мышечных групп; на группу приходится $n=9$, за исключением олесоксима ($n=11$). А-В: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ – статистическая достоверность оценивалась с помощью двустороннего непарного t -критерия (А, Б) или повторного дисперсионного анализа с коррекцией методом Бонферрони (В).

3.3.2 Влияние модуляторов VDAC на кинетику экзоцитоза красителя FM1-43

Нервные окончания были загружены красителем FM1-43 при стимуляции с частотой 20 Гц в течение 3 мин. После 50-минутного перерыва диафрагмальные нервы повторно стимулировались с частотой 20 Гц. Эта стимуляция приводит к снижению флуоресценции выгрузки, что отражает высвобождение красителя из СВ путем экзоцитоза (рис. 23А). Олесоксим снижал скорость выгрузки красителя. Замедление выгрузки FM1-43 было явно выражено в первые минуты активности (рис. 23А). DIDS не изменял потерю красителя при стимуляции с частотой 20 Гц, но полностью предотвращал влияние олесоксима на выгрузку FM1-43 (рис. 23Б). Это указывает на то, что олесоксим ослаблял экзоцитоз СВ во время стимуляции и это может зависеть от мишени, чувствительной к DIDS. DIDS эффективно подавляет активность канала VDAC в различных типах клеток и может влиять на VDAC, локализованный как в митохондриях, так и на плазматической мембране (Shafir et al., 1998; Godbole et al., 2003). Чтобы проверить роль VDAC плазматической мембраны в эффекте олесоксима на экзоцитоз СВ, использовали фосфоротиоат рандомерный олигонуклеотид S-18 (S-18) (рис. 23В), который специфически блокирует VDAC плазмалеммы и не может проходить через клеточные мембраны (Tan et al., 2007; Stein, Colombini, 2008). Сам S-18 и в сочетании с DIDS не оказал влияния на выгрузку FM1-43, но S-18 полностью предотвратил эффект олесоксима.

Нейропередача в физиологических условиях в основном зависит от повторного использования СВ, принадлежащих к небольшому рециклирующему пулу. Этот пул участвует в высвобождении нейромедиатора в начальный период длительной стимуляции с частотой 20 Гц и может непрерывно поддерживать нейропередачу на более низких частотах (<10 Гц) стимуляции в НМС (Richards et al., 2003; Rizzoli, Betz, 2005). Олесоксим оказывал более заметное влияние как на амплитуду ПКП, так и на потерю FM1–43, особенно в течение первых минут стимуляции с частотой 20 Гц. Это предполагает, что олесоксим может снизить доставку СВ из рециклирующего пула к активной зоне. В соответствии с этим, олесоксим уменьшал скорость выгрузки FM1-43 при активности с частотой 5 Гц (рис. 23Г), и это действие олесоксима полностью предотвращалось S-18, а сам S-18 не влиял на выгрузку красителя при 5 Гц (рис. 23Д).

Электрофизиологические эксперименты с везамиколом (ингибитором заполнения СВ нейромедиатором) (Searl et al., 1991) также предполагают, что олесоксим может подавлять высвобождение нейромедиатора из рециклирующих СВ, вклад которых в высвобождение нейромедиатора зависит от их повторного пополнения нейромедиатором во время активности (рис. 24). Действительно, везамикол усиливал снижение амплитуды ПКП при частоте 20 Гц, а в мышцах, обработанных везамиколом, олесоксим не оказывал дополнительного эффекта на депрессию амплитуды ПКП (рис. 23Б). В результате кумулятивные кривые амплитуды ПКП (стимуляция в течение 3 мин с частотой 20 Гц) были одинаковыми в группах с везамиколом и олесоксимом+везамиколом (рис. 24).

Таким образом, олесоксим ослабляет экзоцитоз СВ как при частоте 5 Гц, так и при частоте 20 Гц. Кроме того, этому действию олесоксима препятствует S-18 (блокатор белка VDAC, непроникающий внутрь клеток). Соответственно, основной мишенью олесоксима может быть VDAC, локализованный на плазматической мембране. Иммунофлуоресцентное мечение показало присутствие VDAC в НМС (рис. 23Е), а паттерн иммунофлуоресценции указывает на экспрессию VDAC на плазматической мембране.

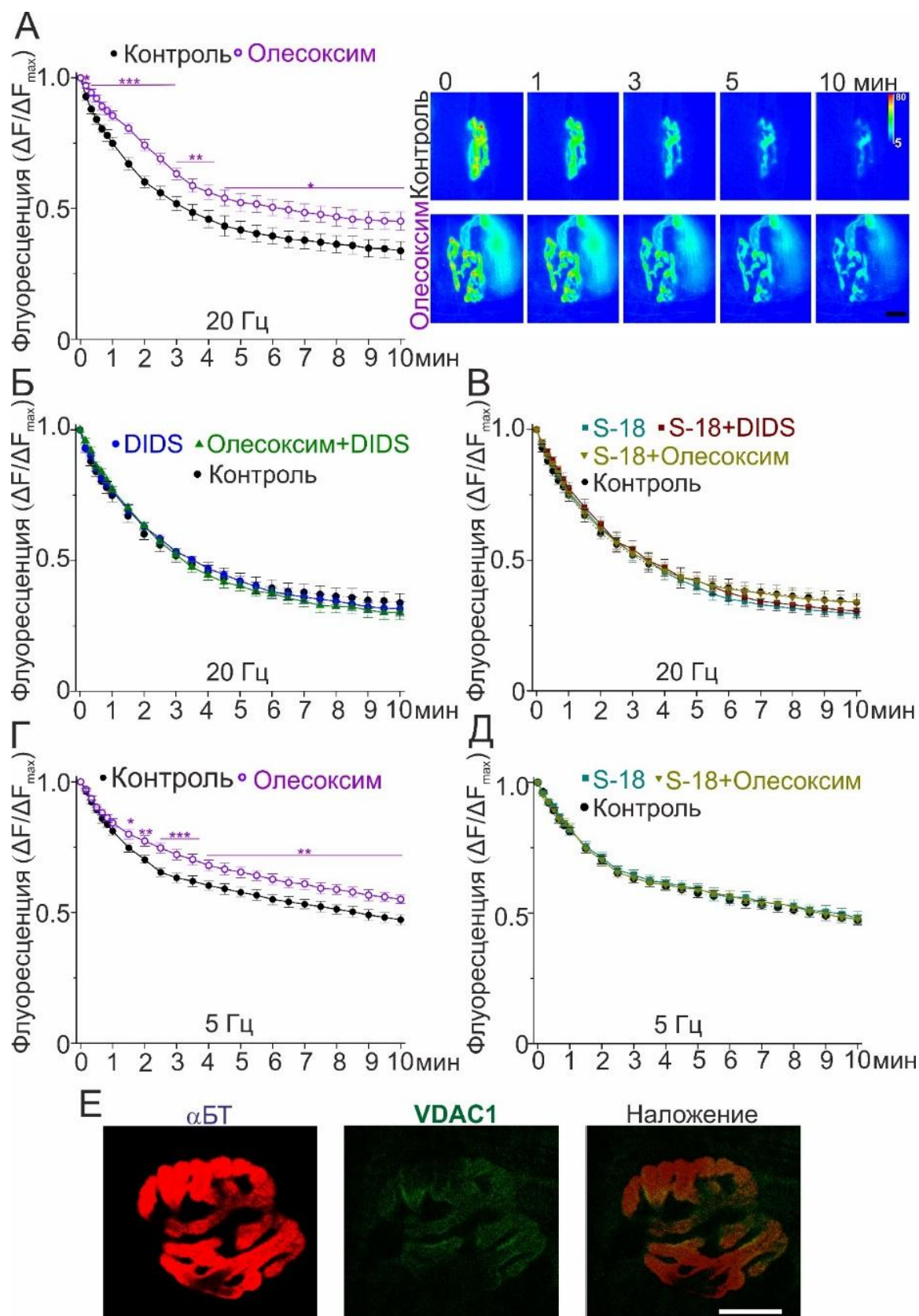


Рис. 23. Влияние модуляторов VDAC на выгрузку красителя FM1-43. А-Д – временной ход выгрузки красителя FM1-43 во время стимуляции с частотой 20 Гц (А-В) и 5 Гц (Г, Д). После обработки веществами НМС, загруженные красителем, были повторно простимулированы (20 Гц или 5 Гц) для индукции экзоцитоза,

приводящий к выбросу нейромедиатора и красителя FM1-43 из СВ. А, Г – эффект олесоксима. А – справа изображение НМС в псевдоцвете до стимуляции с частотой 20 Гц (0) и в разное время стимуляции (мин); соответствующая шкала интенсивности представлена справа (о.е.). Масштабная линейка – 10 мкм. Б – собственное и в сочетании с олесоксимом влияние DIDS. В, Д – собственное и в сочетании с олесоксимом влияние S-18. Контрольные кривые выгрузки FM1-43 показаны на Б, В, Д пунктирными линиями. А-Д, ось Y – интенсивность флуоресценции ($\Delta F/F_{\max}$) относительно значения до начала стимуляции с частотой 20 Гц (А-В) и 5 Гц (Г, Д). Среднее значение $\pm$ стандартная ошибка; $n=12$ для каждой группы. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ – использовался критерий ANOVA для повторных изменений с последующей коррекцией Бонферрони. Е – иммунолокализация белка VDAC в НМС. В представленном изображении НМС помечены антителами к VDAC и α BT (для мечения нХР в НМС). На наложенном изображении интенсивность α BT снижена. Масштабная линейка – 10 мкм.

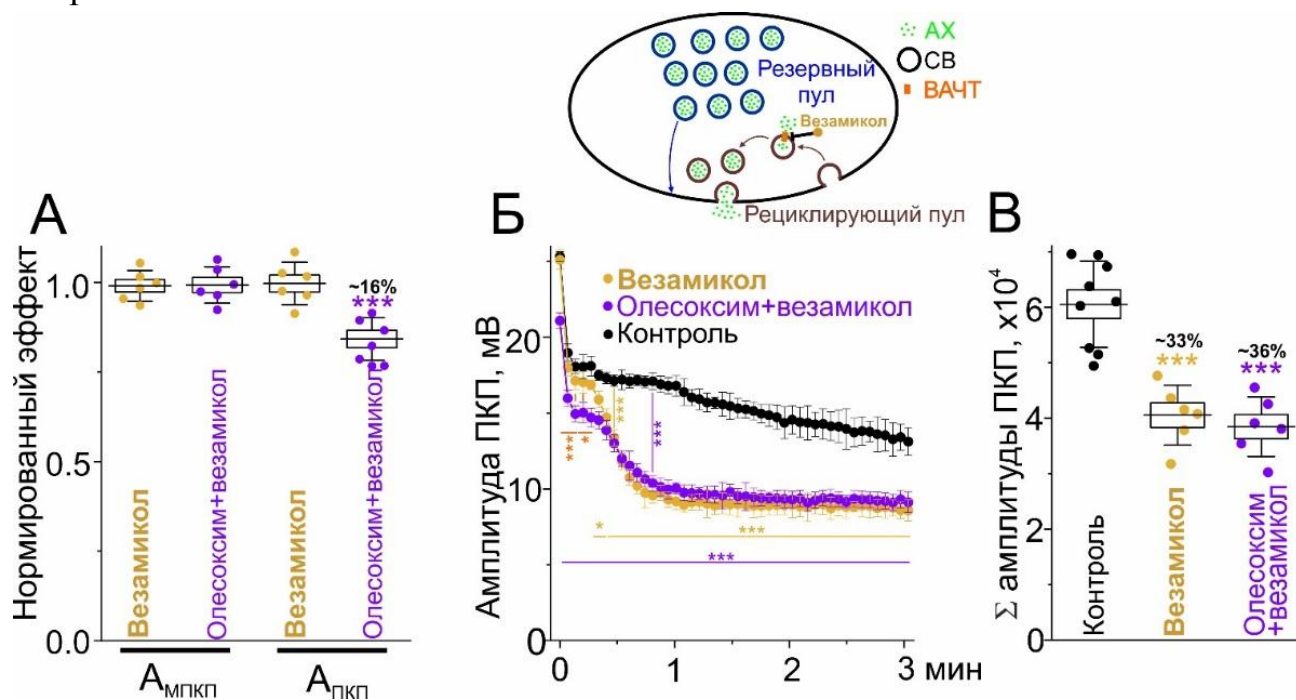


Рис. 24. Эффект везамикола и олесоксима на выброс нейромедиатора. А – влияние самого везамикола и везамикола+олесоксима на амплитуды МПКП и ПКП (при 0.5 Гц). Ось Y показывает нормированный эффект веществ (1.0 – значение до аппликации вещества). Б – спад амплитуды ПКП (в мВ) во время стимуляции с частотой 20 Гц в контрольных и предварительно обработанных веществами мышцах. Данные представляют собой измерения средних значений $\pm$ стандартная ошибка на отдельных мышцах ($n=6$ на группу, исключая контроль, где $n=9$). В – кумулятивные амплитуды ПКП (мВ; из Б). А-В: * $P<0.05$, *** $P<0.001$ – статистическая достоверность оценивалась с помощью двустороннего непарного t-критерия (А, В) или повторного дисперсионного

анализа с последующим тестом Бонферрони (Б). А, В – представлены значения от отдельных животных (кружки), диапазон прямоугольников – стандартная ошибка, отрезки – стандартное отклонение. Цифры над прямоугольниками представляют собой снижение среднего значения (%), по сравнению со значением до аппликации вещества (А) или значением в контрольной группе (В). Сверху схема, иллюстрирующая действие ингибитора везикулярного переносчика ацетилхолина (ВАЧТ) везамикола, который ингибирует пополнение СВ ацетилхолином. Везамикол уменьшал вклад СВ рециклирующего пула в высвобождение нейромедиатора при длительной стимуляции. Во время интенсивной активности СВ, принадлежащие к рециклирующему пулу, неоднократно подвергаются циклу экзо-эндоцитоза, поддерживая высвобождение нейромедиатора. Одним из ключевых этапов везикулярного цикла является заполнение СВ нейромедиатором после эндоцитоза.

3.3.3 Участие митохондрий в эффекте олесоксима на экзоцитоз СВ

Клеточные эффекты олесоксима могут быть связаны с функцией митохондрий. Ротенон вызывает дисфункцию митохондрий путем ингибирования комплекса I электрон-транспортной цепи, что приводит к истощению АТФ, повышению продукции АФК, снижению поглощения цитозольного Ca^{2+} , открытию транзитной митохондриальной поры проницаемости и потере потенциала митохондриальной мембраны (Landolfi et al., 1998; Chauvin et al., 2001; Li et al., 2003).

Действительно, 30-минутная аппликация ротенона в концентрации 10 мкМ приводила к увеличению флуоресценции MitoSox, показателя продукции митохондриальной АФК (рис. 25А). Это усиление флуоресценции MitoSox может быть частично подавлено мембранопроницаемым DIDS, но не олесоксимом или клеточно-непроницаемым S-18. Ротенон значительно подавлял выгрузку FM1-43 при частоте 20 Гц (рис. 25В), олесоксим и S-18 не изменяли эффект ротенона. В то же время DIDS частично ослаблял действие ротенона на флуоресценцию MitoSox и выгрузку FM1-43 (рис. 25С).

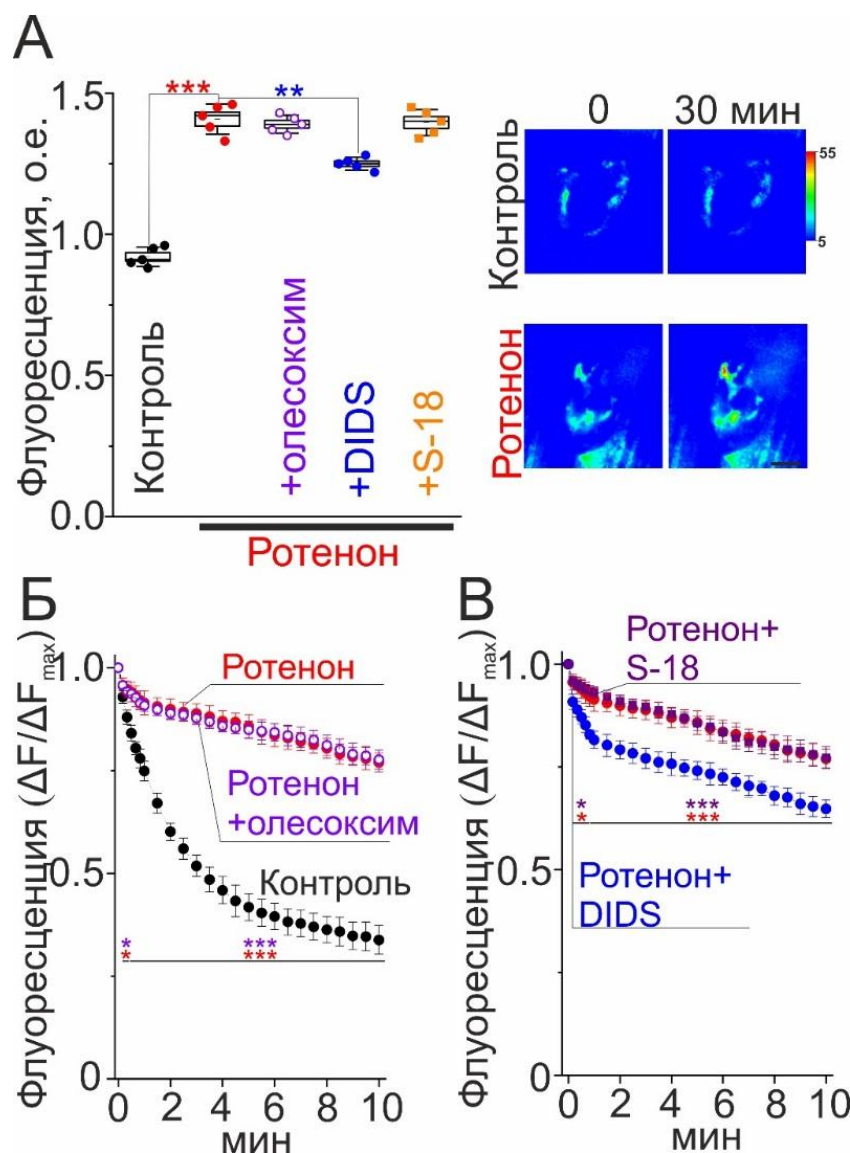


Рис. 25. Роль митохондрий в эффектах модуляторов VDAC. А – продукция митохондриального супероксида в нервно-мышечном соединении. Изменения флуоресценции MitoSox в ответ на аппликацию митохондриального яда ротенона и в сочетании с модуляторами VDAC. Ось Y – относительная флуоресценция, где 1.0 – значение до аппликации вещества или физиологического раствора в качестве контроля. Посчитаны средние значения±стандартная ошибка для каждой группы (n=5). **P<0.01, ***P<0.001 – двусторонний непарный t-критерий. Справа показаны изображения до и через 30 минут после экспозиции препарата в контрольном растворе и ротеноне; соответствующая шкала интенсивности представлена справа (о.е). Масштабная линейка – 10 мкм. Б, В – действие самого ротенона и в комбинации с модуляторами VDAC на выгрузку FM1–43 при стимуляции с частотой 20 Гц. Контрольная кривая выгрузки FM1–43 (рис. 23А) показана на рис. 27Б в виде пунктирной кривой. Б, В: ось Y – интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\max}$) относительно значения до начала стимуляции. Результаты представлены в средних значениях±стандартная ошибка; n=12 для

каждой группы. Для оценки достоверности использовали повторный дисперсионный анализ с последующим тестом Бонферрони (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

Следует отметить, что ротенон увеличивал частоту МПКП и потерю FM1-43 в условиях покоя (без стимуляции), что указывает на усиление спонтанного экзоцитоза (рис. 26А, Б). Кроме того, ротенон незначительно снижал амплитуду ПКП при частоте 0,5 Гц (рис. 26В) и заметно увеличивал депрессию амплитуды ПКП при активности с частотой 20 Гц (рис. 27Г, Д). Эффекты ротенона как на спонтанное высвобождение, так и на снижение амплитуды ПКП при частоте 20 Гц не были чувствительны к олесоксиму (рис. 26А, Б, Г-Е). Таким образом, острая экспозиция олесоксима не может предотвратить индуцированную ротеноном продукцию митохондриальной АФК и нарушение экзоцитоза СВ. Эти результаты свидетельствуют о независимом от митохондрий действии олесоксима на экзоцитоз в НМС.

