

СОДЕРЖАНИЕ

Том 37, номер 6, 2020

ОБЗОРЫ

Вклад одновалентных (Na^+ и K^+) и двухвалентных (Ca^{2+}) ионов в механизмы синаптической пластичности

Л. В. Смольянинова, А. А. Шиян, Г. В. Максимов, С. Н. Орлов

403

Влияние *L*-аргинина и доноров оксида азота на индукцию митохондриальной поры ионами кальция и пальмитоилкарнитином. Возможное участие митохондриальной NO/cGMP/PKG сигнальной системы

В. В. Дынник, Е. В. Гришина, Н. И. Федотчева

426

IP₃-рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках HEK-293

*М. Ф. Быстрова, О. А. Рогачевская, Е. Н. Кочкина,
Е. Е. Копылова, Н. П. Коваленко, С. С. Колесников*

434

Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: варибельность ответа

*М. Г. Степанян, А. А. Филькова, А. К. Гарсон Дасгунта,
А. А. Мартьянов, А. Н. Свешникова*

442

Половые различия возрастных изменений экспрессии рианодиновых RyR2 и инозитол-1,4,5-трисфосфатных IP₃R1,2,3 рецепторов и их модуляторов CaM и Ерас в аорте и миокарде крыс

Л. М. Кожевникова, И. Ф. Суханова, Н. П. Семенова, С. А. Крыжановский

453

Липидный профиль корней пшеницы при действии мембранотропных агентов

*Ю. Н. Валитова, В. Р. Хабибрахманова, А. В. Белкина,
А. Г. Ренкова, Ф. В. Минибаева*

466

PERSONALIA

Юлиан Георгиевич Молотковский (к 85-летию со дня рождения)

477

Правила для авторов

478

Contents

Vol. 37, No. 6, 2020

REVIEWS

Contribution of Monovalent (Na^+ and K^+) and Divalent (Ca^{2+}) Ions to the Mechanisms of Synaptic Plasticity

L. V. Smolyaninova, A. A. Shiyani, G. V. Maksimov, S. N. Orlov

403

Impact of *L*-Arginine and Nitric Oxide Donors on the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Calcium Ions and Palmitoylcarnitine. Possible Involvement of Mitochondrial NO/cGMP/PKG Signal System

V. V. Dynnik, E. V. Grishina, N. I. Fedotcheva

426

IP₃ Receptor of Type 2 Is a Dominant Isoform in HEK-293 Cells

*M. F. Bystrova, O. A. Rogachevskaja, E. N. Kochkina,
E. E. Kopylova, N. P. Kovalenko, S. S. Kolesnikov*

434

Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response

*M. G. Stepanyan, A. A. Filkova, A. K. Garzon Dasgupta,
A. A. Martyanov, A. N. Sveshnikova*

442

Sex Differences in Age-Related Changes in the Expression of Ryanodine Receptors RyR2 and Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptors IP₃R1,2,3 and of Their Modulators CaM and Epac in Rat Aorta and Myocardium

L. M. Kozhevnikova, I. F. Sukhanova, N. P. Semenova, S. A. Kryzhanovskii

453

The Lipid Profile of Wheat Roots Treated with Membranotropic Agents

*J. N. Valitova, V. R. Khabibrakhmanova, A. V. Belkina,
A. G. Renkova, F. V. Minibayeva*

466

PERSONALIA

Yulian G. Molotkovsky (to the 85th anniversary)

477

Instructions for authors

478

УДК 577.352

ВКЛАД ОДНОВАЛЕНТНЫХ (Na^+ и K^+) И ДВУХВАЛЕНТНЫХ (Ca^{2+}) ИОНОВ В МЕХАНИЗМЫ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

© 2020 г. Л. В. Смольянинова^а, *, А. А. Шиян^а, Г. В. Максимов^а, С. Н. Орлов^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119992 Россия

*e-mail: smolyaninova.larisal@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 14.07.2020 г.

В обзоре представлены механизмы участия ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) в процессах синаптической пластичности в постсинаптическом нейроне при длительной потенциации и длительной депрессии. Предполагается, что основными участниками являются AMPA- и NMDA-рецепторы, потенциал-зависимые Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -каналы, Ca^{2+} - и Na^+ -активируемые K^+ -каналы, АТР-чувствительные K^+ -каналы, Ca^{2+} -каналы эндоплазматического ретикулума. В обзоре приводится их молекулярная характеристика и обсуждается роль при длительной потенциации и длительной депрессии. Впервые рассматривается значение изменения внутриклеточного соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ и Ca^{2+} -зависимый механизм от формирования сигнала до уровня экспрессии генов. Мы считаем, что необходимы дополнительные исследования для идентификации подмножества нейрональных генов, дифференциальная экспрессия которых способствует синаптической пластичности, реализуемой с участием $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительного, Ca^{2+} -независимого механизма сопряжения “возбуждение–транскрипция”.

Ключевые слова: натрий, калий, кальций, синаптическая пластичность, длительная потенциация и депрессия, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0233475520060067

ВВЕДЕНИЕ

Синаптическую пластичность можно определить как способность к изменению силы взаимодействия между пре- и постсинаптическими нейронами, которая усиливается или ослабевает в течение времени в ответ на изменение их активности. Стимуляция синапсов, вызванная изменением мембранного потенциала (МП), нейромед-

диаторами, модуляторами, цитокинами влечет за собой клеточный ответ как в пресинаптическом, так и постсинаптическом нейронах [1, 2]. Изменение состояния синапсов может осуществляться на короткие, средние и долгие периоды (кратковременная, среднесрочная и длительная пластичность). Кратковременная пластичность длится секунды и осуществляется с помощью посттрансляционной модификации белков [3–6], среднесрочная пластичность происходит при участии новосинтезированных белков и длится от минут до нескольких часов, а длительная пластичность занимает часы и больше и требует экспрессии генов [7]. Длительная пластичность может выражаться в длительной депрессии (long-term depression, LTD) или в длительной потенциации (long-term potentiation, LTP) синапсов (рис. 1а, [8]) [9]. Эффект LTP был впервые открыт Тимоти Блиссом и Тери Ломом в 1973 году и позволил прояснить механизмы длительной пластичности (рис. 1б). Показано, что LTP инициируется входом Ca^{2+} в постсинаптический нейрон в ответ на сильную синаптическую активность [10–12]. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) приводит к синапс-специфиче-

Список сокращений: МП – мембранный потенциал, НСА – начальные сегменты аксона, ПД – потенциал действия, ПП – потенциал покоя, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, AMPAR – AMPA-рецепторы, APV – аминокислотная валириновая кислота, СаМ – кальмодулин, Са_v – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, CIRC – индуцируемый кальцием кальциевый выброс, CP-AMPA – Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы, CNQX – цианхиноксалин, ETC – сопряжение “возбуждение–транскрипция”, IEG – гены раннего ответа, InsP3R – инозитол-3-фосфатные рецепторы, LTD – длительная депрессия, LTP – длительная потенциация, $\text{K}_{\text{АТР}}$ – АТР-чувствительные K^+ -каналы, $\text{K}_{\text{Са}}$ – Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, K_{Na} – Na^+ -активируемые K^+ -каналы, K_v – потенциал-зависимые K^+ -каналы, Na_v – потенциал-зависимые Na^+ -каналы, NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, NMDAR – NMDA-рецепторы, РМСА – Ca^{2+} -АТР-аза плазматической мембраны, RyR – рианодинные рецепторы, SERCA – Ca^{2+} -АТР-аза эндоплазматического ретикулума.

