

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623320>

Оксистерол-зависимый путь регуляции синаптической передачи в нервно-мышечном контакте мышцы

Г.Ф. Закирьянова^{1,2*}, А.Н. Ценцевицкий¹, А.Р. Гиниатуллин^{1,2}, Е.А. Кузнецова¹,
А.М. Петров^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Российская Федерация;

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Холестерин является важным участником в поддержании жёсткости, текучести и проницаемости билипидного слоя. В дополнение, холестерин обладает большим сродством ко многим белкам мембраны, тем самым способен модулировать их активность, влияя на внутриклеточные процессы. Холестерин подвергается ферментативным и окислительным превращениям, при которых образуются разнообразные оксистерины. Одним из таких оксистеринов является 25-гидроксихолестерин (25ГХ), образующийся при участии фермента холестерин-25-гидроксилазы в основном в макрофагах, дендритных клетках и микроглии.

25ГХ способен поддерживать гомеостаз холестерина в отдельной клетке, где его концентрация не превышает нормальных значений. Однако подобно паракринному агенту 25ГХ в существенно более высоких концентрациях вырабатывается макрофагами и микроглией при воспалительной реакции.

Много исследований посвящено роли 25ГХ в иммунном ответе в условиях воспаления. 25ГХ может иметь разнонаправленный эффект в модуляции иммунного ответа. С одной стороны, 25ГХ увеличивает секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов, например, IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL5 и макрофагального колониестимулирующего фактора, а с другой, подавляет воспаление посредством снижения активности инфламмасом. Увеличение продукции 25ГХ при активации Toll-подобного рецептора 4 приводит к снижению пролиферации В-клеток. Также отмечена способность 25ГХ препятствовать проникновению вирусов в клетку за счёт его способности встраиваться в мембрану и менять свойства мембран. Касательно нервной системы не так много данных. В срезах гиппокампа мыши 25ГХ блокирует потенцирующий эффект ряда позитивных аллостерических модуляторов NMDA-рецепторов, что снижает вероятность эксайтотоксичности в условиях гиперактивации NMDA-рецепторов.

Макрофаги играют ключевую роль в адаптивном и врождённом иммунитете и в большом количестве присутствуют в скелетной мышце, что может говорить о функциональном значении 25ГХ во взаимодействии иммунной системы и скелетных мышц. В нервно-мышечном синапсе в диафрагме мыши нами обнаружен концентрационно-зависимый эффект 25ГХ: высокие концентрации (1–10 мкМ) усиливают, а низкие концентрации (0,01–0,1 мкМ) угнетают процесс нервно-мышечной передачи [1].

25ГХ является прямым лигандом для LX-рецепторов, экспрессия которых была нами обнаружена в синаптическом регионе аксонов мотонейронов. Механизм действия высокой концентрации 25ГХ в синаптической передаче осуществляется LX-рецептор-зависимым путём. При этом 25ГХ активировал LX-рецепторы, которые, вероятно, находились в комплексе с эстрогеновыми рецепторами α , затем происходил запуск следующего сигнального пути G $_i$ -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/фосфолипаза C/ Ca^{2+} /протеинкиназа C. Стоит отметить, что потенцирующий эффект 25ГХ, осуществляемый посредством активации комплекса LX-рецептор/эстрогеновый рецептор α , напрямую зависит от липидных рафтов, поскольку оба этих рецептора локализованы в липидных микродоменах, и разрушение липидных рафтов предотвращало стимулирующее действие 25ГХ. Также обнаружен вклад активных форм кислорода (АФК) в зависимом от 25ГХ усилении синаптической передачи. Действительно, 25ГХ (1 мкМ) увеличивает продукцию АФК в синаптическом регионе и концентрацию пероксида водорода во внеклеточной среде. Этот рост АФК был зависим от внутриклеточного повышения концентрации ионов кальция. Интересно, что в данном случае АФК играют сигнальную роль, поскольку уровень перекисного окисления липидов под действием 25ГХ не затрагивается.