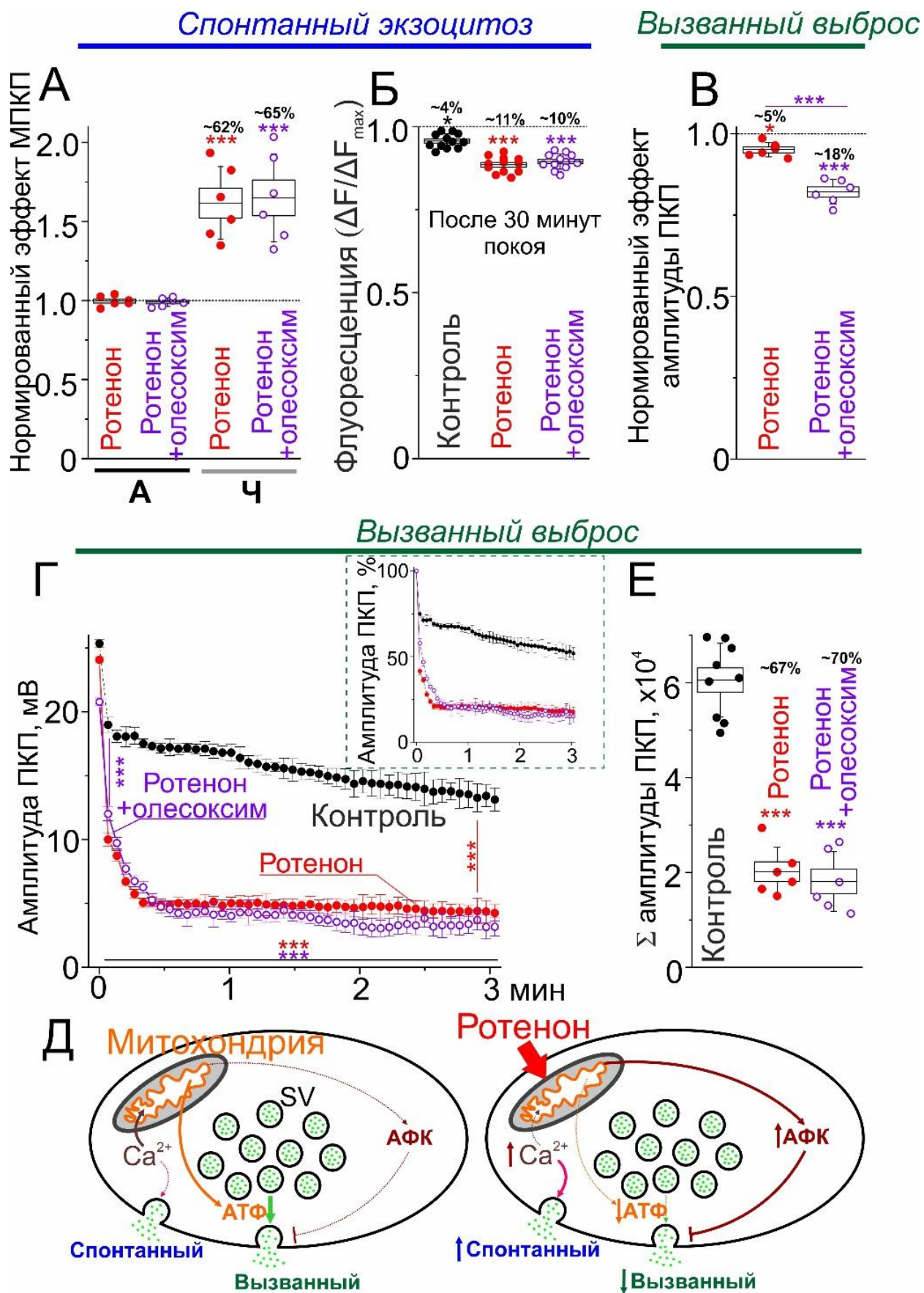


Рис. 26. Влияние на спонтанный выброс нейромедиатора самого ротенона и ротенона в комбинации с олесоксимом. А, Б – представлены значения влияния

самого ротенона и ротенона+олесоксима на спонтанный экзоцитоз от отдельных синапсов. А – изменение амплитуды и частоты МПКП. Б – изменения флуоресценции FM1-43 после 30 мин перфузии в физиологическом растворе (контроль) и в физиологическом растворе, содержащем ротенон или ротенон+олесоксим. А, Б – эти данные указывают на то, что ротенон может увеличивать спонтанное высвобождение нейромедиатора и красителя FM1-43 из СВ. Олесоксим не влиял на действие ротенона. В-Д – эффект самого ротенона и ротенона+олесоксима на вызванный выброс нейромедиатора. В – амплитуда ПКП при частоте 0.5 Гц. Г – депрессия амплитуды ПКП (в мВ) при стимуляции с частотой 20 Гц. Результаты представляют собой средние значения±стандартная ошибка от отдельных мышей (n=6 на группу, исключая контроль n=9). Вставка справа показывает снижение амплитуды ПКП в %, где амплитуда ПКП перед началом стимуляции взята как 100%. Д – кумуляты амплитуд ПКП (в мВ; из Б). В-Д – эти результаты показывают, что ротенон может заметно подавлять вызванный выброс нейромедиатора при интенсивной (20 Гц) активности. Олесоксим не мог модулировать этот эффект ротенона. Е – схематическое изображение предполагаемых путей, с помощью которых митохондрии могут влиять на спонтанное и вызванное высвобождение нейромедиатора. Поглощение Ca^{2+} митохондриями способствует поддержанию цитозольного Ca^{2+} и, таким образом, ограничивает спонтанное высвобождение, которое зависит от Ca^{2+} в состоянии покоя. Производство АТФ митохондриями обеспечивает энергию, необходимую для вовлечения СВ в вызванный выброс нейромедиатора во время интенсивной активности. Кроме того, митохондриальные АФК могут влиять на высвобождение нейромедиатора, действуя прямо или косвенно на белки экзоцитоза. Вероятно, ротенон может увеличивать спонтанное и уменьшать вызванное высвобождение за счёт нарушения функции митохондрий. А-В, Г – результаты представлены в виде значений для отдельных животных (кружки), диапазон прямоугольников – стандартная ошибка, отрезки – стандартное отклонение. Цифры над полями представляют изменение среднего значения (%), по сравнению со значением до аппликации вещества (А-В) или значением в контрольной группе (Д). Ось Y показывает нормированное действие веществ, где 1.0 – значение до аппликации вещества (А, В); относительные изменения флуоресценции FM1-43 (Б), абсолютное значение в мВ (Г, Д). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ рассчитаны с помощью двустороннего непарного t-критерия (А-В, Д) или повторного дисперсионного анализа с последующей коррекцией Бонферрони (Г).

3.3.4 Анион (Cl^-) -зависимый эффект олесоксима

Увеличение концентрации Cl^- в растворе угнетало выгрузку FM1-43 (на ~15%) при стимуляции с частотой 20 Гц (рис. 27А). Угнетающее действие олесоксима на выгрузку FM1-43 было заметно усилено в растворе, содержащем высокую концентрацию Cl^- (рис. 27А).

Аналогичным образом, повышение внеклеточного уровня Cl^- усиливало снижение амплитуды ПКП в ответ на высокочастотную стимуляцию, а депрессивный эффект олесоксима на амплитуду ПКП при стимуляции с частотой 20 Гц заметно усиливался в присутствии раствора с высоким содержанием Cl^- (рис. 27). Соответственно, олесоксим и увеличение внеклеточной концентрации Cl^- имели сходные депрессантные эффекты на экзоцитоз СВ при активности с частотой 20 Гц. Кроме того, увеличение внешнего уровня Cl^- увеличивало способность олесоксима подавлять экзоцитоз нейромедиатора. S-18, ингибитор плазматических VDAC, уменьшал отрицательный эффект олесоксима (рис. 27В).

Чтобы оценить изменение внутриклеточного уровня Cl^- , нервные окончания были загружены флуоресцентным индикатором Cl^- MEQ, флуоресценция которого подавляется при поступлении анионов Cl^- (Biwersi, Verkman, 1991; Chub et al., 2006). Флуоресценция в нервных окончаниях была относительно стабильной в условиях покоя и увеличивалась в ответ на воздействие раствора, содержащего более низкую концентрацию Cl^- (из-за использования Na^+ -глюконата вместо NaCl в физиологическом растворе). Это указывает на чувствительность красителя MEQ, загруженного в нервные окончания, к изменению уровня Cl^- . Олесоксим незначительно и временно снижал флуоресценцию MEQ в условиях покоя (рис. 24С). Этот эффект олесоксима предотвращался ингибиторами белка VDAC (DIDS и S-18). Сами по себе DIDS и S-18 не влияли на флуоресценцию (рис. 24Г). Стимуляция с частотой 20 Гц немного снизила сигнал MEQ; олесоксим вызывал более значительное падение флуоресценции во время серии стимулов (рис. 27Д). Ингибиторы VDAC предотвращали это действие олесоксима, в то время как DIDS или S-18 по отдельности не изменяли временной ход флуоресценции MEQ при частоте

активности 20 Гц (рис. 27Е). 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 VDAC.

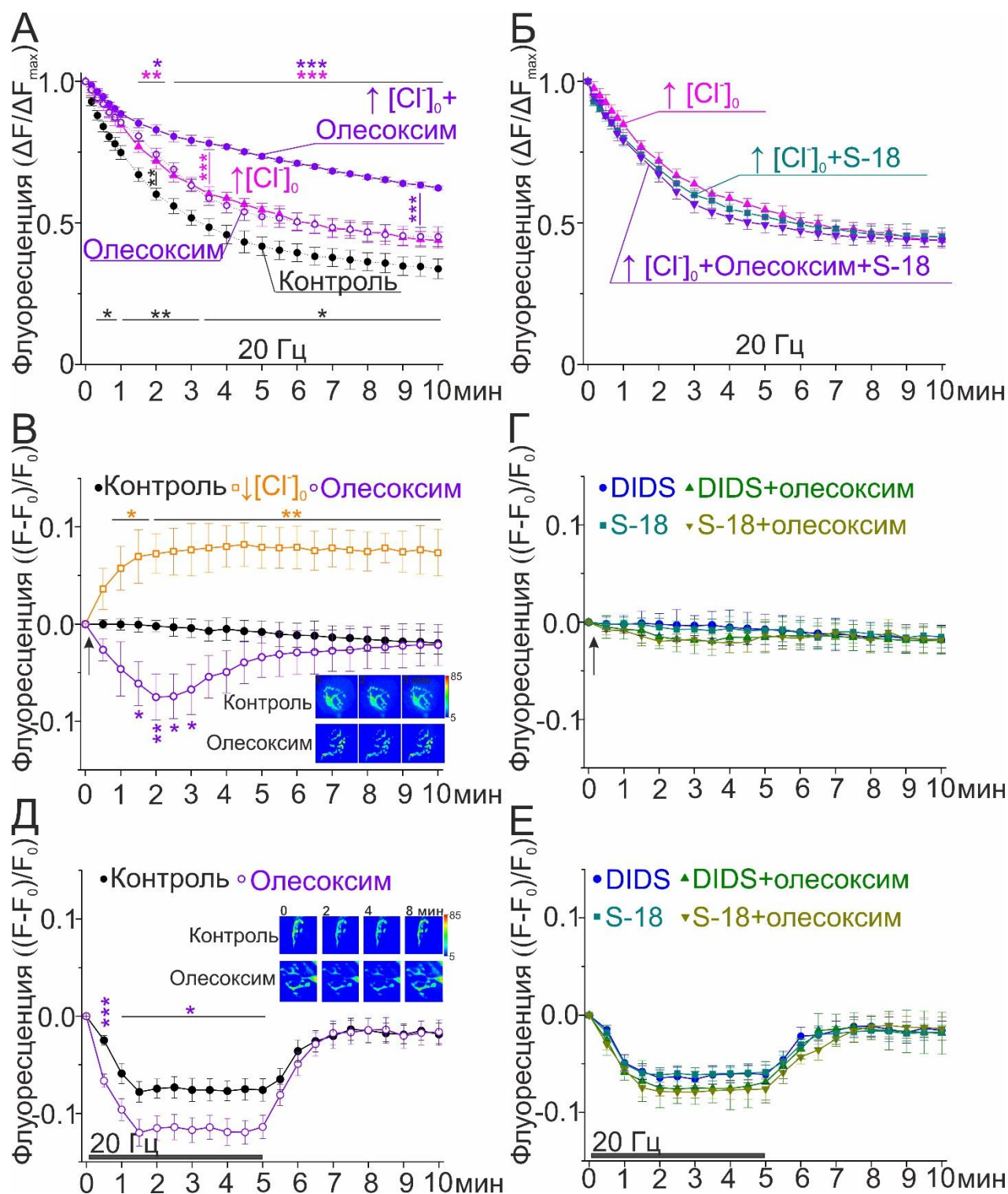


Рис. 27. Роль Cl^- в эффектах модуляторов VDAC. А, Б – эффекты модуляторов белка VDAC (олесоксим и S-18) на выгрузку FM1–43 при частоте

стимуляции 20 Гц в присутствии высокого внеклеточного Cl^- ($\uparrow[\text{Cl}^-]_o$). Кривые выгрузки FM1-43 контрольных мышц и мышц, обработанных олесоксимом (из рис. 24А), показаны на А в виде пунктирных кривых. А, Б: ось Y – интенсивность флуоресценции ($\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$), где 1.0 – значение до стимуляции с частотой 20 Гц. В-Е – изменения флуоресценции чувствительного к Cl^- красителя (MEQ) в покое (В, Г) и во время стимуляции с частотой 20 Гц (Д, Е) на фоне модуляторов VDAC. MEQ загружается в двигательные нервные окончания, и его флуоресценция подавляется при связывании с Cl^- . Снижение уровней внеклеточного Cl^- ($\downarrow[\text{Cl}^-]_o$) вызывало усиление флуоресценции MEQ (В). Острое воздействие олесоксима временно уменьшило сигнал MEQ (В). Кроме того, стимуляция с частотой 20 Гц более заметно снижала флуоресценцию MEQ в мышцах, предварительно обработанных олесоксимом (Д). В, Д – справа изображения, иллюстрирующие эти изменения интенсивности флуоресценции; соответствующие шкалы интенсивности приведены справа (о.е.). Г, Е – эффекты олесоксима не наблюдались в присутствии ингибиторов VDAC (DIDS и S-18). Стрелки (В, Г) и горизонтальные линии (Д, Е) указывают на момент добавления олесоксима и последовательность стимулов с частотой 20 Гц, соответственно. В-Е: ось Y – относительная интенсивность флуоресценции, рассчитанная по формуле $(F-F_0)/F_0$, где F_0 – изначальная флуоресценция перед добавлением олесоксима (В, Г) или началом стимуляции с частотой 20 Гц (Д, Е). А-Е – среднее значение $\pm$ стандартная ошибка; $n=12$ для каждой группы. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ – повторный дисперсионный анализ с последующим тестом Бонферрони.

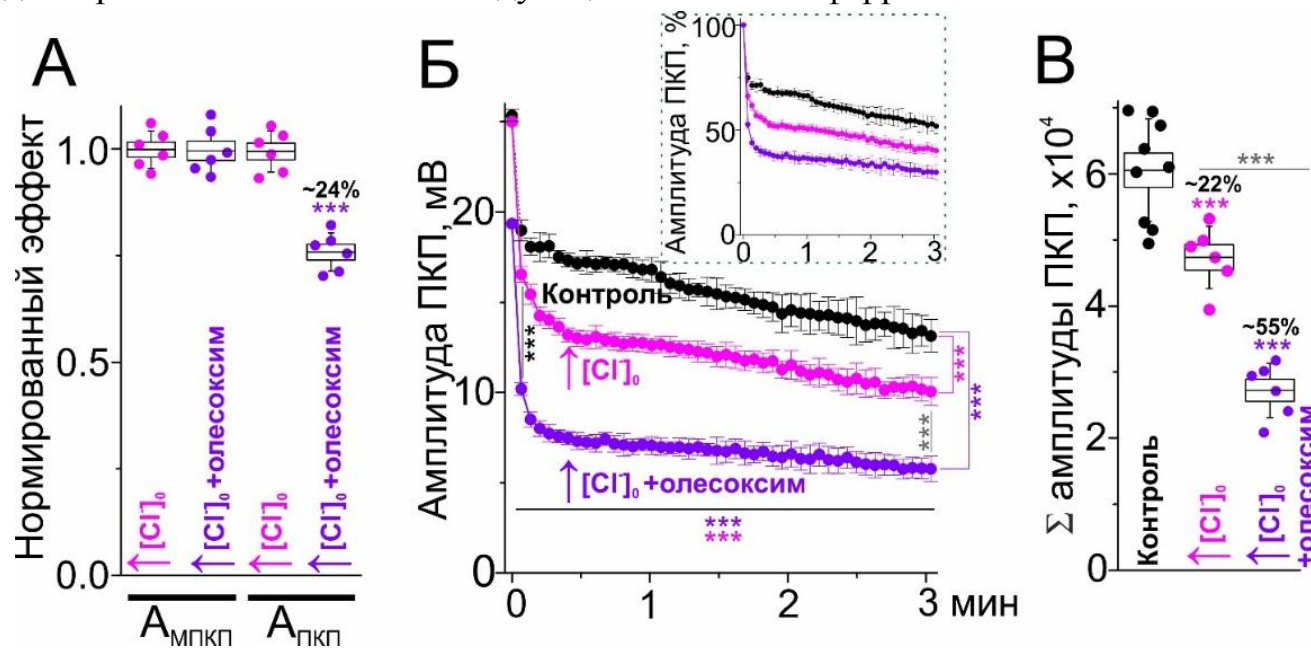


Рис. 28. Собственное влияние высокого внеклеточного Cl^- ($[\text{Cl}^-]_o$) и в сочетании с олесоксимом на высвобождение нейромедиатора. А – влияние высокой $[\text{Cl}^-]_o$ и высокой $[\text{Cl}^-]_o + \text{олесоксима}$ на амплитуды МПКП и ПКП (при

частоте стимуляции 0.5 Гц). Ось Y – нормированный эффект высокой $[Cl^-]_o$ и высокой $[Cl^-]_o$ +олесоксима (1.0 – значение до аппликации). Б – изменение амплитуды ПКП (в мВ) во время стимуляции с частотой 20 Гц в контроле и в мышцах, предварительно обработанных высокой $[Cl^-]_o$ и высокой $[Cl^-]_o$ +олесоксимом. Вставка показывает снижение амплитуды ПКП, выраженная в %, где амплитуда ПКП непосредственно перед началом стимуляции установлена как 100%. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка на отдельных мышцах (n=6 на группу, исключая контроль n=9). В – кумуляты амплитуд ПКП (в мВ; из Б). А-В: ***P<0.001 – использовался двусторонний непарный t-критерий (А, В) или повторный дисперсионный анализ с последующим тестом Бонферрони (Б). А, В – результаты представлены в виде значений для отдельных животных (кружки), диапазон прямоугольников – стандартная ошибка, отрезки – стандартное отклонение. Числа над полями представляют собой уменьшение (%) среднего значения, по сравнению со значением до аппликации (А) или со значением в контрольной группе (В).

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Механизм действия 25ГХ на нервно-мышечную передачу

4.1.1 Потенциальная роль 25ГХ в скелетной мышце

Появляется все больше доказательств того, что оксистерины и холестерин-подобные соединения являются мощными регуляторами синаптической передачи, включая нервно-мышечную (Linsenhardt et al., 2014; Krivoi, Petrov, 2019; Zakyrganova et al., 2020). Различные патологические состояния, в том числе связанные с окислительным стрессом, могут быть связаны со специфическими изменениями в составе оксистерinov в тканях и (или) плазме крови. Гипотетически, некоторые оксистерины, особенно те, которые экспрессируются определенными типами клеток, могут выполнять пара- и (или) эндокринную функцию.