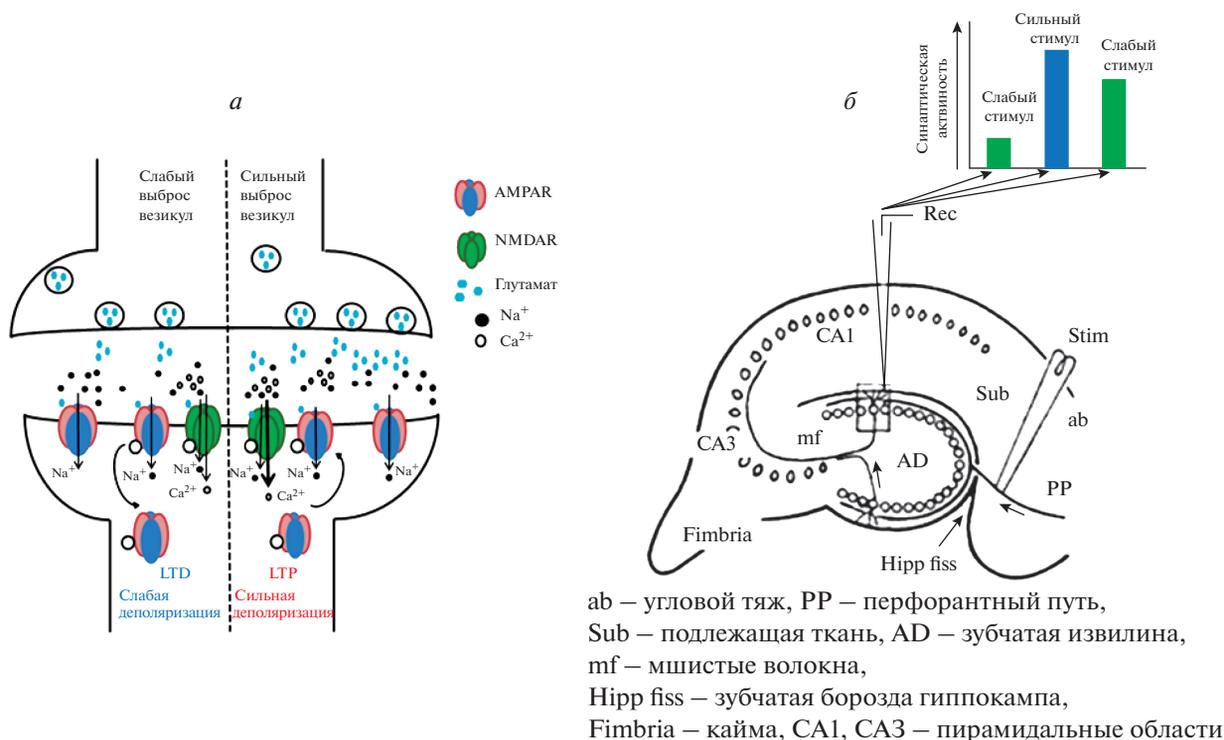


Рис. 1. а – Длительная депрессия (LTD) и длительная потенция (LTP) в постсинаптическом нейроне. Слабая активация пресинаптического нейрона приводит к слабой деполяризации постсинаптического нейрона и входу кальция через NMDA-рецепторы. Это приводит к активации фосфатаз и дефосфорилированию AMPA-рецепторов, что вызывает их эндоцитоз. Сильная активация вызывает сильную деполяризацию, что приводит к фосфорилированию AMPA-рецепторов и их экзоцитозу. б – Схема синаптического пути в экспериментах Блисса и Ломо при открытии LTP [8]. Stim – стимулирующий электрод; Rec – записывающий электрод. Впервые была использована предварительная слабая стимуляция перфорантного пути перед сильной стимуляцией и измерена синаптическая активность в зубчатой извилине. Повторная слабая стимуляция, по сравнению с первой слабой стимуляцией вызывала усиление синаптической активности, получившей название длительная потенция (LTP).

ским изменениям, включающим вставку и удаление субъединиц глутаматных рецепторов из плазматической мембраны, изменению функции синаптических белков за счет пост-трансляционной модификации, стимуляции трансляции или деградации белков, а также инициирует сигнальные каскады, приводящие к активации генной экспрессии [13–15]. Несмотря на то, что Ca²⁺ играет ключевую роль во внутриклеточной передаче сигнала при LTP и LTD, показано, что увеличению [Ca²⁺]_i предшествует изменение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i. Известно, что для генерации потенциала действия (ПД) и проведения серии ПД различной частоты ключевую роль играют потенциал-образующие ионы Na⁺ и K⁺. Установлено, что в ряде клеток изменение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i может влиять на экспрессию генов Ca²⁺-независимым путем [16, 17]. В связи с этим в данном обзоре представлен анализ участия потенциал- и лиганд-зависимых каналов, транспортеров и АТФ-аз в формировании комплексного ответа нейронов при LTP и LTD. В обзоре представлены общие характеристики ионных кана-

лов, транспортеров и АТФ-аз в нейронах мозга, механизмы участия одно- и двухвалентных ионов в синаптической пластичности и описана роль изменения соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i в экспрессии генов.

1. ВАЖНЕЙШИЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ И ТРАНСПОРТЕРЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ТРАНСПОРТ ИОНОВ (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) ПРИ LTP И LTD В НЕЙРОНАХ

AMPA-рецепторы

Установлено, что глутаматные ионотропные AMPA-рецепторы (AMPA) участвуют в индукции и формировании LTP и LTD. (рис. 2). Пирамидальные нейроны коры и гиппокамп содержат порядка 10000 синапсов, и в каждом синапсе AMPAR независимо регулируют синаптическую активность. Известно 4 гена (*GR11–GR14*), кодирующие субъединицы AMPAR. Молекула рецептора представляет собой гомо- или гетеромерные комплексы субъединиц GluA1–GluA4. Субъединицы состоят из доменов – АТД (участвует в

сборке, доставке рецепторов), LBD (связывает агонисты/антагонисты и активирует воротный механизм), TMD (формирует ионный канал) и STD (регулирует, локализует рецепторы) [18]. В состав комплекса обычно включена GluA2 субъединица, которая выполняет важную роль в процессе селективного и потенциал-зависимого транспорта ионов через канал AMPAR. После транскрипции эта субъединица подвергается редактированию РНК, в результате чего участок РНК, кодирующий кодон для аминокислотного остатка глутамин, локализованного в области поры канала, заменяется на РНК кодон, кодирующий аминокислотный остаток аргинина. Наличие аминокислотного остатка аргинина в области поры канала ограничивает токи ионов Na^+ (внутри) и K^+ (наружу) и блокирует вход двухвалентных ионов в клетку. Известно, что входящий ток через AMPAR осуществляется при отрицательных величинах, а выходящий ток – при положительном МП. Установлено, что при отрицательном МП входящий ток обусловлен Na^+ ($E_{\text{m}} \sim E_{\text{K}} \ll E_{\text{Na}}$), в то время как при высокоамплитудной деполяризации нейронов через AMPAR выходит K^+ ($E_{\text{am}} \sim E_{\text{Na}} \gg E_{\text{K}}$) [19]. По сравнению с одновалентными катионами, у AMPAR многих нейронов выявлена низкая Ca^{2+} -проницаемость, $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 3$ в культивируемых эмбриональных клетках мозжечка мышей [20]. Известно, что в головном мозге существуют AMPAR не имеющие в составе комплексов GluA2 субъединицу. В поре канала таких AMPAR вместо аминокислотного остатка аргинина локализован аминокислотный остаток глутамин, что увеличивает проницаемость для Na^+ и даже для Ca^{2+} [21]. Эти каналы получили название Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы (CP-AMPA). Доказано, что у рецепторов с GluA2, вольт-амперная характеристика линейна, а у рецепторов без субъединицы GluA2 нелинейна: при положительных значениях МП CP-AMPA с большей эффективностью переносят ионы в клетку, чем из клетки [21–23]. Интересно, что на ранних стадиях эмбрионального развития нейроны больше экспрессируют CP-AMPA, в то время как Ca^{2+} -непроницаемые AMPAR преобладают в зрелом мозге [24]. Liu и Cull-Candy установили, что повторяемая высокочастотная электростимуляция нервных клеток вызывает быстрое снижение проницаемости Ca^{2+} через CP-AMPA за счет активации AMPAR [25].

NMDA-рецепторы

Известно, что активность глутаматных ионотропных NMDA-рецепторов (NMDAR) важна для осуществления синаптической пластичности при LTP и LTD (рис. 3). Установлено, что NMDAR важны на стадии индукции LTP и LTD. NMDAR

представляют собой гетеротетрамерные комплексы субъединиц GluN1, GluN2A-D и GluN3A-B. Обычно комплексы состоят из пар GluN1 (1 из 8 видов) и GluN2 (1 из 4 подтипов, A–D) субъединиц, связывающих глицин или D-серин и глутамат, соответственно. Субъединицы NMDAR включают несколько доменов – ATD (контролирует вероятность открытия ионного канала и скорость деактивации ионного канала, а также содержит участки для связывания аллостерических модуляторов [26–28]), LBD (связывает агонисты/антагонисты, контролирующие активацию ионного канала), TMD (формирует ионный канал), STD (связывает постсинаптические белки, что обеспечивает передачу внутриклеточных сигналов) и NTD [29]. NMDAR обладают высокой селективностью к катионам и низкой к анионам. Проводимость NMDAR, как и у AMPAR, зависит от их состава. Проницаемость для Ca^{2+} и Na^+ составляет $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 8–10$ [30]. Вольт-амперные характеристики NMDAR более сложные, чем у AMPAR: при отрицательном МП, близком к потенциалу покоя (ПП), ионы Mg^{2+} входят в пору NMDAR, блокируя прохождение всех других ионов. При деполяризации мембраны и увеличении положительного заряда на цитоплазматической поверхности мембраны Mg^{2+} выталкивается из поры, позволяя Na^+ и Ca^{2+} проникать в клетку. При положительном МП NMDAR характеризуется максимальной проницаемостью: в клетку входит Na^+ и Ca^{2+} , а выходит K^+ . NMDAR имеют значительно более медленную кинетику изменений мембранного тока, чем AMPAR. В синапсах после экзоцитоза глутамата NMDAR активируются медленнее, а максимальная проводимость наблюдается значительно позже, чем для AMPAR. NMDAR могут оставаться в активном состоянии в течение сотен миллисекунд, а AMPAR – в течение всего нескольких миллисекунд. Важно отметить, что NMDAR активируются только при деполяризации мембраны, обусловленной активацией Na^+ -каналов, AMPAR или/и потенциал-зависимых Na^+ -каналов, и при условии, что Mg^{2+} не блокирует прохождение ионов через канал NMDAR.

Потенциал-зависимые Na^+ -каналы

Потенциал-зависимые Na^+ -каналы (Na_v) формируют входящий Na^+ -ток, который участвует в генерации и проведении ПД в нейронах (рис. 2) [31]. Известно, что Na_v являются гетеромерами, которые состоят из потенциал-чувствительной α -субъединицы (~ 260 кДа), ассоциированной с одной или несколькими регуляторными β -субъединицами (~ 35 кДа), кодируемые *SCN1A–SCN1A* и *SCN1B–SCN4B* генами, соответственно. Известно, что α -субъединица образует пору канала, β -субъединица контролирует активность канала