Экспрессия 25ГХ повышается при ряде нейродегенеративных заболеваний. Концентрация 25ГХ повышается при боковом амиотрофическом склерозе, характеризующемся прогрессирующей атрофией мышц, приводящей к летальному исходу. Высокие концентрации 25ГХ свыше 5–30 мкМ могут снижать выживаемость и индуцировать апоптоз двигательных нейронов. Однако низкие концентрации 1 мкМ и менее имеют противоположные эффекты, увеличивая выживаемость нейронов.

Рукопись получена: 15.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Отмечена важная роль липидных рафтов в патогенезе БАС. Например, при БАС снижается уровень кавеолина-1, что приводит к нарушению липидных рафтов, тем самым способствуя прогрессированию заболевания. К тому же у мышей с моделью БАС SOD1^{G93A} на ранней стадии заболевания нами обнаружены изменения свойств мембран, а именно дестабилизация липидных рафтов и упорядоченности липидного бислоя, увеличение текучести мембраны [2]. Одним из предположительных причинных факторов данного явления может быть увеличение церамида в мышцах, который приводит к дестабилизации рафтов, например, при двигательной разгрузке [3–5]. Действительно, повышенный уровень церамида нами был обнаружен и в мембране мышей с моделью БАС на ранней стадии. При БАС выявлено повышение уровня внеклеточного холина, вероятно, из-за увеличения некантовой секреции нейромедиатора, что может возникать вследствие нарушения липидных рафтов. Стоит отметить, что нерегулируемое увеличение ацетилхолина при БАС способствует двигательной дисфункции и проявлению признаков возрастных морфологических изменений в нервно-мышечном соединении, например, нарушению кластеризации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в постсинаптической мембране. В дополнение, нарушение липидных рафтов при БАС было сопряжено с увеличением уровня гидроперекисей в гомогенатах мышц с моделью БАС и перекисного окисления липидов. Исходя из вышеперечисленного, можно заключить, что при БАС нарушаются свойства мембраны. Далее нами было обнаружено, что 25ГХ может препятствовать этим ранним изменениям свойств мембраны при БАС, индуцируя стабилизацию липидных рафтов в нервно-мышечных синапсах у мышей с моделью БАС на ранней стадии. Более того, 25ГХ препятствовал накоплению церамида в нервно-мышечном синапсе. Также нами была отмечена способность 25ГХ подавлять такие синаптические изменения в нервно-мышечном синапсе при БАС, как увеличение перекисного окисления липидов, уровня внеклеточного холина и нарушение кластеризации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [2].

Таким образом, 25ГХ разнонаправленно влияет на нервно-мышечную передачу, угнетая рекрутирование синаптических везикул при низких концентрациях и потенцируя мобилизацию везикул при более высоких концентрациях. Помимо этого, выявлено положительное влияние 25ГХ при БАС. В частности, 25ГХ препятствовал проявлению ранних признаков нарушения свойств нервно-мышечного синапса в модели БАС. 25ГХ способен восстанавливать такие синаптические аномалии, как увеличение текучести мембраны, накопление церамида, снижение упорядоченности мембраны и перекисное окисление липидов. К тому же при БАС 25ГХ снижает повышенный уровень внеклеточного холина, который может способствовать фрагментации нервно-мышечных синапсов.

Ключевые слова: синаптическая передача; 25-гидроксихолестерин; скелетная мышца; синаптическая везикула; липидные рафты; нейромедиатор.

Как цитировать:

Закирьянова Г.Ф., Ценцевичский А.Н., Гиниатуллин А.Р., Кузнецова Е.А., Петров А.М. Оксистерол-зависимый путь регуляции синаптической передачи в нервно-мышечном контакте мыши // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 589–592. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623320>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-14-00044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zakyrganova G.F., Tsentsevitsky A.N., Kuznetsova E.A., Petrov A.M. Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism // *Free Radical Biology and Medicine*. 2021. Vol. 174. P. 121–134. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.013
2. Zakyrganova G.F., Giniatullin A.R., Mukhutdinova K.A., et al. Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol // *Life Sciences*. 2021. Vol. 273. P. 119300. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119300
3. Petrov A.M., Kravtsova V.V., Matchkov V.V., et al. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017. Vol. 312, N 5. P. C627–C637. doi: 10.1152/ajpcell.00365.2016
4. Petrov A.M., Shalagina M.N., Protopopov V.A., et al. Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, N 19. P. 4860. doi: 10.3390/ijms20194860
5. Bryndina I.G., Shalagina M.N., Sekunov A.V. Clomipramine counter-acts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse // *Neuroscience Letters*. 2018. Vol. 664. P. 1–6. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.009

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* Г.Ф. Закирьянова; адрес: Российская Федерация, 420111, Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31; e-mail: gffysiology@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623320>

Oxysterol-dependent pathway of regulation of synaptic transmission in the neuromuscular junction of mice

G.F. Zakryjanova^{1,2,*}, A.N. Tsentsevitsky¹, A.R. Giniatullin^{1,2}, E.A. Kuznetsova¹, A.M. Petrov^{1,2}¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation;² Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

ABSTRACT

Cholesterol plays a crucial role in maintaining the stiffness, flexibility, and porosity of the bilipid layer. Moreover, cholesterol has a strong attraction to several membrane proteins, allowing it to modify their function, thereby influencing intracellular processes. Through enzymatic and oxidative reactions, cholesterol produces different types of oxysterols. One of the oxysterols synthesized is 25-hydroxycholesterol (25HC), formed with participation from the cholesterol-25-hydroxylase enzyme predominantly in macrophages, dendritic cells, and microglia.

25HC effectively regulates cholesterol homeostasis within individual cells, ensuring that cholesterol concentration remains at or below nanomolar levels. However, similar to the paracrine agent 25HC, macrophages and microglia produce it at significantly higher concentrations during inflammatory reactions.

Extensive research has focused on the role of 25HC in immune response during inflammation. 25HC appears to exert a variety of effects on the immune response. It promotes the secretion of inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 beta, IL-6, IL-8, CCL5, and macrophage colony-stimulating factor, and inhibits inflammation by blocking inflammasome activity. Increased production of 25HC via Toll-like receptor 4 activation reduces B-cell proliferation. 25HC has the ability to prevent viral penetration by integrating into the membrane and modifying its properties.

Macrophages play a significant role in both adaptive and innate immunity and are found in large numbers in skeletal muscle, suggesting the possible functional importance of 25HC in the interaction between the immune system and skeletal muscles. We discovered a concentration-dependent effect of 25HC on the neuromuscular synapse of mice: high concentrations (1–10 μM) enhance, while low concentrations (0.01–0.1 μM) inhibit the process of neuromuscular transmission [1].

25HC is a ligand for LX-receptors, which we observed to be expressed in the synaptic region of motor neuron axons. The high concentration of 25HC modulates synaptic transmission through an LX-receptor-dependent pathway. Furthermore, 25HC activates LX-receptors that are likely associated with estrogen receptors α , leading to the activation of the Gi-protein/ $\beta\gamma$ -dimer of G-protein/phospholipase C/ Ca^{2+} protein kinase C signaling pathway. The potentiating effect of 25HC, which activates the LX-receptor/estrogen receptor α complex, depends on lipid rafts. This is because both receptors are localized in lipid microdomains, and the destruction of lipid rafts precludes the stimulating effects of 25HC. In addition, the study identified the contribution of reactive oxygen species (ROS) in the 25HC-dependent enhancement of synaptic transmission. Indeed, treatment with 25HC (1 μM) leads to an elevation in both ROS production in the synaptic region and hydrogen peroxide concentration in the extracellular environment. This phenomenon is dependent on an increase in intracellular calcium ions concentration. It is noteworthy that ROS, in this instance, act as signaling molecules since the level of lipid peroxidation is not impacted by 25HC.