В нормальных условиях выработка 25ГХ незначительная, но его содержание заметно увеличивается во время воспаления. Это происходит в основном из-за повышения уровня C25CH в активированных макрофагах и дендритных клетках (Cyster et al., 2014). Избыток АФК, генерируемые активированными макрофагами, могут непосредственно окислять холестерин до оксистерinov, включая 25ГХ (Sottero et al., 2019). ИФН и провоспалительные цитокины, а также сам 25ГХ способствуют экспрессии C25CH в макрофагах (Cao et al., 2020). В скелетных мышцах макрофаги могут вступать в тесный контакт с НМС после повреждения нервов или в случае денервирующих патологий, включая БАС и спинальную мышечную атрофию. В этом случае активация макрофагов (например, в результате инъекции липополисахарида, который также усиливает экспрессию C25CH) (Sottero et al., 2019) может способствовать реиннервации (Rios et al., 2021). Следует отметить, что воспаление, нервно-мышечные дефекты и денервация могут вызвать резистентность к недеполяризующим нервно-мышечным блокирующим препаратам (Bolton, 1993; Fink et al., 2003; Fink et al., 2008). Соответственно, 25ГХ может опосредовать

влияние макрофагов, а также системного воспаления на нервно-мышечную передачу.

Действительно, мы обнаружили, что 25ГХ в физиологических и более высоких концентрациях, связанных с воспалением, заметно влияет на нейротрансмиттерную передачу в НМС. Низкие концентрации (0.01-0.1 мкМ) 25ГХ подавляли нейротрансмиттерную передачу, в то время как более высокие концентрации 25ГХ (1-10 мкМ) оказывали противоположный эффект. Вероятно, эффект низких концентраций 25ГХ связан с базальной продукцией 25ГХ неиммунными клетками, в то время как эффект более высоких концентраций связан с продукцией 25ГХ иммунными клетками при воспалительных процессах. С этой идеей согласуется тот факт, что базальные концентрации 25ГХ в тканях и плазме оцениваются в диапазоне 0.01-0.1 мкМ, а при воспалении уровень 25ГХ может повышаться до 1 мкМ (Dodge et al., 2021; Zakutjanova et al., 2021). Кроме того, возможно, что уровень 25ГХ, образующегося в ходе иммунного ответа, определяет, будет ли преобладать угнетающее или стимулирующее действие 25ГХ на нейротрансмиттерную передачу. Аналогичным образом, двойное действие 25ГХ проявляется и в отношении иммунных процессов. Действительно, противовоспалительное или провоспалительное действия 25ГХ, а также его анти- или проапоптотические эффекты могут иметь концентрационно-зависимый характер (Cyster et al., 2014; Dodge et al., 2021).

4.1.2 Ключевые этапы синаптической передачи, чувствительные к 25ГХ

25ГХ-опосредованная модуляция нервно-мышечной передачи основывается на изменениях в высвобождении нейромедиатора во время умеренно-частотной активности. Наномолярная концентрация 25ГХ увеличивала угнетение высвобождения нейромедиатора при стимуляции с частотой 20 Гц, тогда как микромолярные концентрации оказывали противоположный эффект. В то же время высвобождение нейромедиатора в ответ на одиночные стимулы, а также спонтанное высвобождение и постсинаптическая рецепция нейромедиатора не изменялись. Такие данные позволяют предположить, что 25ГХ может влиять в основном на мобилизацию СВ. В поддержку этого предположения 25ГХ в

наномолярной и микромолярной концентрациях снижал и повышал скорость выгрузки FM1-43, что указывает на замедление или ускорение рекрутирования СВ в экзоцитоз, соответственно. Другие оксистерины, например, 24ГХ и 5 α -холестан-3-он, также могут модулировать вовлечение СВ в экзоцитоз (Kasimov et al., 2015; Mukhutdinova et al., 2019; Zefirov et al., 2020).

4.1.3 Рецепторы и сигнальные молекулы, вовлеченные в эффект 25ГХ

В настоящем исследовании мы сосредоточились на оценке механизма, лежащего в основе стимулирующего действия 25ГХ в концентрации 1 мкМ (характерная концентрация при воспалениях). Ранее мы обнаружили, что стимулирующее действие кратковременной аппликации 24ГХ на мобилизацию СВ зависит от активности NMDA-рецепторов в НМС мышей (Kasimov et al., 2017). Предполагается, что, как и 24ГХ, 25ГХ может взаимодействовать с NMDA-рецепторами (Linsenhardt et al., 2014). Однако ингибирование NMDA-рецепторов не модулировало стимулирующий эффект 25ГХ, в то время как антагонист LX-рецепторов предотвратил его. Известно, что ядерные LX-рецепторы опосредуют ряд геномных эффектов 25ГХ (Kasimov et al., 2016; Cao et al., 2020) и могут играть защитную роль, усиливая антиоксидантный ответ через гены-мишени Nrf 2 в периферической нервной системе (Nichor et al., 2018). Однако синаптическое действие 25ГХ происходило в течение 1/3 ч, что указывает на негеномный путь. Ранее было обнаружено, что LX-рецепторы могут быть связаны с плазматическими мембранами, и активация мембранно-связанных LX-рецепторов опосредует быстрый ответ в эндотелии сосудов (Ishikawa et al., 2013) и тромбоцитах (Unsworth et al., 2018). Более того, в эндотелиальных клетках LX β -рецептор (повсеместно распространенный подтип (Wang, Tontonoz, 2018)) преимущественно находится во фракциях липидных рафтов, где LX β -рецептор образует комплекс с ЭР α (Ishikawa et al., 2013). В соответствии с этим, в НМС был обнаружен точечный паттерн иммунопозитивного окрашивания на LX β -рецептор, и окрашивание LX β -рецепторов было размыто после разрушения липидных рафтов с помощью МВЦД. Кроме того, дестабилизация липидных рафтов и

ингибирование ЭР α предотвратили стимулирующий эффект 25ГХ на рекрутирование СВ в экзоцитоз. В совокупности эти данные позволяют предположить, что существуют пресинаптические рафт-ассоциированные LX-рецепторы, через активацию которых 25ГХ увеличивает мобилизацию СВ в НМС рафт- и ЭР α -зависимым образом. Отметим, что в эндотелиальных клетках стимуляция LX-рецепторов синтетическим агонистом T1317 может привести к активации ЭР α благодаря прямому взаимодействию LX-рецепторов с активным сайтом ЭР α в липидных рафтах (Ishikawa et al., 2013). Мало что известно о роли LX-рецепторов в синаптической передаче, особенно в НМС. Однако дефицит LX β -рецепторов приводит к ранней денервации и гибели двигательных нейронов (Bigini et al., 2010), что позволяет отметить его важную роль для нервно-мышечной функции. Более того, генетическая абляция как LX α -, так и LX β -рецепторов, вызывает локомоторный дефицит, сопровождающийся повышенной продукцией супероксид анионов, окислением липидов и карбонилированием белков в седалищных нервах (Nichor et al., 2018).

4.1.4 Роль Ca²⁺ в эффекте 25ГХ на синаптическую передачу

Внутриклеточный Ca²⁺ является главным регулятором всех этапов рециклирования СВ, включая вовлечение СВ в экзоцитоз (Rizzoli, 2014). Оценка цитозольного Ca²⁺ показала, что 25ГХ (1 мкМ) вызывает транзиторное повышение уровня Ca²⁺ (с пиком на ~75 сек после начала аппликации), которое частично подавляется антагонистом LX-рецепторов, но не ингибиторами других чувствительных к 25ГХ рецепторов, в частности NMDA-рецепторов и GPR183. Кроме того, ингибирование ИТФ-рецепторов полностью предотвратило 25ГХ-индуцированное увеличение цитозольного Ca²⁺, в то время как ингибитор Ри-рецепторов, а также удаление внеклеточного Ca²⁺ (в присутствии внешнего Ca²⁺ буфера) не повлияли на всплеск Ca²⁺. Таким образом, 25ГХ может увеличивать высвобождение Ca²⁺ из ЭПР в LX- и ИТФ-рецептор-зависимой манере в НМС. Интересно, что в макрофагах 25ГХ (10 мкМ) может вызывать апоптоз через

снижение активности антиапоптотического пути $\text{ORP4L}/\text{G}\alpha_{q/11}/\text{ФЛС}\beta 3/\text{ИТФ-рецептор}/\text{Ca}^{2+}$ (Zhong et al., 2016).

Потенциально, повышение внутриклеточного Ca^{2+} может способствовать усилению мобилизации СВ. Действительно, хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} медленным буфером EGTA-AM, а также ингибирование Ca^{2+} -зависимой ПКС предотвратили влияние 25ГХ на высвобождение красителя экзоцитозом при стимуляции с частотой 20 Гц. Следовательно, 25ГХ, вызывая увеличение внутриклеточного Ca^{2+} и последующую активацию ПКС, усиливал вовлечение СВ в экзоцитоз в НМС. В синапсах Хельда (гигантский синапс ЦНС) нокаут Ca^{2+} -зависимых изоформ ПКС ингибировал мобилизацию СВ в готовый к освобождению пул, предполагая, что ПКС может опосредовать Ca^{2+} -зависимое облегчение мобилизации СВ (Jin et al., 2019).

Потенциальный сигнальный путь, посредством которого комплекс $\text{LX-рецептор}/\text{ЭР}\alpha$ вызывает высвобождение Ca^{2+} через ИТФ-рецептор и последующую активацию $\text{Ca}^{2+}/\text{ДАГ}$ -зависимой ПКС, может основываться на стимуляции G_i -белка и ФЛС. Ранее было установлено, что мембраноассоциированный $\text{ЭР}\alpha$ напрямую связывается с α -субъединицей и $\beta\gamma$ -димером G_i -белка, и эти взаимодействия с последующей активацией G-белка необходимы для негеномных эффектов эстрадиола в эндотелиальных клетках (Kumar et al., 2007). Кроме того, во многих случаях сигнальных событий, связанных с сопряженными с G-белками рецепторами, $\beta\gamma$ -димер G_i -белка может стимулировать активность различных изоформ ФИ-ФЛС, что приводит к продукции ИТФ и ДАГ (Smrcka, 2008). Использование специфических ингибиторов позволило идентифицировать сигнальные молекулы, участвующие в действии 25ГХ в НМС. Действительно, ингибирование G_i -белка, а также $\beta\gamma$ -димера G_i -белка и ФЛС предотвратило стимулирующий эффект микромолярной концентрации 25ГХ на темп экзоцитоза СВ при стимуляции с частотой 20 Гц. Таким образом, 25ГХ может усиливать мобилизацию СВ через путь $\text{LX-рецептор}/\text{ЭР}\alpha/\text{G}_i\text{-белок}/\beta\gamma\text{-димер } \text{G}_i\text{-белка}/\text{ФЛС}/\text{Ca}^{2+}/\text{ПКС}$. Удивительно, но

ингибитор ФХ-ФЛС также подавлял эффект 25ГХ. Одна из возможностей заключается в том, что $\beta\gamma$ -димер G_i -белка может также активировать ФХ-ФЛС.

4.1.5 Роль АФК и альтернативные пути сигнализации в эффекте 25ГХ

Ca^{2+} сигнализация тесно связана с окислительно-восстановительными процессами, и повышенный уровень Ca^{2+} может вызвать увеличение продукции АФК через множество механизмов (Gorlach et al., 2015; Ursan et al., 2020). В соответствии с этим, в ответ на аппликацию 25ГХ было обнаружено относительно медленное Ca^{2+} -зависимое увеличение внутриклеточной продукции АФК, сопряженное с повышением внеклеточного уровня H_2O_2 . В то же время перекисного окисления липидов не наблюдалось, что указывает на чисто сигнальное действие АФК в этих условиях. Действительно, антиоксидант частично подавлял стимулирующее действие 25ГХ на скорость высвобождения красителя из СВ при стимуляции с частотой 20 Гц. Следовательно, Ca^{2+} -индуцированное усиление продукции АФК может способствовать эффекту 25ГХ. Один из возможных механизмов заключается в том, что АФК наряду с Ca^{2+} и ДАГ может повышать активность ПКС (Giniatullin, Giniatullin, 2003; Cosentino-Gomes et al., 2012; Ursan et al., 2020).

Следует отметить, что ингибирование LX-рецепторов, $ER\alpha$, G_i -белка, $\beta\gamma$ -димера G_i -белка или ФХ-ФЛС, а также разрушение липидных рафтов не только предотвращало стимулирующее действие микромолярной концентрации 25ГХ на мобилизацию СВ, но и инвертировало эффект 25ГХ (1 мкМ). Вероятно, когда этот зависящий от рафтов сигнальный путь LX-рецептор/ $ER\alpha$ / G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G_i -белка/ФХ-ФЛС блокируется, 25ГХ может действовать через альтернативный путь, который обычно активируется 25ГХ при наномолярных концентрациях. Это переключение со стимулирующего на ингибирующий эффект предполагает существование перекрестного взаимодействия между этими путями, индуцируемые низкими и высокими концентрациями 25ГХ. Более того, в условиях ингибирования ФХ-ФЛС или ПКС, а также внутриклеточного хелатирования Ca^{2+} , 25ГХ полностью терял способность влиять на скорость

экзоцитоза СВ. Можно предположить, что ФИ-ФЛС/ Ca^{2+} /ПКС могут быть общим «сегментом», где происходит конвергенция сигнальных путей, индуцированных нано- и микромолярными концентрациями 25ГХ в НМС.

4.2 Вовлечение 25ГХ в боковой амиотрофический склероз

Интересно, что гиполипидемия присутствует у mSOD мышей на досимптомной стадии (Kim et al., 2011). Кроме того, было показано, что накопление церамида в спинном мозге предшествовало развитию фенотипа у mSOD мышей (Cutler et al., 2002). Эти данные согласуются с нарушением липидного обмена у пациентов с БАС и с тем, что гиперлипидемия отрицательно коррелирует с тяжестью БАС (Cutler et al., 2002; Dupuis et al., 2008; Krivoi, Petrov, 2019; Ingre et al., 2020). Вероятно, повышение уровня холестерина в плазме крови может влиять на свойства мембран и тем самым облегчить прогрессирование БАС. Это согласуется со способностью холестерин-подобной и рафт-стабилизирующей молекулы олесоксима проявлять защитные свойства в моделях БАС (Kasimov et al., 2016; Weber et al., 2019; Zakyrganova et al., 2020). Более того, нейрон-специфическая сверхэкспрессия рафт-организующего белка кавеолина-1 увеличила локализацию TrkB в рафтах, улучшила функционирование НМС и выживаемость mSOD мышей (Sawada et al., 2019). Липидные рафты могут модулировать сигналы, зависящие от TrkB и аденозиновых рецепторов A2, тем самым защищая нейроны от токсичности, вызванной мутацией SOD1 (Mojsilovic-Petrovic et al., 2006). Заманчиво предположить, что изменения свойств мембран в НМС могут происходить на ранних стадиях БАС, тем самым приводя к нарушению «нормальной» сигнализации и способствуя патологическим изменениям.

4.2.1 Ранние липидные альтерации в патологии БАС

Нами были обнаружены ранние липидные аномалии у mSOD мышей. Они представляли собой снижение меченых маркерами липидных рафтов, увеличение текучести мембран и нарушение упорядоченности. Все эти изменения указывают

на нарушение целостности липидных рафтов у mSOD мышей. Учитывая, что изменения были более выражены в синаптической области, по сравнению с внесинаптическими участками, мембрана НМС кажется более уязвимой для связанного с заболеванием липидного дисбаланса. В соответствии с нашими данными, многочисленные изменения (в основном подавление) в экспрессии белков во фракции рафтов были продемонстрированы в спинном мозге mSOD мышей на начальной стадии. Среди этих белков (с измененным уровнем) около 20% участвовали в пресинаптическом везикулярном траффике и высвобождении нейромедиатора (Zhai et al., 2009). Потеря функции сигма-рецепторов, наблюдаемая при спорадическом БАС, вызвала дестабилизацию липидных рафтов в двигательных нейроноподобных клетках NSC34, тем самым приводя к нарушению мобилизации $[Ca^{2+}]_{in}$ и эндосомального траффика (Vollrath et al., 2014).

4.2.2 Предполагаемый механизм изменения мембранных свойств при БАС. Связь с нарушениями нервно-мышечной передачи

Снижение целостности липидных рафтов может быть опосредовано истощением холестерина, который служит «клеем» для формирования рафтов. Однако уровень холестерина в гомогенатах мышц у mSOD мышей не изменился (Zakurjanova et al., 2021). Аналогично, содержание холестерина в первичных нейронах коры головного мозга mSOD мышей было таким же, как у мышей дикого типа (Antonini et al., 2018). Накопление церамида может снизить стабильность липидных рафтов в мышцах при двигательной разгрузке до начала атрофии (Petrov et al., 2017; Bryndina et al., 2018; Petrov et al., 2019). В данном случае мы обнаружили значительно более высокие уровни церамида у mSOD мышей до начальной стадии атрофии (Zakurjanova et al., 2021), что сопровождалось повышенной способностью накапливать экзогенный церамид избирательно в НМС. Важно отметить, что избыток церамида был обнаружен в спинном мозге у пациентов с БАС (Cutler et al., 2002). Накопление церамида в спинном мозге у двух вариантов mSOD мышей ($SOD1^{G93A}$ и $SOD1^{G86R}$)

наблюдалось до проявления признаков БАС (Cutler et al., 2002; Henriques et al., 2015). Отложение церамида и нарушение липидных рафтов в НМС указывают как на потенциально взаимосвязанные события на стадии, предшествующие началу развития патологии.

Исследования, использующие экстракцию или окисление холестерина в качестве подходов для разрушения рафтов, показывают, что нервно-мышечная передача весьма чувствительна к снижению целостности липидного рафта (Krivoi, Petrov, 2019). В НМС незначительное истощение холестерина заметно увеличивало внеклеточные уровни холина/АХ (из-за усиления некантового высвобождения) (Petrov et al., 2011). Соответственно, наблюдаемые на предначальной стадии изменения в высвобождении АХ (а именно, заметное увеличение уровня внеклеточного холина) могут быть вызваны потерей целостности липидных рафтов. В пользу этого предположения говорит тот факт, что добавление холестерина к плазматической мембране (метод стабилизации рафтов) снизило содержание внеклеточного холина у mSOD мышей. Это может отражать подавление некантового высвобождения АХ. Отметим, что избыток АХ может усугубить дегенерацию НМС у mSOD мышей и вызвать преждевременные возрастные структурные изменения (включая фрагментацию концевой пластинки) НМС (Sugita et al., 2016).

Предыдущие исследования показали увеличение амплитуды и уменьшение времени нарастания миниатюрных потенциалов концевой пластинки в диафрагме mSOD мышей на предначальной стадии (Rocha et al., 2013). Эти аномалии могут быть связаны с изменением кластеризации nXP, а именно с фрагментацией концевых пластинок у mSOD мышей. Следует отметить, что липидные рафты участвуют в контроле распределения и активности nXP (Pato et al., 2008; Krivoi, Petrov, 2019). Следовательно, дезинтеграция липидных рафтов может способствовать фрагментации кластеров nXP и изменению их функциональности. Добавление холестерина может стабилизировать кластеры nXP, спасая

синаптические области от фрагментации в денервированной мышце (Willmann et al., 2006).

В одном исследовании было обнаружено снижение активности АХЭ в биопсии мышц пациентов с БАС (Fernandez et al., 1986). Фракция АХЭ может быть закреплена в синаптических мембранах благодаря взаимодействию с липидными рафтами (Moral-Naranjo et al., 2008). Однако добавление экзогенной АХЭ не изменило процент увеличения уровня холина у mSOD мышей, по сравнению с животными дикого типа. Этот факт свидетельствует об отсутствии выраженной разницы в активности нативной АХЭ у mSOD мышей, по сравнению с мышами дикого типа.

Нарушение липидных рафтов может вызывать окислительный стресс через различные механизмы (Petrov et al., 2014; Ursan et al., 2020). В частности, истощение холестерина вызвало рост продукции АФК, зависимой от НАДФН-оксидазы, а также перекисное окисление липидов в НМС (Petrov et al., 2014). В данном случае мы обнаружили повышенный уровень гидроперекисей в гомогенатах мышц (Zakurjanova et al., 2021) и признаки перекисного окисления липидов в НМС mSOD мышей. Гипотетически, они могут представлять собой последствия дезорганизации липидных рафтов. Примечательно, что гидроперекиси липидов могут модифицировать белок SOD1, способствуя его агрегации, что может иметь пагубные последствия (Dantas et al., 2020).