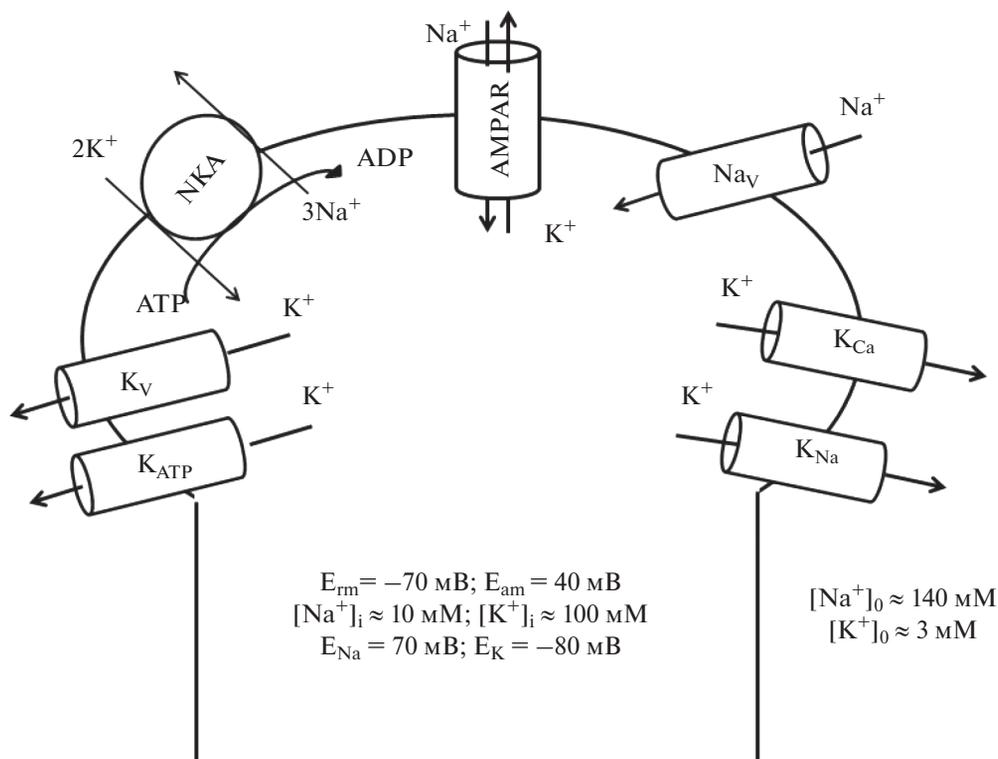


Рис. 2. Ионные каналы и транспортеры, вовлеченные в регуляцию внутриклеточной концентрации одновалентных ионов в постсинаптическом нейроне. NKA – Na^+, K^+ -АТФ-аза; AMPAR – глутаматные ионотропные AMPA-рецепторы, проницаемые для одновалентных катионов; Na_v и K_v – потенциал-зависимые Na^+ - и K^+ -каналы; K_{Ca} – Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы; K_{Na} – Na^+ -активируемые K^+ -каналы; K_{ATP} – АТФ-зависимые K^+ -каналы; E_{rm} и E_{am} – потенциал покоя и потенциал действия соответственно; E_{Na} и E_K – равновесный потенциал Нернста для Na^+ и K^+ соответственно.

и его потенциал-зависимые характеристики. Каждая α -субъединица состоит из гомологичных доменов, включающих шесть трансмембранных сегментов (S1–S6), из которых S1–S4 формируют сенсор потенциала, а S5 и S6 и их связующая P-петля формируют пору канала. Сегмент S4 содержит высокую концентрацию положительных зарядов (за счет аминокислотного остатка аргинина) и функционирует как сенсор потенциала, ответственный за активацию канала. Сегмент S6 формирует внутреннюю поверхность поры, а P-петля формирует узкий ион-селективный фильтр, который контролирует ионную селективность канала и его проницаемость с внеклеточной стороны поры [32–34]. В клетках млекопитающих выявлено 10 изоформ α -субъединицы Na_v ($Na_v1.1$ – $Na_v1.9$ и $Na_v\chi$), из которых только 7 экспрессируются в нервной системе. В ЦНС взрослых животных преимущественно экспрессируются $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ и $Na_v1.6$ [35]. Известно, что Na_v образуют кластеры высокой плотности в начальных сегментах аксона (НСА) и перехватах Ранвье, $Na_v1.1$ локализованы в проксимальной, а $Na_v1.6$ в дистальной частях НСА [36–38]. Экспрессия Na_v

изменяется в зависимости от стадии развития, показано, что $Nav1.2$ в НСА со временем заменяется на $Nav1.6$ [39]. Было обнаружено, что спайки в дистальных апикальных дендритах, происходящие при участии Na_v -каналов, необходимы для формирования ЛТР в пирамидальных нейронах гиппокампа [40].

Потенциал-зависимые K^+ -каналы

Потенциал-зависимые K^+ -каналы (K_v) формируют выходящие K^+ -токи, которые участвуют в реполяризации мембраны и восстановлении ее потенциала до уровня ПП после деполяризации, вызванной ПД (рис. 2). Известно, что K_v -каналы – тетрамеры, состоящие из четырех α -субъединиц, формирующих ионную пору. Каждая α -субъединица состоит из шести α -спиральных трансмембранных сегментов (S1–S6), P-петли, повторно входящей в мембрану между S5 и S6 сегментами, и цитоплазматическими N- и C-концами белка. Сегменты S1–S4 контролируют открывание и закрывание каналов, а S4 функционирует как сенсор потенциала. При изменении мембранного