Expression of 25HC increases in various neurodegenerative conditions. The concentration of 25HC escalates in amyotrophic lateral sclerosis, marked by progressive muscle atrophy resulting in death. High concentrations of 25HC above 5–30 μM can reduce the survival rate and trigger apoptosis of motor neurons. Nonetheless, low concentrations, 1 μM or lower, have the opposite effect, boosting the neurons' survival rate.

The pivotal role of lipid rafts in ALS pathogenesis is evident. For instance, a decrement in caveolin-1 level in ALS brings about lipid raft disruption, thus accelerating disease progression. Moreover, in SOD1G93A ALS model mice during the pre-onset phase, alterations in membrane properties were observed, including lipid raft destabilization, lipid bilayer ordering, and heightened membrane fluidity [2]. One possible causal factor for this phenomenon could be muscle ceramide increase, which causes raft destabilization during motor unloading [3–5]. In fact, we observed elevated ceramide levels in the membrane of ALS model mice during the pre-onset stage. An increase in extracellular choline levels was detected in ALS, likely the result of heightened non-quantum secretion of the neurotransmitter, potentially due to lipid rafts disruption. Unregulated elevation of acetylcholine in ALS is a significant contributor to motor dysfunction and age-related morphological changes in the neuromuscular junction. An example of such changes would be the disruption of clustering of nicotine acetylcholine receptors in the postsynaptic membrane. Furthermore, disruption of lipid rafts in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) was associated with elevated levels of hydroperoxides in muscle homogenates and lipid peroxidation in ALS model mice. Consequently, it can be inferred that the membrane properties are altered in ALS.

Received: 15.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

Furthermore, it was observed that 25HC can prevent the initial alterations of membrane properties by promoting the stabilization of lipid rafts in neuromuscular synapses in pre-onset ALS mouse models. Additionally, 25HC averted the accumulation of ceramide in the neuromuscular synapse. We observed that 25HC can inhibit synaptic alterations at the neuromuscular synapse in ALS. These alterations include elevated lipid peroxidation, increased extracellular choline levels, and disrupted clustering of nicotinic acetylcholine receptors [2].

Thus, 25HC has a multidirectional impact on neuromuscular transmission, hindering the recruitment of synaptic vesicles at low concentrations and enhancing the mobilization of vesicles at higher concentrations. Furthermore, 25HC exhibited a favorable impact on ALS, as it prevented the early manifestation of differences in the properties of the neuromuscular synapse in the ALS model. 25HC has the ability to relieve synaptic anomalies including increased membrane fluidity, ceramide accumulation, decreased membrane ordering, and lipid peroxidation. Furthermore, it decreases the heightened level of extracellular choline, which could potentially lead to neuromuscular synapse fragmentation in ALS.

Keywords: synaptic transmission; 25-hydroxycholesterol; skeletal muscle; vesicle; lipid rafts; neurotransmitter.

To cite this article:

Zakyrjanova GF, Tsentsevitsky AN, Giniatullin AR, Kuznetsova EA, Petrov AM. Oxysterol-dependent pathway of regulation of synaptic transmission in the neuromuscular junction of mice. *Genes & Cells*. 2023;18(4):589–592. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623320>

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-14-00044.

REFERENCES

1. Zakyrjanova GF, Tsentsevitsky AN, Kuznetsova EA, Petrov AM. Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;174:121–134. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.013
2. Zakyrjanova GF, Giniatullin AR, Mukhutdinova KA, et al. Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol. *Life Sciences*. 2021;273:119300. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119300
3. Petrov AM, Kravtsova VV, Matchkov VV, et al. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017;312(5):C627–C637. doi: 10.1152/ajpcell.00365.2016
4. Petrov AM, Shalagina MN, Protopopov VA, et al. Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(19):4860. doi: 10.3390/ijms20194860
5. Bryndina IG, Shalagina MN, Sekunov AV. Clomipramine counter-acts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse. *Neuroscience Letters*. 2018;664:1–6. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.009

AUTHORS' CONTACT INFO

* G.F. Zakyrjanova; address: 2/31 Lobachevsky street, 420111 Kazan, Russian Federation; e-mail: gffysiology@gmail.com