4.2.3 Эффект 25ГХ на мембранные свойства при БАС

Окисленные производные холестерина являются важным классом модуляторов многочисленных клеточных функций, включая нервно-мышечную передачу (Krivoi, Petrov, 2019; Brown et al., 2021). Выраженные изменения уровней некоторых оксистеринов при нейродегенеративных заболеваниях позволяют рассматривать оксистерины как маркеров нарушений и (или) факторов, способствующих их патогенезу (Petrov et al., 2017; Griffiths, Wang, 2019). Среди оксистеринов уровень 25ГХ в сыворотке и СМЖ был выше у

пациентов с БАС с продолжительностью заболевания около одного года, по сравнению со здоровыми людьми. Кроме того, экспрессия мРНК 25ГХ-продуцирующих ферментов была повышена в мозге mSOD мышей на стадии, предшествующей началу заболевания, но позже снижалась (Kim et al., 2017). Уровень 7 α ,25-дигидроксихолест-4-ен-3-она, производного 25ГХ, также был выше в сыворотке, но ниже в СМЖ у пациентов с БАС (Abdel-Khalik et al., 2017). Таким образом, 25ГХ может быть связан с БАС. Концентрация 25ГХ резко повышается под воздействием многочисленных воспалительных стимулов (Bauman et al., 2009; Cyster et al., 2014, Shen et al., 2017). В свою очередь, повышение уровня 25ГХ может регулировать многочисленные аспекты иммунного ответа, формируя петли отрицательной и положительной обратной связи (Cyster et al., 2014). В целом, 25ГХ обладает противовирусной и кардиопротекторной активностью, а также модулирует воспаление и метаболизм холестерина (Bauman et al., 2009; Cyster et al., 2014; Cívrá et al., 2018; Lv et al., 2020). В данном случае мы обнаружили, что острая аппликация 25ГХ увеличивает упорядоченность липидов и встраивание ганглиозида GM1 в плазматическую мембрану, а также снижает текучесть мембраны и поглощение церамида в НМС mSOD мышей. Следовательно, 25ГХ способствует формированию липидных рафтов и может подавлять накопление церамида в НМС mSOD мышей. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями, показавшими, что 25ГХ способствует образованию микродоменов в модельных мембранах из смесей насыщенных и ненасыщенных липидов (Xu, London, 2000) и изменяет трафик церамида через мембранные контактные сайты (Perry, Ridgway, 2006; Goto et al., 2018). Кроме того, 25ГХ может влиять на клеточное перераспределение холестерина за счет изменения транспорта холестерина через мембранные контактные сайты (Cívrá et al., 2018).

Важно отметить, что 25ГХ воздействовал на мембраны только у mSOD мышей, тогда как у мышей дикого типа он не оказывал заметного влияния. Функциональные изменения сайтов связывания 25ГХ (например, многочисленные

оксистерин-связывающие белки) могут быть причиной более высокой чувствительности мембран mSOD мышей к 25ГХ. Два наблюдения указывают на участие оксистерин-связывающих белков в развитии БАС. Во-первых, важный регулятор оксистерин-связывающих белков везикула-ассоциированный мембранный белок В (VAPB) снижен в спинном мозге пациентов с БАС и mSOD мышей на начальной стадии заболевания (Teuling et al., 2007). Во-вторых, мутации в VAPB вызывают наследственную форму БАС, а сверхэкспрессия оксистерин-связывающих белков может уменьшить фенотип мутантного VAPB в клетках HeLa (Moustaqim-Barrette et al., 2014; Darbyson, Ngsee, 2016). Отметим, что оксистерин-связывающие белки могут опосредовать влияние 25ГХ на трафик церамида и распределение холестерина в мембране (Perry, Ridgway, 2006; Civra et al., 2018; Goto et al., 2018). В данном случае мы обнаружили, что флуоресцентный 25ГХ – 25-(C4 TopFluor®) 25-ОН-холестерин, который селективно взаимодействует с оксистерин-связывающими белками (Holtta-Vuori et al., 2008; Jansen et al., 2011), более эффективно поглощается в НМС mSOD мышей, а 25ГХ может конкурировать с 25-(C4 TopFluor®) 25-ОН-холестерином. Соответственно, более высокая способность улавливать оксистерин может быть причиной того, что 25ГХ преимущественно влияет на свойства мембран у mSOD мышей. Важно отметить, что 25ГХ в НМС у mSOD мышей изменял липидные свойства в противоположном направлении, в отличие от мышей дикого типа. Это позволяет предположить, что длительное введение 25ГХ может влиять на НМС у мышей с моделью БАС. Действительно, хроническое введение 25ГХ предотвратило снижение липидной упорядоченности, а также повышение поглощения флуоресцентного церамида в НМС mSOD мышей. Кроме того, длительное введение 25ГХ предотвратило появление синаптических аномалий, а именно перекисного окисления липидов, повышения уровня внеклеточного холина и фрагментации кластеров nHP.

Таким образом, 25ГХ может противодействовать ранним изменениям в НМС, связанным с БАС, и, следовательно, повышение 25ГХ у пациентов с БАС

может представлять собой компенсаторный механизм. В случае БАС наблюдается уникальная ситуация, когда гиперхолестеринемия оказывает благоприятное воздействие, в то время как препараты, снижающие уровень холестерина, усугубляют патологию (Cutler et al., 2002; Dupuis et al., 2008; Zheng et al., 2013; Krivoi, Petrov, 2019; Ingre et al., 2020). Уровень 25ГХ повышен в сыворотке крови при гиперхолестеринемии и снижается в ответ на лечение статинами (Johnson et al., 1994; Dias et al., 2018). Предположительно, повышение уровня 25ГХ может быть причиной положительного эффекта гиперхолестеринемии при БАС.

4.3 Механизм действия синтетического производного холестерина олесоксима

4-холестен-3-он, оксим (олесоксим или TRO19622) представляет собой производное холестерина, который считается многообещающим средством лечения нейродегенеративных заболеваний, включая боковой амиотрофический склероз, периферическую невропатию, спинальную мышечную атрофию, болезни Хантингтона и Паркинсона (Bordet et al., 2007; Weber et al., 2019). Ранее мы обнаружили, что олесоксим может модулировать нейротрансдукцию в НМС лягушки, но лежащий в основе механизм не был идентифицирован (Kasimov et al., 2016). Теоретически механизм обеспечения синаптической передачи может способствовать нейропротекторным свойствам олесоксима и представлять собой новый путь регуляции нейротрансдукции холестерин-подобными молекулами.

4.3.1 Предполагаемая роль VDAC в эффекте олесоксима

Олесоксим нацелен на VDAC на внешней митохондриальной мембране, и это взаимодействие необходимо для предотвращения образования комплекса транзитной митохондриальной поры, окислительного стресса и апоптоза (Bordet et al., 2007; Bordet et al., 2010; Martin et al., 2011; Weber et al., 2019; Rovini et al., 2020). Однако несколько исследований указали на локализацию белка VDAC в плазмалемме (Bahamonde et al., 2003; Bahamonde, Valverde, 2003; Baker et al., 2004; Rahbar, Fenselau, 2004; Elinder et al., 2005), включая нейрональные и

синаптические плазматические мембраны (Stevens et al., 2003; Jordan et al., 2004; Phillips et al., 2005; Xiong et al., 2009). В соответствии с этими исследованиями, в НМС обнаружено иммуномечение VDAC. Омические методы показали, что VDAC является белком пресинаптической активной зоны (Morciano et al., 2009; Volkandt, Karas, 2012; Lassek et al., 2014), и все три изоформы VDAC были обнаружены во фракциях активных зон (Morciano et al., 2005; Morciano et al., 2009), а также в мембранах СВ (Takamori et al., 2006). Эти данные указывают на наличие роли VDAC белка, локализованного на пресинаптической мембране. Высокий уровень холестерина в нервных окончаниях и мембранах СВ (Krivoi, Petrov, 2019) может быть одним из механизмов закрепления VDAC в пресинаптических мембранах. На самом деле, VDAC содержат множество сайтов связывания холестерина (Weiser et al., 2014; Cheng et al., 2019) и преимущественно располагаются в богатых холестерином микродоменах плазматической мембраны (Bahamonde, Valverde, 2003; Bahamonde et al., 2003; Marin et al., 2007; Ramirez et al., 2009). Наблюдаемый неоднородный флуоресцентный сигнал от иммуномеченых VDAC может отражать кластеризацию VDAC в липидных рафтах или мембранных контактных сайтах НМС. Последние также обогащены рафтами и холестерином (Petrov et al., 2011; Petrov et al., 2017; Krivoi, Petrov, 2019). В данной работе мы обнаружили, что VDAC-связывающая холестерин-подобная молекула олесоксим (Bordet et al., 2007; Bordet et al., 2010; Rovini et al., 2020) может подавлять вызванный экзоцитоз СВ и их рекрутирование в сайты экзоцитоза. Это действие олесоксима полностью предотвращалось ингибиторами VDAC, мембранопроникающим DIDS (Godbole et al., 2003; Benitez-Rangel et al., 2015) и мембранонепроницающим S-18 (Stein, Colombini, 2008). Стоит отметить, что на спонтанное высвобождение нейромедиатора не влиял ни один из модуляторов VDAC. Соответственно, мы предполагаем, что стимуляция плазмалемального VDAC может специфически ограничивать вызванный выброс нейромедиатора, подавляя участие СВ в экзоцитозе. Во время умеренной (физиологической) активности нейротрансмиссии в основном зависит от экзоцитоза СВ, принадлежащих к рециклирующему пулу

(Richards et al., 2003; Rizzoli, Betz, 2005). Эти СВ проходят несколько раундов экзо-эндоцитоза, связанного с дозаправкой молекулами нейромедиатора во время активности (Rizzoli, Betz, 2005). Олесоксим был способен подавлять темп экзоцитоза СВ при умеренной стимуляции, и этот эффект олесоксима предотвращался непроницаемым для клеток ингибитором VDAC. Кроме того, если повторное заполнение рециклирующих СВ ацетилхолином блокировалось везамиколом, то олесоксим не вносил дополнительного вклада в высвобождение нейромедиатора во время продолжительной активности. Следовательно, VDAC плазматической мембраны может негативно регулировать нейротрансмиссию при физиологической активности, которая зависит от рециклирования синаптических везикул. Это согласуется с наблюдением, что у мух, лишенных порина (гомолог VDAC млекопитающих), наблюдается неврологическая дисфункция, абберантный электрофизиологический ответ в НМС личинок и аномалия скелетных мышц (Graham et al., 2010; Raghavan et al., 2012). Стоит отметить, что у мутантных мух наблюдалось значительное увеличение вызванного постсинаптического потенциала (в присутствии низкого внеклеточного Ca^{2+}) и количества стимулов, на которые развивался постсинаптический ответ (Graham et al., 2010). Это говорит о том, что отсутствие белка VDAC может привести к повышенной возбудимости на синаптическом уровне. Однако Graham с соавторами связали наблюдаемые изменения с нехваткой митохондрий в пресинаптических окончаниях из-за нарушения аксонального митохондриального транспорта (Graham et al., 2010). Аналогичным образом, многие исследования предполагают, что положительные эффекты олесоксима реализуются через действие на митохондриальные VDAC (Bordet et al., 2007; Bordet et al., 2010; Rovini et al., 2020). В настоящей работе мы использовали модель митохондриальной дисфункции, индуцированный ротеноном, которая приводит к открытию митохондриальной транзитной поры и увеличению продукции митохондриальных АФК (Chauvin et al., 2001; Li et al., 2003). Действительно, острое воздействие ротенона привело к увеличению выработки митохондриального супероксида, которое сопровождалось заметным подавлением вызванного экзоцитоза СВ в НМС. Сходным образом

ингибирование митохондриального комплекса I с помощью ротенона вызывало нарушение экзоцитоза СВ и рециклирования в синапсосомах и первичной культуре гиппокампа (Ivannikov et al., 2013; Hrynevich et al., 2015; Pathak et al., 2015). Олесоксим или мембранонепроницающий ингибитор VDAC (S-18) не подавляли эффекты ротенона как на уровне АФК, так и на экзоцитоз СВ, в то время как мембранопроницающий антагонист VDAC DIDS частично ослаблял действие ротенона. Это согласуется со способностью DIDS ингибировать вызванное ротеноном высвобождение супероксид-аниона из матрикса митохондрий в цитозоль через белок VDAC (Lustgarten et al., 2012). Вероятно, острая аппликация олесоксима может модулировать экзоцитоз СВ путем, не зависимым от митохондриального VDAC. Это согласуется с тем, что олесоксим не предотвращал увеличения спонтанного высвобождения нейромедиатора в ответ на использование ротенона.

4.3.2 Роль мембранной проницаемости для анионов в эффектах олесоксима

Теоретически существует несколько механизмов, лежащих в основе негативной регуляции вызванного экзоцитоза СВ с помощью белка VDAC, локализованных на пресинаптической мембране. Эти VDAC могут служить в качестве Cl⁻-каналов, которые могут активироваться антиэстрогенами (Bahamonde et al., 2003; Bahamonde, Valverde, 2003). Также плазмалеммальные VDAC могут способствовать оттоку анионов в апоптотических нейронах, а также действуют как НАДН-феррицианид-редуктазы, тем самым способствуя окислительно-восстановительному гомеостазу в базальных условиях (Bahamonde et al., 2003; Elinder et al., 2005). VDAC могут влиять на сигнализацию Ca²⁺ и активность протеинкиназ (например, АКТ, GSK3β) (Gonzalez-Gronow et al., 2003; Gonzalez-Gronow et al., 2013; Li et al., 2014), а также быть негативными регуляторами нейропротекторного эстрогенового рецептора α (Marin et al., 2007; Ramirez et al., 2009). Наконец, VDAC плазматической мембраны может прямо или косвенно способствовать высвобождению АТФ из клеток млекопитающих (Okada et al., 2004). В настоящем исследовании мы проверили гипотезу о том, что олесоксим,

действующий на VDAC, может изменять поток аниона (Cl^-), тем самым влияя на экзоцитоз СВ. Действительно, повышение уровней Cl^- во внеклеточной среде заметно усиливает депрессантный эффект олесоксима на экзоцитоз, и в этих условиях мембранонепроницающий блокатор VDAC (S-18) полностью предотвращает действие олесоксима. Эксперименты с Cl^- индикатором MEQ, загруженным в нервные окончания, подтвердили, что олесоксим может повышать внутриклеточный уровень Cl^- в состоянии покоя и во время синаптической активности. Кроме того, ингибиторы VDAC (DIDS и S-18) предотвращали эффекты олесоксима на пресинаптические уровни Cl^- . Интересно, что ни S-18, ни DIDS сами по себе не влияли на экзоцитоз СВ, а также на содержание Cl^- в цитозоле, предполагая, что VDAC не участвуют в контроле нейротрансмиссии в базовых условиях без активации экзогенными или эндогенными соединениями. Нейроактивные стероиды, плазминоген, тканевой активатор плазминогена и церамид могут быть естественными лигандами, которые могут влиять на активность VDAC плазматических мембран (Gonzalez-Gronow et al., 2003; Darbandi-Tonkabon et al., 2004; Gonzalez-Gronow et al., 2013; Dadsena et al., 2019). Заманчиво предположить, что VDAC могут служить ионотропными пресинаптическими рецепторами, ответственными за негативную регуляцию экзоцитоза СВ из-за повышенной проводимости Cl^- во время активности. Соответственно, некоторые нейропротекторные свойства олесоксима (Bordet et al., 2007; Bordet et al., 2010; Weber et al., 2019) можно объяснить действием на пресинаптические VDAC и предотвращением избыточного высвобождения нейромедиатора. Последнее может вызывать синаптические повреждения, как в центральных синапсах, так и в НМС во время патологических процессов, включая нейродегенеративные расстройства (например, болезнь Альцгеймера) и отравление некоторыми нейротоксинами (Crawford, Mennerick, 2012; Davletov et al., 2012; Sugita et al., 2016; Tremblay et al., 2017; Ovsepian et al., 2019; Ovsepian et al., 2019). Теоретически, доставку олесоксима и других терапевтических соединений в синаптический компартмент можно осуществить с помощью липосом, связанных с атоксическими формами нейротропных нейротоксинов

столбняка и ботулина (Edupuganti et al., 2012; Ovsepiyan et al., 2015; Ovsepiyan et al., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании открыты механизмы действий на нервно-мышечную передачу двух производных холестерина, 25ГХ и олесоксима. 25ГХ образуется интенсивно эндогенно иммунными клетками, его уровни увеличиваются при воспалении и БАС. Олесоксим – искусственно синтезированная молекула, обладающая нейропротекторными свойствами при БАС. Учитывая, что при БАС поражаются НМС, была проверена гипотеза, что эти два стерина, 25ГХ и олесоксим, могут модулировать нервно-мышечную передачу.

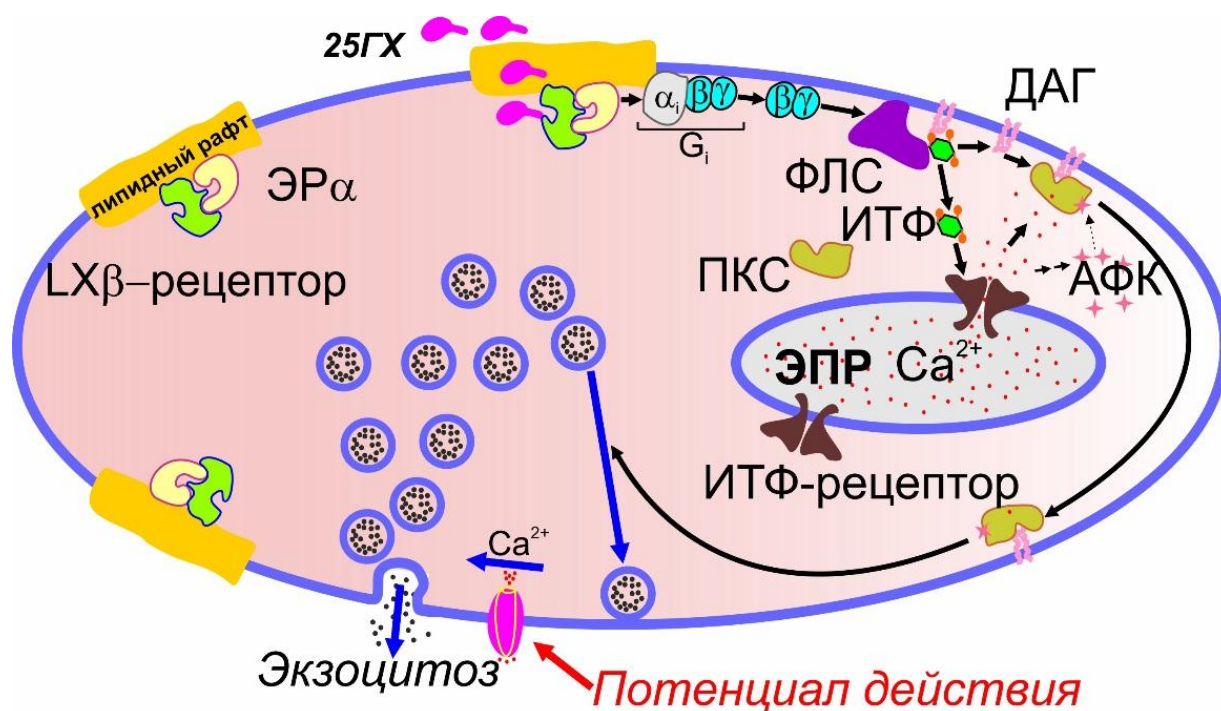


Рис. 29. Предположительный механизм стимулирующего действия 25ГХ на высвобождение нейромедиатора в процессе экзоцитоза в НМС. 25ГХ активирует связанные с липидными рафтами LX-рецепторы, которые через ЭРα могут активировать сигнальный путь G_i-белок/βγ-димер G-белка/ФЛС, что приводит к зависимому от ИТФ-рецептора высвобождению Ca²⁺ из ЭПР и затем к активации ПКС. Последнее может увеличить мобилизацию СВ во время активности. Ca²⁺-индуцированная продукция АФК может усилить этот эффект, вероятно, через дополнительную стимуляцию ПКС. Таким образом, связанный с иммунитетом

оксистерин, может увеличивать нейротрансмиттерную передачу, действуя пресинаптически через мембраносвязанные LX-рецепторы.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что иммунный оксистерин 25ГХ является мощным модулятором нервно-мышечной передачи и регулирует рекрутирование СВ в экзоцитоз. Следовательно, эффекты этого оксистерина проявляются при относительно интенсивной активности. Наномолярные концентрации 25ГХ подавляют нейротрансмиттерную передачу, 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 $\text{ЭР}\alpha/\text{G}_i\text{-белок}/\beta\gamma\text{-димер G-белка}/\text{ФЛС}/\text{Ca}^{2+}/\text{ПКС}$. Кроме того, 25ГХ может действовать как прооксидант, увеличивая АФК в Ca^{2+} -зависимой манере; далее, генерируемые АФК могут дополнительно способствовать экзоцитозу СВ (рис. 30). Этот LX-рецептор-зависимый путь может быть новым регуляторным механизмом, с помощью которого иммунные клетки, продуцирующие 25-ГХ, влияют на нейротрансмиттерную передачу и моторную функцию.