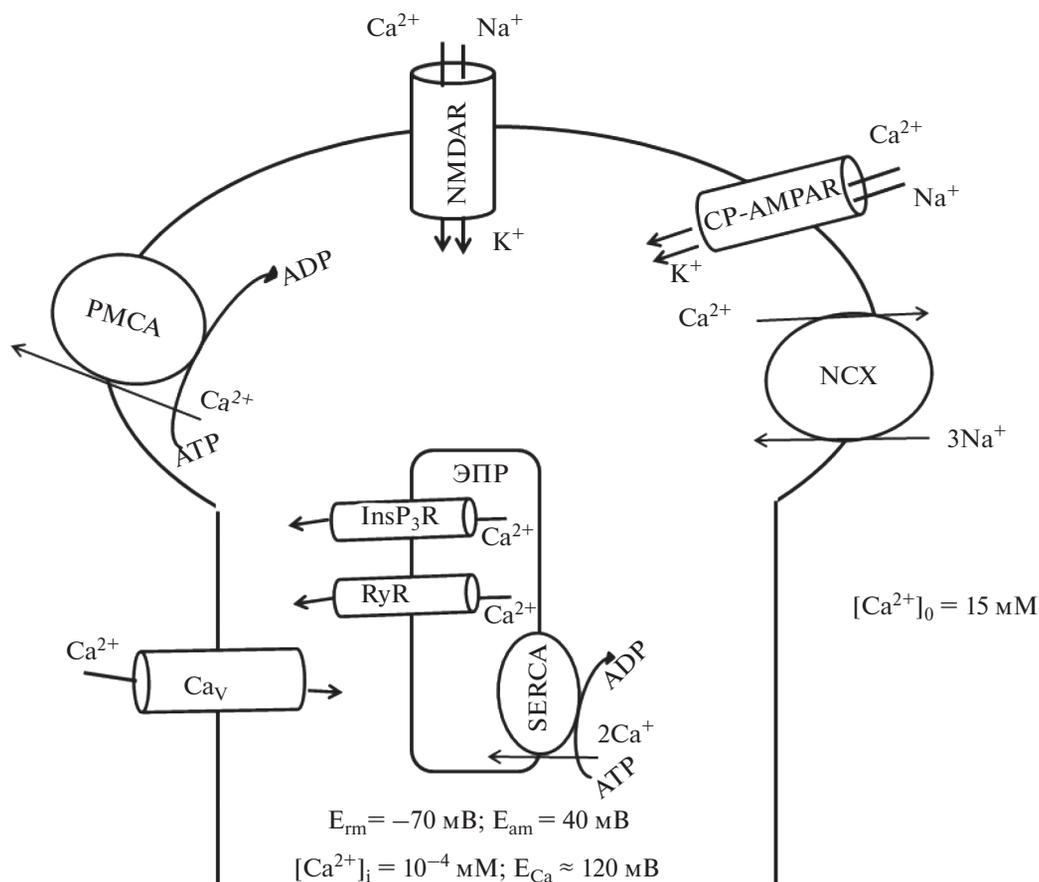


Рис. 3. Ионные каналы и транспортеры, вовлеченные в регуляцию внутриклеточной концентрации кальция в постсинаптическом нейроне. NMDAR – глутаматные ионотропные NMDA-рецепторы, проницаемые для одно- и двухвалентных катионов; CP-AMPA – Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы; Ca_V – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы; NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; PMCA – Ca^{2+} -ATP-аза плазматической мембраны; SERCA – Ca^{2+} -ATP-аза эндоплазматического ретикулума; RyR и InsP₃R – Ca^{2+} -проницаемые риадиноновые и инозитол-3-фосфатные рецепторы соответственно; E_{m} и E_{am} – потенциал покоя и потенциал действия соответственно; E_{Ca} – равновесный потенциал Нернста для Ca^{2+} .

потенциала происходит конформационная перестройка в области S4 сегмента, вызывающая активацию канала [41]. У млекопитающих выявлено 12 подсемейств K_V -каналов (K_V1 – K_V12), у которых полумаксимальная активация и инактивация происходят при величинах мембранного потенциала от -30 до $+20$ мВ и от -25 до -90 мВ. Известно, что K_V нейронов человека кодируют 40 генов, обеспечивая разнообразие формирования возбудимости (ритмического ответа) нейронов. Например, $\text{K}_V1.4$ и K_V4s активируются при низком потенциале, а $\text{K}_V3.4$ – при высоком потенциале [42]. K_V обнаружены в дендритных шипиках, НСА, соме нейронов, перехватах Ранвье и пресинаптических терминалях. В нейронах гиппокампа и стриатуме в СА1 регионе обнаружена высокая экспрессия дополнительной субъединицы $\text{K}_V\beta1$. Показано, что у животных с нокаутом по гену *Kvb1* синаптическая пластичность сохраняется,

но обнаруживаются нарушения при выполнении некоторых тестов по исследованию памяти [43].

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы

В настоящее время в нейрональных клетках выявлены три подтипа потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (VDCC или Ca_V): L-тип ($\text{Ca}_V1.1$ – 1.4), T-тип ($\text{Ca}_V3.1$ – 3.3) и N-тип ($\text{Ca}_V2.1$ – 2.3) (рис. 3). Каналы T-типа получили свое название в связи с малой амплитудой проводимости и ее быстрой инактивацией, тогда как каналы L-типа характеризуются высокой амплитудой проводимости (5 – 9 пСм) и медленной кинетикой инактивации. Эти каналы блокируются производными 1,4-дигидропиридина. Каналы N-типа впервые были обнаружены в нейрональных клетках и нечувствительны к производным 1,4-дигидропиридина. Каналы N-типа разделяют на подтипы по их чувствительности к пептидным токсинам, выде-

ленным из беспозвоночных. Каналы N-типа чувствительны к ω -конотоксину GVIA, P/Q-типа чувствительны к ω -Ага токсину IVA, R-типа нечувствительны к этим токсинам. Каналы Ca_v являются олигомерами и состоят из $\alpha 1$ -субъединицы, образующую пору, через которую Ca^{2+} проходит в клетку, внутриклеточной β -субъединицы, трансмембранной γ -субъединицы и $\alpha 2\delta$ -комплекса, образованного за счет дисульфидной связи внеклеточной $\alpha 2$ -субъединицы и трансмембранной δ -субъединицы. Обнаружено 10 генов для $\alpha 1$ -субъединиц, четыре гена для β -субъединиц, четыре гена для $\alpha 2\delta$ -комплекса и восемь генов для γ -субъединицы [44]. $\alpha 1$ -Субъединица состоит из четырех гомологичных доменов, включающих шесть α -спиральных трансмембранных сегментов (S1–S6), из которых S1–S4 являются сенсором потенциала, а S5–S6 образуют пору. Внутриклеточные петли связывающие домены регулируются Ca^{2+} и Ca^{2+} -связывающими белками. Активация Ca_v T-типа происходит при положительных значениях МП (до -70 мВ), для L-типа и N-типа при положительных значениях МП (до -20 мВ). Известно, что изменения трансмембранного потенциала, а также вход Ca^{2+} в клетку переводит Ca_v L-типа, N-типа, P/Q-типа в инактивированное состояние [45]. В нейронах Ca_v L-типа обеспечивают до $\sim 80\%$ транспорта ионов, опосредованных Ca_v . Многочисленные исследования показали, что наряду со входом Ca^{2+} в клетку Ca_v L-типа служат в качестве сенсоров напряжения, которые могут вызывать изменения МП для регуляции внутриклеточных процессов, включая выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Среди четырех изоформ Ca_v L-типа ($Ca_v 1.1$ – 1.4) в возбудимых нейронах экспрессируются $Ca_v 1.2$ и $Ca_v 1.3$ [46]. Эти каналы участвуют в Ca^{2+} -зависимых процессах, вовлеченных в контроль экспрессии генов, а также процесс сопряжения “возбуждение–транскрипция” [47]. Известно, что $Ca_v 1.2$ и $Ca_v 1.3$ в постсинаптическом нейроне обнаруживаются в дендритных шипиках и some нейронах [48, 49]. Показано, что преимущественно $Ca_v 1.2$, а не $Ca_v 1.3$ участвуют в LTP и в процессе формирования пространственной памяти генетически модифицированных мышей [50–53].

Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы

В нейронах обнаружены три типа Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов (K_{Ca}): каналы с высокой проводимостью (BK-каналы, $K_{Ca 1.1}$), низкой проводимостью (SK-каналы, $K_{Ca 2.1}$ – 2.3) и средней проводимостью (IK-каналы, $K_{Ca 3.1}$) (рис. 2). BK-каналы активируются при деполяризации мембраны и (или) изменении $[Ca^{2+}]_i$, их проводи-

мость составляет 200–400 пСм. При увеличении $[Ca^{2+}]_i$ через BK-каналы K^+ выходит из клетки, что приводит к быстрой реполяризации мембраны, которая блокирует вход Ca^{2+} через Ca_v . Известно, что BK-каналы могут быть открыты в отсутствие Ca^{2+} , что указывает на то, что влияние Ca^{2+} и деполяризации на вероятность открытия каналов являются практически независимыми процессами, и их действие на BK кооперативно [54]. Полумаксимальная эффективная концентрация Ca^{2+} , необходимая для активации BK-каналов, при 30 мВ составляет >10 мкМ [55], что значительно выше, чем $[Ca^{2+}]_i$ в покое и при возбуждении. Установлено, что BK-каналы образуют макромолекулярный комплекс с $Ca_v 1.2$, $Ca_v 2.1$ и $Ca_v 2.2$ и активируются Ca^{2+} , проникающим через эти каналы [56, 57]. Инактивация BK-каналов, локализованных в пресинаптических терминалах, приводит к продолжительному выбросу нейротрансмиттера в синаптическую щель [58]. В постсинаптическом нейроне возможны межбелковые взаимодействия между BK-каналами и NMDAR [59]. BK-каналы представляют собой гомотетрамеры, состоящие из четырех идентичных α -субъединиц (BK α , кодируемая *KCNMA1*), образующих пору, либо α -субъединица образует комплекс с регуляторными β - или γ -субъединицами [60]. BK-каналы могут быть расположены не только в плазматической мембране, но и в ядерной оболочке, что, вероятно, свидетельствует об их прямом влиянии на транскрипцию генов [61]. Установлено, что активность BK-каналов снижается при LTP [62]. В отличие от BK-каналов, активация SK- и IK-каналов зависит только от $[Ca^{2+}]_i$. SK- и IK-каналы обладают большой аффинностью к Ca^{2+} $EC_{50} \sim 0.3$ – 0.5 мкМ [63]. Проводимость SK-каналов составляет ~ 10 пСм [64, 65], а для IK-каналов 33–42 пСм [66, 67] при эквивалентной концентрации K^+ (свыше 100 мМ) по обе стороны мембраны. SK- и IK-каналы структурно сходны с K_v . В структуре SK- и IK-каналов в C-концевой области присутствует кальмодулин-связывающий домен, с которым постоянно связан кальмодулин (CaM). Кальций, связываясь в CaM, вызывает конформационные перестройки в структуре SK- и IK-каналов и открывает K^+ -проницаемую пору [68]. Активация данных каналов влияет на процесс генерации ПД, а также на пороговую величину для ритмического возбуждения. В CA1 нейронах гиппокампа SK- и IK-каналы участвуют в следовой гиперполяризации и влияют на возбудимость нейронов [69]. Выход K^+ после активации данных каналов способен снижать постсинаптический потенциал [70]. Для SK-каналов была обнаружена функциональная связь с Ca_v L-типа и NMDAR в CA1 нейронах гиппокампа [71, 72]. Реполяризация постсинап-

тической мембраны способствует Mg^{2+} -зависимому блоку NMDAR, что ограничивает вход Ca^{2+} в клетку. Таким образом, SK-каналы могут являться компонентом/элементом отрицательной обратной связи для ослабления синаптической передачи [72]. Установлено, что блокирование SK-каналов приводит к усилению LTP в гиппокампе, а повышенная экспрессия SK-каналов снижает пространственную память и условно-рефлекторное замирание [73]. Роль IK-каналов в LTP/LTD пока не установлена.

Na^+ -активируемые K^+ -каналы

Na^+ -активируемые K^+ -каналы (K_{Na}) характеризуются высокой проводимостью и активируются при связывании Na^+ в области цитоплазматических доменов канала (рис. 2) [74]. Впервые их обнаружили в кардиомиоцитах и отнесли к новому типу BK-каналов, для активации которых требовалось не менее 20 мМ Na^+ , но не требовался Ca^{2+} или АТР [75]. Важно, что для активации K_{Na} необходима внутриклеточная концентрация Na^+ ($[\text{Na}]_i$), значительно превышающая ту, которая обычно имеется в цитоплазме. Предполагается, что K_{Na} играют важную роль в регуляции возбуждения в нейронах и активируются в условиях существенного повышения $[\text{Na}]_i$ при гипоксии и ишемии [76–78]. Отметим, что в норме у некоторых нейронов K_{Na} обеспечивают выход K^+ в зависимости от входа Na^+ , но не от $[\text{Na}^+]_i$ [79]. K_{Na} обнаружены во всех нейронах мозга и кодируются генами *Slack* (*Slo2.2*, *KCNT1*) и *Slick* (*Slo2.1*, *KCNT2*). Термин *Slack* происходит от названия “sequence like A calcium-activated K channel”, поскольку часть сегментов поры и последующий S6 сегмент идентичны на 7% каналу BK (*Slo 1*). Полу-максимальная активация канала (проводимость ~180 пСм) осуществляется при ~40 мМ $[\text{Na}^+]_i$. Активность *Slack*-канала может зависеть от протеинкиназ С и А, а также от эндогенных модуляторов (NAD^+ , эстрадиол и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат) [80]. Установлено, что *Slack*-каналы непосредственно взаимодействуют с белком FMRP, который регулирует их активность. При отсутствии взаимодействия FMRP со *Slack*-каналами развивается Fragile X синдром, распространенная форма наследственной дисфункции интеллекта и аутизма у человека [81]. Таким образом, в настоящее время постулируется важная роль K_{Na} в синаптической пластичности и интеллектуальной функции.

АТР-чувствительные K^+ -каналы

АТР-чувствительные K^+ -каналы ($\text{K}_{\text{АТР}}$) осуществляют выход K^+ , который ингибируется