Моторная функция нарушается при БАС. Известно, что уровни 25ГХ повышаются при БАС, но роль этого оксистерина при данной патологии не ясна. Результаты данной работы показали, что 25ГХ может предотвратить изменения свойств мембран (нарушение липидных рафтов, увеличение захвата церамида, перекисное окисление липидов), уровня холина и кластеризации nAChR в НМС в модели БАС. Это указывает на возможное протективное значение 25ГХ при данном нейродегенеративном заболевании. Более того, НМС мышечной с моделью БАС характеризовались высокой способностью связывать 25-ГХ. Следовательно, 25ГХ не только модулятор нервно-мышечной передачи, но и соединение, способствующее поддержанию структурных свойств нервно-мышечного синапса.

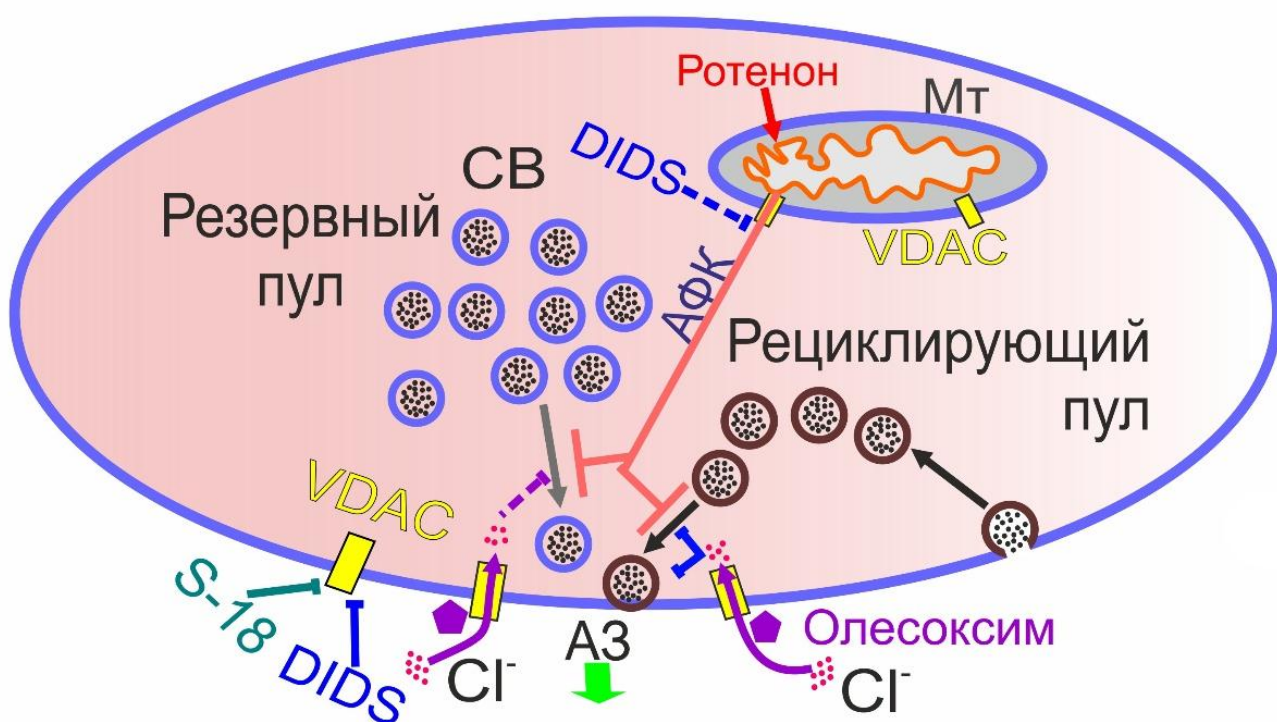


Рис. 30. Предполагаемый механизм VDAC-зависимой регуляции высвобождения нейромедиатора в НМС. Стимуляция VDAC плазматической мембраны олесоксимом увеличивает проницаемость мембраны для анионов (Cl^-). Повышенный поток Cl^- в нервной терминали может подавлять вызванный экзоцитоз СВ и их мобилизацию из рециклирующего и резервного пулов в сайты экзоцитоза (АЗ – активная зона). Как мембранопроникающий (DIDS), так и мембранонепроникающий (S-18) ингибиторы белка VDAC могут полностью устранить влияние олесоксима как на экзоцитоз СВ, так и на уровень внутриклеточного Cl^- . Ротенон вызывает митохондриальную дисфункцию, которая связана с усилением продукции АФК и открытием митохондриальной поры. Это может нарушить вовлечение СВ в вызванный экзоцитоз. Ингибирование VDAC с помощью мембранопроникающего соединения DIDS может частично предотвращать действие ротенона на уровень митохондриальной 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. Мт – митохондрия.

С другой стороны, было обнаружено, что нейропротективная молекула олесоксим может негативно регулировать нейротрансмиссию, подавляя вызванный экзоцитоз СВ и их рекрутирование в сайты экзоцитоза. Механизм, лежащий в основе действия олесоксима, может быть связан с активацией белка VDAC на пресинаптической мембране и увеличением проницаемости мембраны для

анионов (Cl^-). Установление механизма подавления нейротрансмиссии, опосредованного олесоксимом, позволило обнаружить новый механизм пресинаптического ингибирования, основанный на изменении анионной проницаемости мембраны.

Таким образом, два производных холестерина, действуя через отличные 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 нейротрансмиссию 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Khalik, J. Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis / J. Abdel-Khalik, E. Yutuc, P.J. Crick, J.A. Gustafsson, M. Warner, G. Roman, K. Talbot, E. Gray, W.J. Griffiths, M.R. Turner, Y. Wang // *J Lipid Res.* – 2017. – Vol.58, №1. – P.267-278.
2. Akaike, A. Overview // *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection* / A. Akaike, S. Shimohama, Y. Misu // Singapore: Springer – 2018.
3. Alpy, F. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals / F. Alpy, C. Tomasetto // *J Cell Sci.* – 2005. – Vol.118, №Pt 13. – P.2791-2801.
4. Antonini, A. Membrane cholesterol depletion in cortical neurons highlights altered NMDA receptor functionality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / A. Antonini, S. Caioli, L. Saba, G. Vindigni, S. Biocca, N. Canu, C. Zona // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2018. – Vol.1864, №2. – P.509-519.
5. Arbour, D. Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model / D. Arbour, E. Tremblay, E. Martineau, J.P. Julien, R. Robitaille // *J Neurosci.* – 2015. – Vol.35, №2. – P.688-706.
6. Archer, A. Skeletal muscle as a target of LXR agonist after long-term treatment: focus on lipid homeostasis / A. Archer, J. Laurencikienė, O. Ahmed, K.R. Steffensen, P. Parini, J.A. Gustafsson, M. Korach-Andre // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2014. – Vol.306, №5. – P.E494-502.
7. Arenas, F. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration / F. Arenas, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – Vol.10. – P.382.
8. Bahamonde, M.I. Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated maxi Cl⁻ currents in C1300 neuroblastoma cells / M.I.

- Bahamonde, J.M. Fernandez-Fernandez, F.X. Guix, E. Vazquez, M.A. Valverde // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278, №35. – P.33284-33289.
9. Bahamonde, M.I. Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria / M.I. Bahamonde, M.A. Valverde // *Pflugers Arch.* – 2003. – Vol.446, №3. – P.309-313.
 10. Baker, M.A. VDAC1 is a transplasma membrane NADH-ferricyanide reductase / M.A. Baker, D.J. Lane, J.D. Ly, V. De Pinto, A. Lawen // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol.279, №6. – P.4811-4819.
 11. Barrantes, F.J. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains / F.J. Barrantes // *Curr Opin Drug Discov Devel.* – 2003. – Vol.6, №5. – P.620-632.
 12. Barrantes, F.J. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function / F.J. Barrantes // *Brain Res Brain Res Rev.* – 2004. – Vol.47, №1-3. – P.71-95.
 13. Barrantes, F.J. Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor / F.J. Barrantes // *J Neurochem.* – 2007. – Vol.103 Suppl 1. – P.72-80.
 14. Barrientos, G. Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance / G. Barrientos, P. Sanchez-Aguilera, E. Jaimovich, C. Hidalgo, P. Llanos // *J Diabetes Res.* – 2017. – Vol.2017. – P.3941898.
 15. Batoko, H. Enigmatic Translocator protein (TSPO) and cellular stress regulation / H. Batoko, V. Veljanovski, P. Jurkiewicz // *Trends Biochem Sci.* – 2015. – Vol.40, №9. – P.497-503.
 16. Bauman, D.R. 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production / D.R. Bauman, A.D. Bitmansour, J.G. McDonald, B.M. Thompson, G. Liang, D.W. Russell // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol.106, №39. – P.16764-16769.
 17. Belhasan, D.C. The role of the dystrophin glycoprotein complex on the neuromuscular system / D.C. Belhasan, M. Akaaboune // *Neurosci Lett.* – 2020. – Vol.722. – P.134833.

18. Benitez-Rangel, E. DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate) directly inhibits caspase activity in HeLa cell lysates / E. Benitez-Rangel, M.C. Lopez-Mendez, L. Garcia, A. Guerrero-Hernandez // *Cell Death Discov.* – 2015. – Vol.1. – P.15037.
19. Benmerah, A. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis / A. Benmerah, C. Lamaze, B. Begue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat, N. Cerf-Bensussan // *J Cell Biol.* – 1998. – Vol.140, №5. – P.1055-1062.
20. Betz, W.J. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction / W.J. Betz, G.S. Bewick // *J Physiol.* – 1993. – Vol.460. – P.287-309.
21. Bielska, A.A. Side-chain oxysterols modulate cholesterol accessibility through membrane remodeling / A.A. Bielska, B.N. Olsen, S.E. Gale, L. Mydock-McGrane, K. Krishnan, N.A. Baker, P.H. Schlesinger, D.F. Covey, D.S. Ory // *Biochemistry.* – 2014. – Vol.53, №18. – P.3042-3051.
22. Bigini, P. Neuropathologic and biochemical changes during disease progression in liver X receptor beta-/- mice, a model of adult neuron disease / P. Bigini, K.R. Steffensen, A. Ferrario, L. Diomedea, G. Ferrara, S. Barbera, S. Salzano, E. Fumagalli, P. Ghezzi, T. Mennini, J.A. Gustafsson // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2010. – Vol.69, №6. – P.593-605.
23. Biwersi, J. Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride / J. Biwersi, A.S. Verkman // *Biochemistry.* – 1991. – Vol.30, №32. – P.7879-7883.
24. Blanc, M. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response / M. Blanc, W.Y. Hsieh, K.A. Robertson, K.A. Kropp, T. Forster, G. Shui, P. Lacaze, S. Watterson, S.J. Griffiths, N.J. Spann, A. Meljon, S. Talbot, K. Krishnan, D.F. Covey, M.R. Wenk, M. Craigon, Z. Ruzsics, J. Haas, A. Angulo, W.J. Griffiths, C.K. Glass, Y. Wang, P. Ghazal // *Immunity.* – 2013. – Vol.38, №1. – P.106-118.
25. Bolton, C.F. Neuromuscular complications of sepsis / C.F. Bolton // *Intensive Care Med.* – 1993. – Vol.19 Suppl 2. – P.S58-63.

26. Bonnycastle, K. Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle / K. Bonnycastle, E.C. Davenport, M.A. Cousin // *J Neurochem.* – 2021. – Vol.157, №2. – P.179-207.
27. Bordet, T. Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound / T. Bordet, P. Berna, J.L. Abitbol, R.M. Pruss // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2010. – Vol.3, №2. – P.345-368.
28. Bordet, T. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis / T. Bordet, B. Buisson, M. Michaud, C. Drouot, P. Galea, P. Delaage, N.P. Akentieva, A.S. Evers, D.F. Covey, M.A. Ostuni, J.J. Lacapere, C. Massaad, M. Schumacher, E.M. Steidl, D. Maux, M. Delaage, C.E. Henderson, R.M. Pruss // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2007. – Vol.322, №2. – P.709-720.
29. Brown, A.J. Oxysterols: From physiological tuners to pharmacological opportunities / A.J. Brown, L.J. Sharpe, M.J. Rogers // *Br J Pharmacol.* – 2021. – Vol.178, №16. – P.3089-3103.
30. Brown, R.H. Amyotrophic Lateral Sclerosis / R.H. Brown, A. Al-Chalabi // *N Engl J Med.* – 2017. – Vol.377, №2. – P.162-172.
31. Bruijn, L.I. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1 / L.I. Bruijn, M.K. Houseweart, S. Kato, K.L. Anderson, S.D. Anderson, E. Ohama, A.G. Reaume, R.W. Scott, D.W. Cleveland // *Science.* – 1998. – Vol.281, №5384. – P.1851-1854.
32. Bruneteau, G. Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients / G. Bruneteau, S. Bauche, J.L. Gonzalez de Aguilar, G. Brochier, N. Mandjee, M.L. Tanguy, G. Hussain, A. Behin, F. Khiami, E. Sariali, C. Hell-Remy, F. Salachas, P.F. Pradat, L. Lacomblez, S. Nicole, B. Fontaine, M. Fardeau, J.P. Loeffler, V. Meininger, E. Fournier, J. Koenig, D. Hantai // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – Vol.2, №4. – P.362-372.
33. Brunger A.T. The pre-synaptic fusion machinery / A.T. Brunger, U.B. Choi, Y. Lai, J. Leitz, K.I. White, Q. Zhou // *Curr Opin Struct Biol.* – 2019. – Vol.54. – P.179-188.

34. Bryndina, I.G. Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse / I.G. Bryndina, M.N. Shalagina, A.V. Sekunov, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // *Neurosci Lett.* – 2018. – Vol.664. – P.1-6.
35. Cao, Q. Multiple Roles of 25-Hydroxycholesterol in Lipid Metabolism, Antivirus Process, Inflammatory Response, and Cell Survival / Q. Cao, Z. Liu, Y. Xiong, Z. Zhong, Q. Ye // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol.2020. – P.8893305.
36. Chauvin, C. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells / C. Chauvin, F. De Oliveira, X. Ronot, M. Mousseau, X. Leverve, E. Fontaine // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol.276, №44. – P.41394-41398.
37. Chen, Y. Coronin 6 regulates acetylcholine receptor clustering through modulating receptor anchorage to actin cytoskeleton / Y. Chen, F.C. Ip, L. Shi, Z. Zhang, H. Tang, Y.P. Ng, W.C. Ye, A.K. Fu, N.Y. Ip // *J Neurosci.* – 2014. – Vol.34, №7. – P.2413-2421.
38. Cheng, W.W.L. Multiple neurosteroid and cholesterol binding sites in voltage-dependent anion channel-1 determined by photo-affinity labeling / W.W.L. Cheng, M.M. Budelier, Y. Sugawara, L. Bergdoll, M. Queralt-Martin, W. Rosencrans, T.K. Rostovtseva, Z.W. Chen, J. Abramson, K. Krishnan, D.F. Covey, J.P. Whitelegge, A.S. Evers // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* – 2019. – Vol.1864, №10. – P.1269-1279.
39. 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
40. Choi, H.Y. APP interacts with LRP4 and agrin to coordinate the development of the neuromuscular junction in mice / H.Y. Choi, Y. Liu, C. Tennert, Y. Sugiura, A. Karakatsani, S. Kroger, E.B. Johnson, R.E. Hammer, W. Lin, J. Herz // *Elife.* – 2013. – Vol.2. – P.e00220.

41. Choi, Y.K. 25-hydroxycholesterol induces mitochondria-dependent apoptosis via activation of glycogen synthase kinase-3 β in PC12 cells / Y.K. Choi, Y.S. Kim, I.Y. Choi, S.W. Kim, W.K. Kim // *Free Radic Res.* – 2008. – Vol.42, №6. – P.544-553.
42. Chub, N. Chloride-sensitive MEQ fluorescence in chick embryo motoneurons following manipulations of chloride and during spontaneous network activity / N. Chub, G.Z. Mentis, J. O'Donovan M // *J Neurophysiol.* – 2006. – Vol.95, №1. – P.323-330.
43. Civra, A. 25-Hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol inhibit human rotavirus infection by sequestering viral particles into late endosomes / A. Civra, R. Francese, P. Gamba, G. Testa, V. Cagno, G. Poli, D. Lembo // *Redox Biol.* – 2018. – Vol.19. – P.318-330.
44. Colell, A. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity / A. Colell, C. Garcia-Ruiz, J.M. Lluís, O. Coll, M. Mari, J.C. Fernandez-Checa // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278, №36. – P.33928-33935.
45. Comley, L.H. ApoE isoform-specific regulation of regeneration in the peripheral nervous system / L.H. Comley, H.R. Fuller, T.M. Wishart, C.A. Mutsaers, D. Thomson, A.K. Wright, R.R. Ribchester, G.E. Morris, S.H. Parson, K. Horsburgh, T.H. Gillingwater // *Hum Mol Genet.* – 2011. – Vol.20, №12. – P.2406-2421.
46. Cosentino-Gomes, D. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation / D. Cosentino-Gomes, N. Rocco-Machado, J.R. Meyer-Fernandes // *Int J Mol Sci.* – 2012. – Vol.13, №9. – P.10697-10721.
47. Crawford, D.C. Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release / D.C. Crawford, S. Mennerick // *Neuroscientist.* – 2012. – Vol.18, №3. – P.216-223.
48. Criado, M. Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles /

- M. Criado, H. Eibl, F.J. Barrantes // *Biochemistry*. – 1982. – Vol.21, №15. – P.3622-3629.
49. Cutler, R.G. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis / R.G. Cutler, W.A. Pedersen, S. Camandola, J.D. Rothstein, M.P. Mattson // *Ann Neurol*. – 2002. – Vol.52, №4. – P.448-457.
 50. Cyster, J.G. 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity / J.G. Cyster, E.V. Dang, A. Reboldi, T. Yi // *Nat Rev Immunol*. – 2014. – Vol.14, №11. – P.731-743.
 51. Dadsena, S. Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis / S. Dadsena, S. Bockelmann, J.G.M. Mina, D.G. Hassan, S. Korneev, G. Razzera, H. Jahn, P. Niekamp, D. Muller, M. Schneider, F.G. Tafesse, S.J. Marrink, M.N. Melo, J.C.M. Holthuis // *Nat Commun*. – 2019. – Vol.10, №1. – P.1832.
 52. Dai, Z. The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters / Z. Dai, X. Luo, H. Xie, H.B. Peng // *J Cell Biol*. – 2000. – Vol.150, №6. – P.1321-1334.
 53. Dantas, L.S. Lipid aldehyde hydrophobicity affects apo-SOD1 modification and aggregation / L.S. Dantas, L.G. Viviani, A. Inague, E. Piccirillo, L. Rezende, G.E. Ronsein, O. Augusto, M.H.G. Medeiros, A.T.D. Amaral, S. Miyamoto // *Free Radic Biol Med*. – 2020. – Vol.156. – P.157-167.
 54. Darbandi-Tonkabon, R. Neuroactive steroid interactions with voltage-dependent anion channels: lack of relationship to GABA(A) receptor modulation and anesthesia / R. Darbandi-Tonkabon, B.D. Manion, W.R. Hastings, W.J. Craig, G. Akk, J.R. Bracamontes, Y. He, T.V. Sheiko, J.H. Steinbach, S.J. Mennerick, D.F. Covey, A.S. Evers // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2004. – Vol.308, №2. – P.502-511.
 55. Darbyson, A. Oxysterol-binding protein ORP3 rescues the Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked mutant VAPB phenotype / A. Darbyson, J.K. Ngsee // *Exp Cell Res*. – 2016. – Vol.341, №1. – P.18-31.

56. Darcy, K.J. Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons / K.J. Darcy, K. Staras, L.M. Collinson, Y. Goda // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol.9, №3. – P.315-321.
57. Davletov, B. Presynaptic neurotoxins: an expanding array of natural and modified molecules / B. Davletov, E. Ferrari, Y. Ushkaryov // *Cell Calcium.* – 2012. – Vol.52, №3-4. – P.234-240.
58. De Pinto, V. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane / V. De Pinto, A. Messina, D.J. Lane, A. Lawen // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol.584, №9. – P.1793-1799.
59. DeBarber, A.E. Profiling sterols in cerebrotendinous xanthomatosis: utility of Girard derivatization and high resolution exact mass LC-ESI-MS(n) analysis / A.E. DeBarber, Y. Sandler, A.S. Pappu, L.S. Merckens, P.B. Duell, S.R. Lear, S.K. Erickson, R.D. Steiner // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2011. – Vol.879, №17-18. – P.1384-1392.
60. Derangere, V. Liver X receptor beta activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells / V. Derangere, A. Chevriaux, F. Courtaut, M. Bruchard, H. Berger, F. Chalmin, S.Z. Causse, E. Limagne, F. Vegran, S. Ladoire, B. Simon, W. Boireau, A. Hichami, L. Apetoh, G. Mignot, F. Ghiringhelli, C. Rebe // *Cell Death Differ.* – 2014. – Vol.21, №12. – P.1914-1924.
61. Dias, I.H.K. Simvastatin reduces circulating oxysterol levels in men with hypercholesterolaemia / I.H.K. Dias, I. Milic, G.Y.H. Lip, A. Devitt, M.C. Polidori, H.R. Griffiths // *Redox Biol.* – 2018. – Vol.16. – P.139-145.
62. Diczfalussy, U. Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide / U. Diczfalussy, K.E. Olofsson, A.M. Carlsson, M. Gong, D.T. Golenbock, O. Rooyackers, U. Flaring, H. Bjorkbacka // *J Lipid Res.* – 2009. – Vol.50, №11. – P.2258-2264.
63. Dobrunz, L.E. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus / L.E. Dobrunz // *Int J Dev Neurosci.* – 2002. – Vol.20, №3-5. – P.225-236.

64. Dobrunz, L.E. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses / L.E. Dobrunz, C.F. Stevens // *Neuron*. – 1997. – Vol.18, №6. – P.995-1008.
65. Dodge, J.C. Sterol auto-oxidation adversely affects human motor neuron viability and is a neuropathological feature of amyotrophic lateral sclerosis / J.C. Dodge, J. Yu, S.P. Sardi, L.S. Shihabuddin // *Sci Rep*. – 2021. – Vol.11, №1. – P.803.
66. Dupuis, L. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis / L. Dupuis, P. Corcia, A. Fergani, J.L. Gonzalez De Aguilar, D. Bonnefont-Rousselot, R. Bittar, D. Seilhean, J.J. Hauw, L. Lacomblez, J.P. Loeffler, V. Meininger // *Neurology*. – 2008. – Vol.70, №13. – P.1004-1009.
67. Dzhagalov, I. The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system / I. Dzhagalov, N. Zhang, Y.W. He // *Cell Mol Immunol*. – 2004. – Vol.1, №6. – P.401-407.
68. Eckmann, J. Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime / J. Eckmann, L.E. Clemens, S.H. Eckert, S. Hagl, L. Yu-Taeger, T. Bordet, R.M. Pruss, W.E. Muller, K. Leuner, H.P. Nguyen, G.P. Eckert // *Mol Neurobiol*. – 2014. – Vol.50, №1. – P.107-118.
69. Edupuganti, O.P. Targeted delivery into motor nerve terminals of inhibitors for SNARE-cleaving proteases via liposomes coupled to an atoxic botulinum neurotoxin / O.P. Edupuganti, S.V. Ovsepiyan, J. Wang, T.H. Zurawski, J.J. Schmidt, L. Smith, G.W. Lawrence, J.O. Dolly // *FEBS J*. – 2012. – Vol.279, №14. – P.2555-2567.
70. Egawa, J. Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function / J. Egawa, M.L. Pearn, B.P. Lemkuil, P.M. Patel, B.P. Head // *J Physiol*. – 2016. – Vol.594, №16. – P.4565-4579.
71. Elinder, F. Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic

- stimuli / F. Elinder, N. Akanda, R. Tofighi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, S. Orrenius, S. Ceccatelli // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol.12, №8. – P.1134-1140.
72. Endo-Umeda, K. Liver X Receptors Regulate Cholesterol Metabolism and Immunity in Hepatic Nonparenchymal Cells / K. Endo-Umeda, M. Makishima // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol.20, №20.
73. Feng, X. Determination of the Pathological Features of NPC1 Variants in a Cellular Complementation Test / X. Feng, C. Cozma, S. Pantoom, C. Hund, K. Iwanov, J. Petters, C. Volkner, C. Bauer, F. Vogel, P. Bauer, F.U. Weiss, M.M. Lerch, A.M. Knospe, A. Hermann, M.J. Frech, J. Luo, A. Rolfs, J. Lukas // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol.20, №20.
74. Fernandez-Alfonso, T. A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses / T. Fernandez-Alfonso, T.A. Ryan // *Brain Cell Biol.* – 2008. – Vol.36, №1-4. – P.87-100.
75. Fernandez, H.L. Skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in amyotrophic lateral sclerosis / H.L. Fernandez, J.R. Stiles, J.A. Donoso // *Muscle Nerve.* – 1986. – Vol.9, №5. – P.399-406.
76. Fink, H. Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness / H. Fink, M. Helming, C. Unterbuchner, A. Lenz, F. Neff, J.A. Martyn, M. Blobner // *Crit Care Med.* – 2008. – Vol.36, №3. – P.910-916.
77. Fink, H. Systemic inflammation leads to resistance to atracurium without increasing membrane expression of acetylcholine receptors / H. Fink, P. Lupp, B. Mayer, H. Rosenbrock, J. Metzger, J.A. Martyn, M. Blobner // *Anesthesiology.* – 2003. – Vol.98, №1. – P.82-88.
78. Fletcher, P. The effect of curare on the release of acetylcholine from mammalian motor nerve terminals and an estimate of quantum content / P. Fletcher, T. Forrester // *J Physiol.* – 1975. – Vol.251, №1. – P.131-144.

79. Fowler, M.W. Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations / M.W. Fowler, K. Staras // *Exp Cell Res.* – 2015. – Vol.335, №2. – P.150-156.
80. Frolov, A. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols / A. Frolov, S.E. Zielinski, J.R. Crowley, N. Dudley-Rucker, J.E. Schaffer, D.S. Ory // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278, №28. – P.25517-25525.
81. Funfschilling, U. Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth / U. Funfschilling, W.J. Jockusch, N. Sivakumar, W. Mobius, K. Corthals, S. Li, S. Quintes, Y. Kim, I.A. Schaap, J.S. Rhee, K.A. Nave, G. Saher // *J Neurosci.* – 2012. – Vol.32, №22. – P.7632-7645.
82. Giniatullin, A. Action of Hydrogen Peroxide on Synaptic Transmission at the Mouse Neuromuscular Junction / A. Giniatullin, A. Petrov, R. Giniatullin // *Neuroscience.* – 2019. – Vol.399. – P.135-145.
83. Giniatullin, A.R. Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction / A.R. Giniatullin, R.A. Giniatullin // *J Physiol.* – 2003. – Vol.552, №Pt 1. – P.283-293.
84. Glass, C.K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells / C.K. Glass, K. Saijo // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol.10, №5. – P.365-376.
85. Godbole, A. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems / A. Godbole, J. Varghese, A. Sarin, M.K. Mathew // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. – Vol.1642, №1-2. – P.87-96.
86. Gonzalez-Gronow, M. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells / M. Gonzalez-Gronow, T. Kalfa, C.E. Johnson, G. Gawdi, S.V. Pizzo // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278, №29. – P.27312-27318.
87. Gonzalez-Gronow, M. The voltage-dependent anion channel (VDAC) binds tissue-type plasminogen activator and promotes activation of plasminogen on the cell surface / M. Gonzalez-Gronow, R. Ray, F. Wang, S.V. Pizzo // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol.288, №1. – P.498-509.

88. Gorlach, A. Calcium and ROS: A mutual interplay / A. Gorlach, K. Bertram, S. Hudecova, O. Krizanova // *Redox Biol.* – 2015. – Vol.6. – P.260-271.
89. Goto, A. Protein kinase D1 and oxysterol-binding protein form a regulatory complex independent of phosphorylation / A. Goto, M. Charman, N.D. Ridgway // *Traffic.* – 2018. – Vol.19, №11. – P.854-866.
90. Graham, B.H. Neurologic dysfunction and male infertility in *Drosophila* porin mutants: a new model for mitochondrial dysfunction and disease / B.H. Graham, Z. Li, E.P. Alesii, P. Versteken, C. Lee, J. Wang, W.J. Craigen // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol.285, №15. – P.11143-11153.
91. Griffiths, W.J. Oxysterol research: a brief review / W.J. Griffiths, Y. Wang // *Biochem Soc Trans.* – 2019. – Vol.47, №2. – P.517-526.
92. Gurney, M.E. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation / M.E. Gurney, H. Pu, A.Y. Chiu, M.C. Dal Canto, C.Y. Polchow, D.D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y.W. Kwon, H.X. Deng, et al. // *Science.* – 1994. – Vol.264, №5166. – P.1772-1775.
93. Hannedouche, S. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2 / S. Hannedouche, J. Zhang, T. Yi, W. Shen, D. Nguyen, J.P. Pereira, D. Guerini, B.U. Baumgarten, S. Roggo, B. Wen, R. Knochenmuss, S. Noel, F. Gessier, L.M. Kelly, M. Vanek, S. Laurent, I. Preuss, C. Miault, I. Christen, R. Karuna, W. Li, D.I. Koo, T. Suply, C. Schmedt, E.C. Peters, R. Falchetto, A. Katopodis, C. Spanka, M.O. Roy, M. Detheux, Y.A. Chen, P.G. Schultz, C.Y. Cho, K. Seuwen, J.G. Cyster, A.W. Sailer // *Nature.* – 2011. – Vol.475, №7357. – P.524-527.
94. Harris, K.M. Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses / K.M. Harris, P. Sultan // *Neuropharmacology.* – 1995. – Vol.34, №11. – P.1387-1395.
95. Held, R.G. Synapse and Active Zone Assembly in the Absence of Presynaptic Ca(2+) Channels and Ca(2+) Entry / R.G. Held, C. Liu, K. Ma, A.M. Ramsey, T.B. Tarr, G. De Nola, S.S.H. Wang, J. Wang, A. van den Maagdenberg, T.

- Schneider, J. Sun, T.A. Blanpied, P.S. Kaeser // *Neuron*. – 2020. – Vol.107, №4. – P.667-683 e669.
96. Henriques, A. Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase / A. Henriques, V. Croixmarie, D.A. Priestman, A. Rosenbohm, S. Dirrig-Grosch, E. D'Ambra, M. Huebecker, G. Hussain, C. Boursier-Neyret, A. Echaniz-Laguna, A.C. Ludolph, F.M. Platt, B. Walther, M. Spedding, J.P. Loeffler, J.L. Gonzalez De Aguilar // *Hum Mol Genet*. – 2015. – Vol.24, №25. – P.7390-7405.
 97. Hichor, M. Liver X Receptor exerts a protective effect against the oxidative stress in the peripheral nerve / M. Hichor, V.K. Sundaram, S.A. Eid, R. Abdel-Rassoul, P.X. Petit, D. Borderie, J. Bastin, A.A. Eid, M. Manuel, J. Grenier, C. Massaad // *Sci Rep*. – 2018. – Vol.8, №1. – P.2524.
 98. Holtta-Vuori, M. BODIPY-cholesterol: a new tool to visualize sterol trafficking in living cells and organisms / M. Holtta-Vuori, R.L. Uronen, J. Repakova, E. Salonen, I. Vattulainen, P. Panula, Z. Li, R. Bittman, E. Ikonen // *Traffic*. – 2008. – Vol.9, №11. – P.1839-1849.
 99. Hrynevich, S.V. Influence of Glucose Deprivation on Membrane Potentials of Plasma Membranes, Mitochondria and Synaptic Vesicles in Rat Brain Synaptosomes / S.V. Hrynevich, T.G. Pekun, T.V. Waseem, S.V. Fedorovich // *Neurochem Res*. – 2015. – Vol.40, №6. – P.1188-1196.
 100. Hua, Z. v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools / Z. Hua, S. Leal-Ortiz, S.M. Foss, C.L. Waites, C.C. Garner, S.M. Voglmaier, R.H. Edwards // *Neuron*. – 2011. – Vol.71, №3. – P.474-487.
 101. Ichikawa, N. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth / N. Ichikawa, K. Iwabuchi, H. Kurihara, K. Ishii, T. Kobayashi, T. Sasaki, N. Hattori, Y. Mizuno, K. Hozumi, Y. Yamada, E. Arikawa-Hirasawa // *J Cell Sci*. – 2009. – Vol.122, №Pt 2. – P.289-299.
 102. Ingre, C. Lipids, apolipoproteins, and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis / C. Ingre, L. Chen, Y. Zhan, J. Termorshuizen, L. Yin, F. Fang // *Neurology*. – 2020. – Vol.94, №17. – P.e1835-e1844.

103. Inoue, M. The role of interferon-beta in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes / M. Inoue, M.L. Shinohara // Immunology. – 2013. – Vol.139, №1. – P.11-18.
104. Ishikawa, T. LXRbeta/estrogen receptor-alpha signaling in lipid rafts preserves endothelial integrity / T. Ishikawa, I.S. Yuhanna, J. Umetani, W.R. Lee, K.S. Korach, P.W. Shaul, M. Umetani // J Clin Invest. – 2013. – Vol.123, №8. – P.3488-3497.
105. Ivannikov, M.V. Synaptic vesicle exocytosis in hippocampal synaptosomes correlates directly with total mitochondrial volume / M.V. Ivannikov, M. Sugimori, R.R. Llinas // J Mol Neurosci. – 2013. – Vol.49, №1. – P.223-230.
106. Jang, J. 25-hydroxycholesterol contributes to cerebral inflammation of X-linked adrenoleukodystrophy through activation of the NLRP3 inflammasome / J. Jang, S. Park, H. Jin Hur, H.J. Cho, I. Hwang, Y. Pyo Kang, I. Im, H. Lee, E. Lee, W. Yang, H.C. Kang, S. Won Kwon, J.W. Yu, D.W. Kim // Nat Commun. – 2016. – Vol.7. – P.13129.
107. Janowski, B.A. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta / B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, D.J. Mangelsdorf // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol.96, №1. – P.266-271.
108. Jansen, M. Role of ORPs in sterol transport from plasma membrane to ER and lipid droplets in mammalian cells / M. Jansen, Y. Ohsaki, L.R. Rega, R. Bittman, V.M. Olkkonen, E. Ikonen // Traffic. – 2011. – Vol.12, №2. – P.218-231.
109. Jin, Y.H. Protein Kinase C and Calmodulin Serve As Calcium Sensors for Calcium-Stimulated Endocytosis at Synapses / Y.H. Jin, X.S. Wu, B. Shi, Z. Zhang, X. Guo, L. Gan, Z. Chen, L.G. Wu // J Neurosci. – 2019. – Vol.39, №48. – P.9478-9490.
110. Johnson, K.A. In vivo formation of 25-hydroxycholesterol from endogenous cholesterol after a single meal, dietary cholesterol challenge / K.A. Johnson, C.J.

- Morrow, G.D. Knight, T.J. Scallen // *J Lipid Res.* – 1994. – Vol.35, №12. – P.2241-2253.
111. Jordan, B.A. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins / B.A. Jordan, B.D. Fernholz, M. Boussac, C. Xu, G. Grigorean, E.B. Ziff, T.A. Neubert // *Mol Cell Proteomics.* – 2004. – Vol.3, №9. – P.857-871.
 112. Kasimov, M.R. 24S-Hydroxycholesterol enhances synaptic vesicle cycling in the mouse neuromuscular junction: Implication of glutamate NMDA receptors and nitric oxide / M.R. Kasimov, M.R. Fatkhrahmanova, K.A. Mukhutdinova, A.M. Petrov // *Neuropharmacology.* – 2017. – Vol.117. – P.61-73.
 113. Kasimov, M.R. Effects of 5alpha-cholestan-3-one on the synaptic vesicle cycle at the mouse neuromuscular junction / M.R. Kasimov, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol.1851, №5. – P.674-685.
 114. 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.
 115. Kavalali, E.T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release / E.T. Kavalali // *Nat Rev Neurosci.* – 2015. – Vol.16, №1. – P.5-16.
 116. Kilin, V. Fluorescence lifetime imaging of membrane lipid order with a ratiometric fluorescent probe / V. Kilin, O. Glushonkov, L. Herdly, A. Klymchenko, L. Richert, Y. Mely // *Biophys J.* – 2015. – Vol.108, №10. – P.2521-2531.
 117. Kim, S.M. Amyotrophic lateral sclerosis is associated with hypolipidemia at the presymptomatic stage in mice / S.M. Kim, H. Kim, J.E. Kim, K.S. Park, J.J. Sung, S.H. Kim, K.W. Lee // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6, №3. – P.e17985.
 118. Kim, S.M. 25-Hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis / S.M. Kim, M.Y. Noh, H. Kim, S.Y. Cheon, K.M.

- Lee, J. Lee, E. Cha, K.S. Park, K.W. Lee, J.J. Sung, S.H. Kim // *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8, №7. – P.11855-11867.
119. Kirchhausen, T. Clathrin adaptors really adapt / T. Kirchhausen // *Cell*. – 2002. – Vol.109, №4. – P.413-416.
120. Kobasa, D. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus / D. Kobasa, S.M. Jones, K. Shinya, J.C. Kash, J. Copps, H. Ebihara, Y. Hatta, J.H. Kim, P. Halfmann, M. Hatta, F. Feldmann, J.B. Alimonti, L. Fernando, Y. Li, M.G. Katze, H. Feldmann, Y. Kawaoka // *Nature*. – 2007. – Vol.445, №7125. – P.319-323.
121. Korinek, M. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors / M. Korinek, V. Vyklicky, J. Borovska, K. Lichnerova, M. Kaniakova, B. Krausova, J. Krusek, A. Balik, T. Smejkalova, M. Horak, L. Vyklicky // *J Physiol*. – 2015. – Vol.593, №10. – P.2279-2293.
122. Koroleva, K. Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against the ATP-Induced Meningeal Nociception / K. Koroleva, E. Ermakova, A. Mustafina, R. Giniatullina, R. Giniatullin, G. Sitdikova // *Front Cell Neurosci*. – 2020. – Vol.14. – P.266.
123. Krivoi, I.I. Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission / I.I. Krivoi, A.M. Petrov // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol.20, №5.
124. Kumar, P. Direct interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha / P. Kumar, Q. Wu, K.L. Chambliss, I.S. Yuhanna, S.M. Mumby, C. Mineo, G.G. Tall, P.W. Shaul // *Mol Endocrinol*. – 2007. – Vol.21, №6. – P.1370-1380.
125. Landolfi, B. Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells / B. Landolfi, S. Curci, L. Debellis, T. Pozzan, A.M. Hofer // *J Cell Biol*. – 1998. – Vol.142, №5. – P.1235-1243.
126. Lappano, R. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor alpha-mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes

- / R. Lappano, A.G. Recchia, E.M. De Francesco, T. Angelone, M.C. Cerra, D. Picard, M. Maggiolini // PLoS One. – 2011. – Vol.6, №1. – P.e16631.
127. Lassek, M. The Proteome of the Murine Presynaptic Active Zone / M. Lassek, J. Weingarten, W. Volkandt // Proteomes. – 2014. – Vol.2, №2. – P.243-257.
128. Lee, C.W. Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking / C.W. Lee, J. Han, J.R. Bamburg, L. Han, R. Lynn, J.Q. Zheng // Nat Neurosci. – 2009. – Vol.12, №7. – P.848-856.
129. Lehmann, J.M. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway / J.M. Lehmann, S.A. Kliewer, L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, B.B. Oliver, J.L. Su, S.S. Sundseth, D.A. Winegar, D.E. Blanchard, T.A. Spencer, T.M. Willson // J Biol Chem. – 1997. – Vol.272, №6. – P.3137-3140.
130. Leussink, S. Lipid metabolism as a mechanism of immunomodulation in macrophages: the role of liver X receptors / S. Leussink, I. Aranda-Pardos, A.G. N // Curr Opin Pharmacol. – 2020. – Vol.53. – P.18-26.
131. Levitan, I. Cholesterol and ion channels / I. Levitan, Y. Fang, A. Rosenhouse-Dantsker, V. Romanenko // Subcell Biochem. – 2010. – Vol.51. – P.509-549.
132. Li, J. Oxysterol binding protein-related protein 8 mediates the cytotoxicity of 25-hydroxycholesterol / J. Li, X. Zheng, N. Lou, W. Zhong, D. Yan // J Lipid Res. – 2016. – Vol.57, №10. – P.1845-1853.
133. Li, L. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop / L. Li, Y.C. Yao, X.Q. Gu, D. Che, C.Q. Ma, Z.Y. Dai, C. Li, T. Zhou, W.B. Cai, Z.H. Yang, X. Yang, G.Q. Gao // J Biol Chem. – 2014. – Vol.289, №47. – P.32628-32638.
134. Li, N. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production / N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P. Robinson // J Biol Chem. – 2003. – Vol.278, №10. – P.8516-8525.