внутриклеточной концентрацией АТР, который является лигандом этих каналов. В связи с тем, что $\text{K}_{\text{АТР}}$ регулируются нуклеотидами, считается, что они связывают энергетический статус клетки с электрической активностью плазматической мембраны (рис. 2) [82–84]. Повышение ADP/АТР активирует $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы, что приводит к выходу K^+ из клетки и гиперполяризации, а уменьшение соотношения ADP/АТР наоборот закрывает $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы. Установлено, что проводимость $\text{K}_{\text{АТР}}$ составляет 44 пСм при концентрации K^+ 100 мМ по обе стороны аксолеммы. Отметим, что вероятность активации данного канала возрастает после серии ПД [85]. Таким образом, активация $\text{K}_{\text{АТР}}$ влияет на кинетику развития ПД и процессы восстановления после проведения ритмического возбуждения. $\text{K}_{\text{АТР}}$ формируют гетероктамерные комплексы, состоящие из четырех идентичных Kir6.1- либо Kir6.2-субъединиц, формирующих пору канала, и четырех идентичных SUR-субъединиц (одной из SUR1, SUR2A или SUR2B). Субъединицы Kir состоят из двух трансмембранных регионов, M1 и M2, соединенных внеклеточным регионом, содержащим K^+ селективный мотив (глицин-тирозин-глицин). Регуляторные субъединицы SUR принадлежат к классу ABC-транспортеров и содержат два внутриклеточных домена для связывания АТР и других нуклеотидов. Комбинация разных Kir- и SUR-субъединиц формирует $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы с различной чувствительностью к нуклеотидам. В нейронах экспрессируются обе субъединицы Kir6.1 и Kir6.2, с доминирующей экспрессией Kir6.2. Например, в пирамидальных нейронах гиппокампа обнаружены $\text{K}_{\text{АТР}}$ в такой комбинации субъединиц: SUR1-Kir6.1, SUR1-Kir6.2 и SUR2-Kir6.2 [86]. Установлено, что у мышей с нокаутом только по гену Kir6.2, но не Kir6.1 наблюдаются нарушения пространственной памяти и LTP [87, 88].

Кальциевые каналы ЭПР

Известно, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может быть усилено за счет выхода Ca^{2+} из ЭПР и других органелл (митохондрии, лизосомы). Этот процесс получил название индуцируемый кальцием кальциевый выброс (CICR). При работе Ca^{2+} -АТР-азы ЭПР (SERCA) концентрация Ca^{2+} внутри ЭПР составляет 10^{-3} М [89]. Выход Ca^{2+} из ЭПР происходит при участии двух основных рецепторов — рианодиновых (RyR) и инозитол-3-фосфатных (InsP3R) рецепторов (рис. 3) [90–92].

RyR — внутриклеточные Ca^{2+} -каналы ЭПР, которые контролируют выход Ca^{2+} из ЭПР в цитоплазму. RyR состоят из четырех идентичных протомеров (~565 кДа), которые формируют центральную трансмембранную пору и большой ци-

топлазматический ансамбль, который участвует в образовании открытого и закрытого состояния канала за счет конформационных переходов [93, 94]. Ионный канал RyR обладает высокой проводимостью (100–500 пСм) для одновалентных и двухвалентных ионов ($P_{Ca}/P_K = 6-7$) и быстрой кинетикой активации. RyR регулируются Ca^{2+} , Mg^{2+} , АТФ, СаМ, сАМР, NAADP, протеинкиназами, фосфатазами и активными формами кислорода [95–97]. Изоформы RyR (RyR1–3) экспрессируются в нейронах разных отделов мозга (мозжечок, гиппокамп, обонятельный регион, базальные ганглии, кора больших полушарий), причем доминирует экспрессия RyR2-изоформы. Известно, что RyR включаются в CIRC при входе Ca^{2+} через NMDAR, а также через Ca_v L-типа в пост-синаптических нейронах [98]. Отметим, что формирование LTP снижается при отсутствии выхода Ca^{2+} из ЭПР через RyR [99–101]. В CA1 нейронах гиппокампа при нокауте RyR3-изоформы после сильной тетанической стимуляции (3 серии по 100 Гц, 100 пульсов) инициация LTP не нарушается, но нарушается при слабой стимуляции (100 Гц, 21 пульс), сопровождаемой снижением пространственной памяти в водном тесте Морриса [102].

InsP3R имеют структурную гомологию с RyR (около 40%) и состоят из N-концевого инозитол-3-фосфат-связывающего домена, C-концевого домена, образующего Ca^{2+} -канал, и связывающего домена, содержащего большинство регуляторных сайтов [103]. InsP3R, как и RyR, являются Ca^{2+} -каналами, проницаемыми для одновалентных и двухвалентных ионов ($P_{Ca}/P_K = 4-5$) [104–107]. Активность InsP3R регулируется Ca^{2+} , инозитол-3-фосфатом, протеинкиназами, адениновыми нуклеотидами, рН. Известны три гена, кодирующие изоформы InsP3R1–InsP3R3. Экспрессия изоформ тканеспецифична, в ЦНС экспрессия InsP3R1 изоформы является доминирующей. Важно, что InsP3R также участвуют в инициации LTP, чаще всего при четырех, а не восьми сериях тета-взрыва (100 Гц, 5 пульсов с 200 мс интервалом), что соответствует более слабой стимуляции [100, 101]. У животных с нокаутом InsP3R1 наблюдается усиление индукции LTP, вызванной тетанической стимуляцией (100 Гц, 100 пульсов) [108]. До сих пор остается неясным, при каких условиях выход Ca^{2+} из ЭПР, опосредованный InsP3R, будет тормозить или стимулировать индукцию LTP.

Na^+/Ca^{2+} -обменник

Na^+/Ca^{2+} -обменник (NCX) – низкоаффинный антипортер, осуществляющий перенос трех ионов Na^+ в клетку в обмен на один ион Ca^{2+} из клетки против его градиента (рис. 3). Работа NCX полностью обратима, т.е. движение транспорти-

руемых ионов зависит от электрохимического градиента Na^+ и Ca^{2+} и количества ионов, связанных с NCX. Структура NCX включает трансмембранный домен, образованный α -спиралями, и большую цитоплазматическую петлю [109, 110]. На участке цитоплазматической петли между аминокислотными остатками 371–509 расположен первый Ca^{2+} -связывающий домен (CBD1), обладающий более высокой аффинностью к Ca^{2+} ($K_d = 140-400$ нМ), чем второй Ca^{2+} -связывающий домен (CBD2). CBD2 расположен на участке между аминокислотными остатками 501–650 и связывает до трех ионов Ca^{2+} с аффинностью в 5–50 раз ниже, чем CBD1 [111]. Известно, что цитоплазматические Na^+ и Ca^{2+} могут регулировать активность NCX. Ca^{2+} , связываясь с цитоплазматической петлей, активирует NCX, в то время как Na^+ деактивирует NCX [89]. В нейронах млекопитающих обнаружено три гена из семейства SLC8, кодирующих изоформы NCX1–NCX3 [112, 113]. Для генов *NCX1* и *NCX3* обнаружено 17 и 3 сплайс-синг-вариантов белков, *NCX2* не подвергается альтернативному сплайсингу [114]. Известно, что регуляцию изоформ осуществляют не только внутриклеточные ионы Na^+ и Ca^{2+} , но и ионы H^+ , фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, протеинкиназы [115]. NCX наряду с Ca^{2+} -АТФ-азой плазматической мембраны (PMCA) участвует в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза клеток в условиях повышения $[Ca^{2+}]_i$ при формировании ритмического ответа нейронов, синаптической передаче и везикулярном транспорте. NCX имеет более низкую аффинность к Ca^{2+} ($K_d = 1000$ нМ), чем высокоаффинный PMCA ($K_d = 100$ нМ), но высокую скорость переноса Ca^{2+} (2000–5000 s^{-1} против 30–250 s^{-1}), что позволяет быстрее переносить ионы Ca^{2+} [116]. При высокой концентрации $[Ca^{2+}]_i$ активность PMCA снижается за счет быстрого насыщения Ca^{2+} , и в таких условиях выход Ca^{2+} из клетки осуществляется за счет NCX. В нейронах мышей с дефицитом изоформы NCX2 при деполяризации восстановление $[Ca^{2+}]_i$ происходит медленнее [117]. При нокауте NCX3 в нейронах наблюдается повышенный уровень $[Ca^{2+}]_i$ в покое и задержка в снижении $[Ca^{2+}]_i$ после деполяризации, а также снижение пространственной памяти при обучении в лабиринте Барнс и формирование памяти при анализе контекстно-зависимого состояния страха [118].