135. Li, Y. Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse / Y. Li, Y. Lee, W.J. Thompson // *J Neurosci.* – 2011. – Vol.31, №42. – P.14910-14919.
136. Linsenbardt, A.J. Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors / A.J. Linsenbardt, A. Taylor, C.M. Emmett, J.J. Doherty, K. Krishnan, D.F. Covey, S.M. Paul, C.F. Zorumski, S. Mennerick // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol.85. – P.232-242.
137. Liu, C. Oxysterols direct B-cell migration through EBI2 / C. Liu, X.V. Yang, J. Wu, C. Kuei, N.S. Mani, L. Zhang, J. Yu, S.W. Sutton, N. Qin, H. Banie, L. Karlsson, S. Sun, T.W. Lovenberg // *Nature.* – 2011. – Vol.475, №7357. – P.519-523.
138. Liu, Y. 25-Hydroxycholesterol activates the expression of cholesterol 25-hydroxylase in an LXR-dependent mechanism / Y. Liu, Z. Wei, X. Ma, X. Yang, Y. Chen, L. Sun, C. Ma, Q.R. Miao, D.P. Hajjar, J. Han, Y. Duan // *J Lipid Res.* – 2018. – Vol.59, №3. – P.439-451.
139. Liu, Y. Activation of liver X receptor plays a central role in antiviral actions of 25-hydroxycholesterol / Y. Liu, Z. Wei, Y. Zhang, X. Ma, Y. Chen, M. Yu, C. Ma, X. Li, Y. Cao, J. Liu, J. Han, X. Yang, Y. Duan // *J Lipid Res.* – 2018. – Vol.59, №12. – P.2287-2296.
140. Lustgarten, M.S. Complex I generated, mitochondrial matrix-directed superoxide is released from the mitochondria through voltage dependent anion channels / M.S. Lustgarten, A. Bhattacharya, F.L. Muller, Y.C. Jang, T. Shimizu, T. Shirasawa, A. Richardson, H. Van Remmen // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – Vol.422, №3. – P.515-521.
141. Lv, S. 25-Hydroxycholesterol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibiting PARP activity / S. Lv, C. Ju, J. Peng, M. Liang, F. Zhu, C. Wang, K. Huang, M. Cheng, F. Zhang // *Int J Biol Sci.* – 2020. – Vol.16, №2. – P.298-308.

142. Ma, Q. NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage / Q. Ma, S. Chen, Q. Hu, H. Feng, J.H. Zhang, J. Tang // *Ann Neurol.* – 2014. – Vol.75, №2. – P.209-219.
143. Magalon, K. Olesoxime favors oligodendrocyte differentiation through a functional interplay between mitochondria and microtubules / K. Magalon, M. Le Grand, B. El Waly, M. Moulis, R. Pruss, T. Bordet, M. Cayre, P. Belenguer, M. Carre, P. Durbec // *Neuropharmacology.* – 2016. – Vol.111. – P.293-303.
144. Magoro, T. IL-1beta/TNF-alpha/IL-6 inflammatory cytokines promote STAT1-dependent induction of CH25H in Zika virus-infected human macrophages / T. Magoro, A. Dandekar, L.T. Jennelle, R. Bajaj, G. Lipkowitz, A.R. Angelucci, P.O. Bessong, Y.S. Hahn // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol.294, №40. – P.14591-14602.
145. Margheri, G. The beta-subunit of cholera toxin has a high affinity for ganglioside GM1 embedded into solid supported lipid membranes with a lipid raft-like composition / G. Margheri, R. D'Agostino, S. Trigari, S. Sottini, M. Del Rosso // *Lipids.* – 2014. – Vol.49, №2. – P.203-206.
146. Marin, R. Voltage-dependent anion channel (VDAC) participates in amyloid beta-induced toxicity and interacts with plasma membrane estrogen receptor alpha in septal and hippocampal neurons / R. Marin, C.M. Ramirez, M. Gonzalez, E. Gonzalez-Munoz, A. Zorzano, M. Camps, R. Alonso, M. Diaz // *Mol Membr Biol.* – 2007. – Vol.24, №2. – P.148-160.
147. Martin, L.J. The mitochondrial permeability transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation / L.J. Martin, N.A. Adams, Y. Pan, A. Price, M. Wong // *J Neurosci.* – 2011. – Vol.31, №1. – P.359-370.
148. Mateos-Aparicio, P. Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity / P. Mateos-Aparicio, A. Rodriguez-Moreno // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – Vol.1131. – P.965-984.

149. Matz, J. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release / J. Matz, A. Gilyan, A. Kolar, T. McCarvill, S.R. Krueger // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol.107, №19. – P.8836-8841.
150. Miteva, A. Interaction between Calcium Chelators and the Activity of P2X7 Receptors in Mouse Motor Synapses / A. Miteva, A. Gaydukov, O. Balezina // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol.21, №6.
151. Mojsilovic-Petrovic, J. Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors / J. Mojsilovic-Petrovic, G.B. Jeong, A. Crocker, A. Arneja, S. David, D.S. Russell, R.G. Kalb // *J Neurosci.* – 2006. – Vol.26, №36. – P.9250-9263.
152. Moral-Naranjo, M.T. Targeting of acetylcholinesterase to lipid rafts of muscle / M.T. Moral-Naranjo, M.F. Montenegro, E. Munoz-Delgado, F.J. Campoy, C.J. Vidal // *Chem Biol Interact.* – 2008. – Vol.175, №1-3. – P.312-317.
153. Morciano, M. The proteome of the presynaptic active zone: from docked synaptic vesicles to adhesion molecules and maxi-channels / M. Morciano, T. Beckhaus, M. Karas, H. Zimmermann, W. Volkhardt // *J Neurochem.* – 2009. – Vol.108, №3. – P.662-675.
154. Morciano, M. Immunoisolation of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis / M. Morciano, J. Burre, C. Corvey, M. Karas, H. Zimmermann, W. Volkhardt // *J Neurochem.* – 2005. – Vol.95, №6. – P.1732-1745.
155. Morens, D.M. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century / D.M. Morens, A.S. Fauci // *J Infect Dis.* – 2007. – Vol.195, №7. – P.1018-1028.
156. Moustaqim-Barrette, A. The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein, VAP, is required for ER protein quality control / A. Moustaqim-Barrette, Y.Q. Lin, S. Pradhan, G.G. Neely, H.J. Bellen, H. Tsuda // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol.23, №8. – P.1975-1989.
157. 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.
158. 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.
 159. Murphy, R.C. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators / R.C. Murphy, K.M. Johnson // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol.283, №23. – P.15521-15525.
 160. Murthy, V.N. Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size / V.N. Murthy, T. Schikorski, C.F. Stevens, Y. Zhu // *Neuron.* – 2001. – Vol.32, №4. – P.673-682.
 161. Narai, H. Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation / H. Narai, Y. Manabe, M. Nagai, I. Nagano, Y. Ohta, T. Murakami, Y. Takehisa, T. Kamiya, K. Abe // *Neurol Int.* – 2009. – Vol.1, №1. – P.e16.
 162. Nascimento, F. Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission / F. Nascimento, A.M. Sebastiao, J.A. Ribeiro // *Purinergic Signal.* – 2015. – Vol.11, №4. – P.471-480.
 163. Naumenko, N. Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS / N. Naumenko, E. Pollari, A. Kurronen, R. Giniatullina, A. Shakirzyanova, J. Magga, J. Koistinaho, R. Giniatullin // *Front Cell Neurosci.* – 2011. – Vol.5. – P.26.
 164. Norata, G.D. Statins and skeletal muscles toxicity: from clinical trials to everyday practice / G.D. Norata, G. Tibolla, A.L. Catapano // *Pharmacol Res.* – 2014. – Vol.88. – P.107-113.
 165. Nury, T. Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols / T. Nury, A. Zarrouk, A. Yammine, J.J. Mackrill, A. Vejux, G. Lizard // *Br J Pharmacol.* – 2021. – Vol.178, №16. – P.3115-3123.

166. Odnoshivkina, U.G. beta2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect / U.G. Odnoshivkina, V.I. Sytchev, L.F. Nurullin, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov, A.M. Petrov // *Eur J Pharmacol.* – 2015. – Vol.765. – P.140-153.
167. Odnoshivkina, Y.G. Cholesterol regulates contractility and inotropic response to beta2-adrenoceptor agonist in the mouse atria: Involvement of Gi-protein-Akt-NO-pathway / Y.G. Odnoshivkina, V.I. Sytchev, A.M. Petrov // *J Mol Cell Cardiol.* – 2017. – Vol.107. – P.27-40.
168. Ohyama, Y. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes / Y. Ohyama, S. Meaney, M. Heverin, L. Ekstrom, A. Brafman, M. Shafir, U. Andersson, M. Olin, G. Eggertsen, U. Diczfalussy, E. Feinstein, I. Bjorkhem // *The Journal of biological chemistry.* – 2006. – Vol. 281. – P. 3810-3820.
169. Okada, S.F. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells / S.F. Okada, W.K. O'Neal, P. Huang, R.A. Nicholas, L.E. Ostrowski, W.J. Craigen, E.R. Lazarowski, R.C. Boucher // *J Gen Physiol.* – 2004. – Vol.124, №5. – P.513-526.
170. Olah, M. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination / M. Olah, S. Amor, N. Brouwer, J. Vinet, B. Eggen, K. Biber, H.W. Boddeke // *Glia.* – 2012. – Vol.60, №2. – P.306-321.
171. Oncul, S. Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis / S. Oncul, A.S. Klymchenko, O.A. Kucherak, A.P. Demchenko, S. Martin, M. Dontenwill, Y. Arntz, P. Didier, G. Duportail, Y. Mely // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol.1798, №7. – P.1436-1443.
172. Ostasov, P. FLIM studies of 22- and 25-NBD-cholesterol in living HEK293 cells: plasma membrane change induced by cholesterol depletion / P. Ostasov, J. Sykora, J. Brejchova, A. Olzynska, M. Hof, P. Svoboda // *Chem Phys Lipids.* – 2013. – Vol.167-168. – P.62-69.

173. Ouyang, S. Emerging role of Insig-1 in lipid metabolism and lipid disorders / S. Ouyang, Z. Mo, S. Sun, K. Yin, Y. Lv // Clin Chim Acta. – 2020. – Vol.508. – P.206-212.
174. Ovsepian, S.V. Internalization and retrograde axonal trafficking of tetanus toxin in motor neurons and trans-synaptic propagation at central synapses exceed those of its C-terminal-binding fragments / S.V. Ovsepian, M. Bodeker, V.B. O'Leary, G.W. Lawrence, J. Oliver Dolly // Brain Struct Funct. – 2015. – Vol.220, №3. – P.1825-1838.
175. Ovsepian, S.V. Neurobiology and therapeutic applications of neurotoxins targeting transmitter release / S.V. Ovsepian, V.B. O'Leary, N.M. Ayvazyan, A. Al-Sabi, V. Ntziachristos, J.O. Dolly // Pharmacol Ther. – 2019. – Vol.193. – P.135-155.
176. Ovsepian, S.V. Circumventing Brain Barriers: Nanovehicles for Retroaxonal Therapeutic Delivery / S.V. Ovsepian, V.B. O'Leary, V. Ntziachristos, J.O. Dolly // Trends Mol Med. – 2016. – Vol.22, №11. – P.983-993.
177. Ovsepian, S.V. Amyloid Plaques of Alzheimer's Disease as Hotspots of Glutamatergic Activity / S.V. Ovsepian, V.B. O'Leary, L. Zaborszky, V. Ntziachristos, J.O. Dolly // Neuroscientist. – 2019. – Vol.25, №4. – P.288-297.
178. Parakh, S. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis / S. Parakh, D.M. Spencer, M.A. Halloran, K.Y. Soo, J.D. Atkin // Oxid Med Cell Longev. – 2013. – Vol.2013. – P.408681.
179. Pathak, D. The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling / D. Pathak, L.Y. Shields, B.A. Mendelsohn, D. Haddad, W. Lin, A.A. Gerencser, H. Kim, M.D. Brand, R.H. Edwards, K. Nakamura // J Biol Chem. – 2015. – Vol.290, №37. – P.22325-22336.
180. Pato, C. Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering / C. Pato, F. Stetzkowski-Marden, K. Gaus, M. Recouvreur, A. Cartaud, J. Cartaud // Chem Biol Interact. – 2008. – Vol.175, №1-3. – P.64-67.
181. Paul, S.M. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors / S. M. Paul, J. J.

- Doherty, A.J. Robichaud, G. M. Belfort, B. Y. Chow, R. S. Hammond, D. C. Crawford, A. J. Linsenbardt, H. J. Shu, Y. Izumi // *J Neurosci.* – 2013. – Vol. 33(44) – P. 17290-17300.
182. Pereira, E.C. Immunolocalisation of neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction of MDX mice: a confocal microscopy study / E. C. Pereira, H. S. Neto, M. J. Marques // *J. Anat.* – 2001. – Vol. 198. – P. 663-671.
183. Perry, R.J. Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein / R.J. Perry, N.D. Ridgway // *Mol Biol Cell.* – 2006. – Vol.17, №6. – P.2604-2616.
184. Personius, K.E. Neuromuscular NMDA Receptors Modulate Developmental Synapse Elimination / K.E. Personius, B.S. Slusher, S.B. Udin // *J Neurosci.* – 2016. – Vol.36, №34. – P.8783-8789.
185. Petrov, A.M. The role of cGMP-dependent signaling pathway in synaptic vesicle cycle at the frog motor nerve terminals / A.M. Petrov, A.R. Giniatullin, G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // *J Neurosci.* – 2008. – Vol.28, №49. – P.13216-13222.
186. Petrov, A.M. Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction / A.M. Petrov, M.R. Kasimov, A.L. Zefirov // *Acta Naturae.* – 2016. – Vol.8, №1. – P.58-73.
187. Petrov, A.M. Cholesterol in the Pathogenesis of Alzheimer's, Parkinson's Diseases and Autism: Link to Synaptic Dysfunction / A.M. Petrov, M.R. Kasimov, A.L. Zefirov // *Acta Naturae.* – 2017. – Vol.9, №1. – P.26-37.
188. Petrov, A.M. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse / A.M. Petrov, V.V. Kravtsova, V.V. Matchkov, A.N. Vasiliev, A.L. Zefirov, A.V. Chibalin, J.A. Heiny, Krivoi, II // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2017. – Vol.312, №5. – P.C627-C637.
189. Petrov, A.M. Increased non-quantal release of acetylcholine after inhibition of endocytosis by methyl-beta-cyclodextrin: the role of vesicular acetylcholine

- transporter / A.M. Petrov, N.V. Naumenko, K.V. Uzinskaya, A.R. Giniatullin, A.K. Urazaev, A.L. Zefirov // *Neuroscience*. – 2011. – Vol.186. – P.1-12.
190. 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.
 191. Petrov, A.M. Role of membrane cholesterol in spontaneous exocytosis at frog neuromuscular synapses: reactive oxygen species-calcium interplay / A.M. Petrov, A.A. Yakovleva, A.L. Zefirov // *J Physiol*. – 2014. – Vol.592, №22. – P.4995-5009.
 192. Pfohl, S.R. Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis / S.R. Pfohl, M.T. Halicek, C.S. Mitchell // *J Neuromuscul Dis*. – 2015. – Vol.2, №2. – P.137-150.
 193. Pfrieder, F.W. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes / F.W. Pfrieder, N. Ungerer // *Prog Lipid Res*. – 2011. – Vol.50, №4. – P.357-371.
 194. Phillips, G.R. Proteomic comparison of two fractions derived from the transsynaptic scaffold / G.R. Phillips, L. Florens, H. Tanaka, Z.Z. Khaing, L. Fidler, J.R. Yates, 3rd, D.R. Colman // *J Neurosci Res*. – 2005. – Vol.81, №6. – P.762-775.
 195. Pombo, J.P. Perturbation of Intracellular Cholesterol and Fatty Acid Homeostasis During Flavivirus Infections / J.P. Pombo, S. Sanyal // *Front Immunol*. – 2018. – Vol.9. – P.1276.
 196. Raghavan, A. Voltage-dependant anion channels: novel insights into isoform function through genetic models / A. Raghavan, T. Sheiko, B.H. Graham, W.J. Craigen // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol.1818, №6. – P.1477-1485.
 197. Rahbar, A.M. Integration of Jacobson's pellicle method into proteomic strategies for plasma membrane proteins / A.M. Rahbar, C. Fenselau // *J Proteome Res*. – 2004. – Vol.3, №6. – P.1267-1277.

198. Ramirez, C.M. VDAC and ERalpha interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease / C.M. Ramirez, M. Gonzalez, M. Diaz, R. Alonso, I. Ferrer, G. Santpere, B. Puig, G. Meyer, R. Marin // *Mol Cell Neurosci.* – 2009. – Vol.42, №3. – P.172-183.
199. Reidy, P.T. Influence of Exercise Training on Skeletal Muscle Insulin Resistance in Aging: Spotlight on Muscle Ceramides / P.T. Reidy, Z.S. Mahmassani, A.I. McKenzie, J.J. Petrocelli, S.A. Summers, M.J. Drummond // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol.21, №4.
200. Revelo, N.H. A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways / N.H. Revelo, D. Kamin, S. Truckenbrodt, A.B. Wong, K. Reuter-Jessen, E. Reisinger, T. Moser, S.O. Rizzoli // *J Cell Biol.* – 2014. – Vol.205, №4. – P.591-606.
201. Rich, M. Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers / M. Rich, J.W. Lichtman // *Neuron.* – 1989. – Vol.3, №6. – P.677-688.
202. Richards, D.A. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction / D.A. Richards, C. Guatimosim, S.O. Rizzoli, W.J. Betz // *Neuron.* – 2003. – Vol.39, №3. – P.529-541.
203. Rios, R. Macrophage roles in peripheral nervous system injury and pathology: Allies in neuromuscular junction recovery / R. Rios, A. Jablonka-Shariff, C. Broberg, A.K. Snyder-Warwick // *Mol Cell Neurosci.* – 2021. – Vol.111. – P.103590.
204. Rizo, J. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus / J. Rizo // *Protein Sci.* – 2018. – Vol.27, №8. – P.1364-1391.
205. Rizzoli, S.O. Synaptic vesicle recycling: steps and principles / S.O. Rizzoli // *EMBO J.* – 2014. – Vol.33, №8. – P.788-822.
206. Rizzoli, S.O. Synaptic vesicle pools / S.O. Rizzoli, W.J. Betz // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – Vol.6, №1. – P.57-69.
207. Rocha, M.C. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset / M.C. Rocha, P.A.

- Pousinha, A.M. Correia, A.M. Sebastiao, J.A. Ribeiro // PLoS One. – 2013. – Vol.8, №9. – P.e73846.
208. Rodriguez-Agudo, D. Localization of StarD5 cholesterol binding protein / D. Rodriguez-Agudo, S. Ren, P.B. Hylemon, R. Montanez, K. Redford, R. Natarajan, M.A. Medina, G. Gil, W.M. Pandak // J Lipid Res. – 2006. – Vol.47, №6. – P.1168-1175.
209. Rodriguez-Agudo, D Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein / D. Rodriguez-Agudo, S. Ren, P.B. Hylemon, K. Redford, R. Natarajan, A. Del Castillo, G. Gil, W.M. Pandak // J Lipid Res. – 2005. – Vol.46, №8. – P.1615-1623.
210. Rogers, R.S. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions / R.S. Rogers, H. Nishimune // Matrix Biol. – 2017. – Vol.57-58. – P.86-105.
211. Rohrbough, J. Ceramidase regulates synaptic vesicle exocytosis and trafficking / J. Rohrbough, E. Rushton, L. Palanker, E. Woodruff, H.J. Matthies, U. Acharya, J.K. Acharya, K. Broadie // J Neurosci. – 2004. – Vol.24, №36. – P.7789-7803.
212. Rothman, J.E. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics / J.E. Rothman, G. Warren // Curr Biol. – 1994. – Vol.4, №3. – P.220-233.
213. Rovini, A. Molecular mechanism of olesoxime-mediated neuroprotection through targeting alpha-synuclein interaction with mitochondrial VDAC / A. Rovini, P.A. Gurnev, A. Beilina, M. Queralt-Martin, W. Rosencrans, M.R. Cookson, S.M. Bezrukov, T.K. Rostovtseva // Cell Mol Life Sci. – 2020. – Vol.77, №18. – P.3611-3626.
214. Ruff, R.L. Nature and Action of Antibodies in Myasthenia Gravis / R.L. Ruff, R.P. Lisak // Neurol Clin. – 2018. – Vol.36, №2. – P.275-291.
215. Sawada, A. Neuron-targeted caveolin-1 improves neuromuscular function and extends survival in SOD1(G93A) mice / A. Sawada, S. Wang, M. Jian, J. Leem, J. Wackerbarth, J. Egawa, J.M. Schilling, O. Platoshyn, A. Zemljic-Harpf, D.M.

- Roth, H.H. Patel, P.M. Patel, M. Marsala, B.P. Head // *FASEB J.* – 2019. – Vol.33, №6. – P.7545-7554.
216. Schikorski, T. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses / T. Schikorski, C.F. Stevens // *J Neurosci.* – 1997. – Vol.17, №15. – P.5858-5867.
217. Schmidt, N. Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular junction synaptic membrane / N. Schmidt, S. Basu, S. Sladeczek, S. Gatti, J. van Haren, S. Treves, J. Pielage, N. Galjart, H.R. Brenner // *J Cell Biol.* – 2012. – Vol.198, №3. – P.421-437.
218. Searl, T. Acetylcholine recycling and release at rat motor nerve terminals studied using (-)-vesamicol and troxpyrrolium / T. Searl, C. Prior, I.G. Marshall // *J Physiol.* – 1991. – Vol.444. – P.99-116.
219. Shafir, I. Voltage-dependent anion channel proteins in synaptosomes of the torpedo electric organ: immunolocalization, purification, and characterization / I. Shafir, W. Feng, V. Shoshan-Barmataz // *J Bioenerg Biomembr.* – 1998. – Vol.30, №5. – P.499-510.
220. Shen, C. Angiotensin-II-induced Muscle Wasting is Mediated by 25-Hydroxycholesterol via GSK3beta Signaling Pathway / C. Shen, J. Zhou, X. Wang, X.Y. Yu, C. Liang, B. Liu, X. Pan, Q. Zhao, J.L. Song, J. Wang, M. Bao, C. Wu, Y. Li, Y.H. Song // *EBioMedicine.* – 2017. – Vol.16. – P.238-250.
221. Shibata, N. 25-Hydroxycholesterol activates the integrated stress response to reprogram transcription and translation in macrophages / N. Shibata, A.F. Carlin, N.J. Spann, K. Saijo, C.S. Morello, J.G. McDonald, C.E. Romanoski, M.R. Maurya, M.U. Kaikkonen, M.T. Lam, A. Crotti, D. Reichart, J.N. Fox, O. Quehenberger, C.R. Raetz, M.C. Sullards, R.C. Murphy, A.H. Merrill, Jr., H.A. Brown, E.A. Dennis, E. Fahy, S. Subramaniam, D.R. Cavener, D.H. Spector, D.W. Russell, C.K. Glass // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol.288, №50. – P.35812-35823.

222. Shupliakov, O. Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles / O. Shupliakov, L. Brodin // *Exp Cell Res.* – 2010. – Vol.316, №8. – P.1344-1350.
223. Shynkar, V.V. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis / V.V. Shynkar, A.S. Klymchenko, C. Kunzelmann, G. Duportail, C.D. Muller, A.P. Demchenko, J.M. Freyssinet, Y. Mely // *J Am Chem Soc.* – 2007. – Vol.129, №7. – P.2187-2193.
224. Slater, C.R. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions / C.R. Slater // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol.18, №10.
225. Slater, C.R. 'Fragmentation' of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions / C.R. Slater // *Neuroscience.* – 2020. – Vol.439. – P.28-40.
226. Smrcka, A.V. G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling / A.V. Smrcka // *Cell Mol Life Sci.* – 2008. – Vol.65, №14. – P.2191-2214.
227. Sollner, T.H. Regulated exocytosis and SNARE function (Review) / T.H. Sollner // *Mol Membr Biol.* – 2003. – Vol.20, №3. – P.209-220.
228. Soroosh, P. Oxysterols are agonist ligands of ROR γ and drive Th17 cell differentiation / P. Soroosh, J. Wu, X. Xue, J. Song, S.W. Sutton, M. Sablad, J. Yu, M.I. Nelen, X. Liu, G. Castro, R. Luna, S. Crawford, H. Banie, R.A. Dandridge, X. Deng, A. Bittner, C. Kuei, M. Tootoonchi, N. Rozenkrants, K. Herman, J. Gao, X.V. Yang, K. Sachen, K. Ngo, W.P. Fung-Leung, S. Nguyen, A. de Leon-Tabaldo, J. Blevitt, Y. Zhang, M.D. Cummings, T. Rao, N.S. Mani, C. Liu, M. McKinnon, M.E. Milla, A.M. Fourie, S. Sun // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – Vol.111, №33. – P.12163-12168.
229. Sottero, B. Omics analysis of oxysterols to better understand their pathophysiological role / B. Sottero, D. Rossin, E. Staurengi, P. Gamba, G. Poli, G. Testa // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – Vol.144. – P.55-71.

230. Stein, C.A. Specific VDAC inhibitors: phosphorothioate oligonucleotides / C.A. Stein, M. Colombini // *J Bioenerg Biomembr.* – 2008. – Vol.40, №3. – P.157-162.
231. Stevens, S.M. Proteomic analysis of the synaptic plasma membrane fraction isolated from rat forebrain / S.M. Stevens, Jr., A.D. Zharikova, L. Prokai // *Brain Res Mol Brain Res.* – 2003. – Vol.117, №2. – P.116-128.
232. Stojilkovic, S.S. Ca²⁺-regulated exocytosis and SNARE function / S.S. Stojilkovic // *Trends Endocrinol Metab.* – 2005. – Vol.16, №3. – P.81-83.
233. Sugita, S. VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions / S. Sugita, L.L. Fleming, C. Wood, S.K. Vaughan, M.P. Gomes, W. Camargo, L.A. Naves, V.F. Prado, M.A. Prado, C. Guatimosim, G. Valdez // *Skelet Muscle.* – 2016. – Vol.6. – P.31.
234. Sunyach, C. Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model / C. Sunyach, M. Michaud, T. Arnoux, N. Bernard-Marissal, J. Aebischer, V. Latyszenok, C. Gouarne, C. Raoul, R.M. Pruss, T. Bordet, B. Pettmann // *Neuropharmacology.* – 2012. – Vol.62, №7. – P.2346-2352.
235. Takamori, S. Molecular anatomy of a trafficking organelle / S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S.A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn // *Cell.* – 2006. – Vol.127, №4. – P.831-846.
236. Talbot, C.J. Developmental analysis of SV2 in the embryonic chicken corneal epithelium / C.J. Talbot, J.K. Kubilus // *Exp Eye Res.* – 2018. – Vol.172. – P.137-143.
237. Tan, W. Phosphorothioate oligonucleotides reduce mitochondrial outer membrane permeability to ADP / W. Tan, J.C. Lai, P. Miller, C.A. Stein, M. Colombini // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – Vol.292, №4. – P.C1388-1397.

238. Teuling, E. Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates / E. Teuling, S. Ahmed, E. Haasdijk, J. Demmers, M.O. Steinmetz, A. Akhmanova, D. Jaarsma, C.C. Hoogenraad // *J Neurosci.* – 2007. – Vol.27, №36. – P.9801-9815.
239. Tracey, T.J. The role of lipids in the central nervous system and their pathological implications in amyotrophic lateral sclerosis / T.J. Tracey, S.E. Kirk, F.J. Steyn, S.T. Ngo // *Semin Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol.112. – P.69-81.
240. Traina, G. Learning processes in elementary nervous systems section sign / G. Traina // *J Integr Neurosci.* – 2020. – Vol.19, №4. – P.673-678.
241. Tremblay, E. Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter / E. Tremblay, E. Martineau, R. Robitaille // *J Neurosci.* – 2017. – Vol.37, №37. – P.8901-8918.
242. Trinchieri, G. Type I interferon: friend or foe? / G. Trinchieri // *J Exp Med.* – 2010. – Vol.207, №10. – P.2053-2063.
243. Truckenbrodt, S. Spontaneous vesicle recycling in the synaptic bouton / S. Truckenbrodt, S.O. Rizzoli // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol.8. – P.409.
244. 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.
245. Turner, M.R. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis / M.R. Turner, O. Hardiman, M. Benatar, B.R. Brooks, A. Chio, M. de Carvalho, P.G. Ince, C. Lin, R.G. Miller, H. Mitsumoto, G. Nicholson, J. Ravits, P.J. Shaw, M. Swash, K. Talbot, B.J. Traynor, L.H. Van den Berg, J.H. Veldink, S. Vucic, M.C. Kiernan // *Lancet Neurol.* – 2013. – Vol.12, №3. – P.310-322.
246. Unsworth, A.J. Non-genomic effects of nuclear receptors: insights from the anucleate platelet / A.J. Unsworth, G.D. Flora, J.M. Gibbins // *Cardiovasc Res.* – 2018. – Vol.114, №5. – P.645-655.

247. Ursan, R. Membrane cholesterol oxidation downregulates atrial beta-adrenergic responses in ROS-dependent manner / R. Ursan, U.G. Odnoshivkina, A.M. Petrov // *Cell Signal.* – 2020. – Vol.67. – P.109503.
248. Urushitani, M. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis / M. Urushitani, A. Sik, T. Sakurai, N. Nukina, R. Takahashi, J.P. Julien // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol.9, №1. – P.108-118.
249. Valdez, G. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles / G. Valdez, J.C. Tapia, J.W. Lichtman, M.A. Fox, J.R. Sanes // *PLoS One.* – 2012. – Vol.7, №4. – P.e34640.
250. van der Pijl, E.M. Characterization of neuromuscular synapse function abnormalities in multiple Duchenne muscular dystrophy mouse models / E.M. van der Pijl, M. van Putten, E.H. Niks, J.J. Verschuuren, A. Aartsma-Rus, J.J. Plomp // *Eur J Neurosci.* – 2016. – Vol.43, №12. – P.1623-1635.
251. Vejux, A. Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Status and Interest of Oxysterols and Phytosterols / A. Vejux, A. Namsi, T. Nury, T. Moreau, G. Lizard // *Front Mol Neurosci.* – 2018. – Vol.11. – P.12.
252. Volkmandt, W. Proteomic analysis of the presynaptic active zone / W. Volkmandt, M. Karas // *Exp Brain Res.* – 2012. – Vol.217, №3-4. – P.449-461.
253. Vollrath, J.T. Loss of function of the ALS protein SigR1 leads to ER pathology associated with defective autophagy and lipid raft disturbances / J.T. Vollrath, A. Sechi, A. Dreser, I. Katona, D. Wiemuth, J. Vervoorts, M. Dohmen, A. Chandrasekar, J. Prause, E. Brauers, C.M. Jesse, J. Weis, A. Goswami // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol.5. – P.e1290.
254. Vucic, S. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies / S. Vucic, J.D. Rothstein, M.C. Kiernan // *Trends Neurosci.* – 2014. – Vol.37, №8. – P.433-442.
255. Vyskocil, F. Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction / F. Vyskocil, A.I. Malomouzh, E.E. Nikolsky // *Physiol Res.* – 2009. – Vol.58, №6. – P.763-784.

256. Walther, T.C. Lipid droplets and cellular lipid metabolism / T.C. Walther, R.V. Farese, Jr. // *Annu Rev Biochem.* – 2012. – Vol.81. – P.687-714.
257. Wang, B. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis / B. Wang, P. Tontonoz // *Nat Rev Endocrinol.* – 2018. – Vol.14, №8. – P.452-463.
258. Waxenbaum, J.A. Anatomy, Autonomic Nervous System / J.A.Waxenbaum, V. Reddy, M. Varacallo // *StatPearls.* - Treasure Island (FL), 2021.
259. Webb, R. The Ability of Exercise-Associated Oxidative Stress to Trigger Redox-Sensitive Signalling Responses / R. Webb, M.G. Hughes, A.W. Thomas, K. Morris // *Antioxidants (Basel).* – 2017. – Vol.6, №3.
260. Weber, J.J. Olesoxime in neurodegenerative diseases: Scrutinising a promising drug candidate / J.J. Weber, L.E. Clemensson, H.B. Schioth, H.P. Nguyen // *Biochem Pharmacol.* – 2019. – Vol.168. – P.305-318.
261. Weiser, B.P. Computational investigation of cholesterol binding sites on mitochondrial VDAC / B.P. Weiser, R. Salari, R.G. Eckenhoff, G. Brannigan // *J Phys Chem B.* – 2014. – Vol.118, №33. – P.9852-9860.
262. Westphal, V. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement / V. Westphal, S.O. Rizzoli, M.A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S.W. Hell // *Science.* – 2008. – Vol.320, №5873. – P.246-249.
263. Wheeler, S. Niemann-Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy / S. Wheeler, D.J. Sillence // *J Neurochem.* – 2020. – Vol.153, №6. – P.674-692.
264. Willmann, R. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction / R. Willmann, S. Pun, L. Stallmach, G. Sadasivam, A.F. Santos, P. Caroni, C. Fuhrer // *EMBO J.* – 2006. – Vol.25, №17. – P.4050-4060.
265. Xing, G. Rapsyn as a signaling and scaffolding molecule in neuromuscular junction formation and maintenance / G. Xing, W.C. Xiong, L. Mei // *Neurosci Lett.* – 2020. – Vol.731. – P.135013.

266. Xiong, X. Enrichment and proteomic analysis of plasma membrane from rat dorsal root ganglions / X. Xiong, S. Huang, H. Zhang, J. Li, J. Shen, J. Xiong, Y. Lin, L. Jiang, X. Wang, S. Liang // *Proteome Sci.* – 2009. – Vol.7. – P.41.
267. Xu, X. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation / X. Xu, E. London // *Biochemistry.* – 2000. – Vol.39, №5. – P.843-849.
268. Yan, D. OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages / D. Yan, M.I. Mayranpaa, J. Wong, J. Perttila, M. Lehto, M. Jauhiainen, P.T. Kovanen, C. Ehnholm, A.J. Brown, V.M. Olkkonen // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol.283, №1. – P.332-340.
269. Yang, Y.M. A small molecule screen in stem-cell-derived motor neurons identifies a kinase inhibitor as a candidate therapeutic for ALS / Y.M. Yang, S.K. Gupta, K.J. Kim, B.E. Powers, A. Cerqueira, B.J. Wainger, H.D. Ngo, K.A. Rosowski, P.A. Schein, C.A. Ackeifi, A.C. Arvanites, L.S. Davidow, C.J. Woolf, L.L. Rubin // *Cell Stem Cell.* – 2013. – Vol.12, №6. – P.713-726.
270. Yeagle, P.L. Cholesterol and the cell membrane / P.L. Yeagle // *Biochim Biophys Acta.* – 1985. – Vol.822, №3-4. – P.267-287.
271. Yokoyama, M. Effects of lipoprotein lipase and statins on cholesterol uptake into heart and skeletal muscle / M. Yokoyama, T. Seo, T. Park, H. Yagyu, Y. Hu, N.H. Son, A.S. Augustus, R.K. Vikramadithyan, R. Ramakrishnan, L.K. Pulawa, R.H. Eckel, I.J. Goldberg // *J Lipid Res.* – 2007. – Vol.48, №3. – P.646-655.
272. Zakharov, A.V. Elph: An Open-Source Program for Acquisition Control and Analysis of Electrophysiological Signals / A.V. Zakharov // *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki.* – 2019. – Vol.161, №2. – P.245-254.
273. 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.

274. Zakyryanova, G.F. Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol / G.F. Zakyryanova, A.R. Giniatullin, K.A. Mukhutdinova, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // *Life Sci.* – 2021. – Vol.273. – P.119300.
275. Zakyryanova, G.F. Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism / G.F. Zakyryanova, A.N. Tsentsevitsky, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // *Free Radic Biol Med.* – 2021. – Vol.174. – P.121-134.
276. Zefirov, A.L. Intracellular Acidification Suppresses Synaptic Vesicle Mobilization in the Motor Nerve Terminals / A.L. Zefirov, R.D. Mukhametzyanov, A.V. Zakharov, K.A. Mukhutdinova, U.G. Odnoshivkina, A.M. Petrov // *Acta Naturae.* – 2020. – Vol.12, №4. – P.105-113.
277. Zefirov, A.L. The vesicle cycle in motor nerve endings of the mouse diaphragm / A.L. Zefirov, A.V. Zakharov, R.D. Mukhametzyanov, A.M. Petrov, G.F. Sitdikova // *Neurosci Behav Physiol.* – 2009. – Vol.39, №3. – P.245-252.
278. Zhai, J. Proteomic characterization of lipid raft proteins in amyotrophic lateral sclerosis mouse spinal cord / J. Zhai, A.L. Strom, R. Kilty, P. Venkatakrishnan, J. White, W.V. Everson, E.J. Smart, H. Zhu // *FEBS J.* – 2009. – Vol.276, №12. – P.3308-3323.
279. Zhang, B.G. Combination of agrin and laminin increase acetylcholine receptor clustering and enhance functional neuromuscular junction formation In vitro / B.G. Zhang, A.F. Quigley, J.L. Bourke, C.J. Nowell, D.E. Myers, P.F. Choong, R.M. Kapsa // *Dev Neurobiol.* – 2016. – Vol.76, №5. – P.551-565.
280. Zhang, J. Metabolism of 27-, 25- and 24-hydroxycholesterol in rat glial cells and neurons / J. Zhang, Y. Akwa, M. el-Etr, E.E. Baulieu, J. Sjovald // *Biochem J.* – 1997. – Vol.322 (Pt 1). – P.175-184.
281. Zhao, J. Multifaceted Functions of CH25H and 25HC to Modulate the Lipid Metabolism, Immune Responses, and Broadly Antiviral Activities / J. Zhao, J. Chen, M. Li, M. Chen, C. Sun // *Viruses.* – 2020. – Vol.12, №7.

282. Zhao, L. Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies / L. Zhao, S. Zhou, J.A. Gustafsson // *Endocr Rev.* – 2019. – Vol.40, №5. – P.1207-1249.
283. Zheng, Z. Statins and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis / Z. Zheng, L. Sheng, H. Shang // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2013. – Vol.14, №4. – P.241-245.
284. Zhong, W. ORP4L Facilitates Macrophage Survival via G-Protein-Coupled Signaling: ORP4L^{-/-} Mice Display a Reduction of Atherosclerosis / W. Zhong, G. Pan, L. Wang, S. Li, J. Ou, M. Xu, J. Li, B. Zhu, X. Cao, H. Ma, C. Li, J. Xu, V.M. Olkkonen, B. Staels, D. Yan // *Circ Res.* – 2016. – Vol.119, №12. – P.1296-1312.
285. Zhu, R. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review) / R. Zhu, Z. Ou, X. Ruan, J. Gong // *Mol Med Rep.* – 2012. – Vol.5, №4. – P.895-900.