Na^+, K^+ -АТФ-аза

В нейронах низкая 5–10 мМ $[Na^+]_i$ и высокая 140 мМ $[K^+]_i$ поддерживается в результате работы Na^+, K^+ -АТФ-азы (рис. 2). Na^+, K^+ -АТФ-аза осуществляет перенос трех ионов Na^+ из клетки в об-

мен на два иона K^+ против их электрохимических градиентов за счет гидролиза АТФ. Na^+, K^+ -АТФ-аза представляет собой олигомер и состоит из каталитической α -субъединицы и регуляторных β - и γ -субъединиц. Гидролиз АТФ приводит к фосфорилированию α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы по аминокислотному остатку Asp369, что сопровождается конформационным переходом E1–E2 белка, связанным с электрогенным транспортом ионов, со скоростью 60–80 циклов фосфорилирования–дефосфорилирования в секунду. β -Субъединица необходима для доставки $\alpha\beta$ -комплекса к плазматической мембране, а γ -субъединица изменяет чувствительность к ионам Na^+ , K^+ и АТФ при ассоциации с $\alpha\beta$ -комплексом [119, 120]. $\alpha 1$ -Субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы обнаружена во всех типах клеток, а другие $\alpha 2$ – $\alpha 4$ -субъединицы экспрессируются тканеспецифично. В отличие от большинства других клеток, пирамидальные и зубчатые нейроны коры больших полушарий и гиппокампа [121, 122], а также гранулярные клетки мозжечка крыс [123, 124] экспрессируют $\alpha 3$ -субъединицу Na^+, K^+ -АТФ-азы. Показано, что $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединицы обладают аффинностью к Na^+ на 2–3 порядка выше, чем $\alpha 3$ -субъединицы [125, 126]. В связи с этим считается, что $\alpha 1$ -субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы играет ключевую роль в поддержании низкого соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в покое, в то время как $\alpha 3$ -субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы вовлечена в снижение избытка $[\text{Na}^+]_i$ при поддерживаемом возбуждении в нейронах [127–129]. Доказано, что $\alpha 3$ -субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы выполняет ключевую роль в развитии пост-тетанической гиперполяризации, таким образом, регулируя генерацию ПД и формирование ритмического ответа отдельной клетки (“краткосрочная память”) [130]. Активность Na^+, K^+ -АТФ-азы уменьшается в нейронах в первые 15 мин после ЛТП и увеличивается спустя 30 мин [131]. Ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азы дигидроубаином ассоциировано с новой формой LTD [132].

Ca^{2+} -АТФ-азы

Ca^{2+} -АТФ-аза плазматической мембраны (PMCA) представляет собой АТФ-зависимый ионный насос, который осуществляет перенос одного иона Ca^{2+} из цитоплазмы клетки за счет гидролиза одной молекулы АТФ (рис. 3). PMCA осуществляет восстановление концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (≈ 100 – 200 нМ) после его повышения при функционировании нейронов. Известно, что транспорт Ca^{2+} связан с поглощением H^+ , но существенно не зависит от концентраций K^+ и Na^+ и МП [133, 134]. Структурно PMCA состоит из одной полипептидной цепи, включающей 10 транс-

мембранных сегментов и двух цитоплазматических петель, образующих четыре домена: А, Р, N и СаМ-связывающий домены [135]. В состоянии покоя нейрона PMCA находится в автоингибиторном состоянии, которое реализуется за счет блокирования АТФ-связывающего сайта на цитоплазматической петле (между 4 и 5 трансмембранными сегментами) С-концевым участком белка, где располагается СаМ-связывающий сайт. При повышении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и связывании с СаМ, С-концевой участок белка экранируется СаМ и открывается сайт для связывания АТФ. Выявлены четыре гена, кодирующих изоформы PMCA1–PMCA4. Распределение изоформ неоднородно в разных тканях: PMCA1 и PMCA4 экспрессируются во всех тканях, PMCA2 и PMCA3 преимущественно в мышцах и нервной системе [136, 137]. В нейронах мозга выявлены все четыре изоформы PMCA [138]. Исследования кинетики активации изоформ PMCA доказали значительные различия в их способности отвечать на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Например, PMCA2 характеризуется максимальной аффинностью к Ca^{2+} и отвечает на увеличение его концентрации даже в отсутствие СаМ [139]. Известно, что изоформы PMCA взаимодействуют с различными регуляторными белками в клетках, что определяет их специфическую роль в регуляции Ca^{2+} в нервной клетке [140]. PMCA взаимодействует с Ca_v L-типа, NMDAR, nNOS и цитохром-*b5*-редуктазой, что обеспечивает регуляцию Ca^{2+} -гомеостаза и сигнализацию [141]. В мозжечке крыс PMCA2 и PMCA3 изоформы обычно располагаются в пост- и пресинаптических терминалах, в соме и дендритах клеток Пуркинье, и, вероятно всего, уровень их экспрессии коррелирует с созреванием нейронов и формированием синапсов [142–144].

Ca^{2+} -АТФ-аза эндоплазматического ретикула (SERCA) представляет собой АТФ-зависимый ионный насос, который осуществляет перенос двух ионов Ca^{2+} из цитоплазмы клетки в ЭПР за счет гидролиза одной молекулы АТФ (рис. 3). Основная роль SERCA – поддержание Ca^{2+} -гомеостаза. Фермент включает три домена (А, N и Р), одну петлю, расположенную в области люмена ЭПР, и 10 трансмембранных α -спиралей (M1–M10). Связывание Ca^{2+} происходит в области А-домена, связывание АТФ – на N-домене, а фосфорилированный интермедиат формируется в области Р-домена. Трансмембранные α -спирали M2, M5, M6 и M8 формируют Ca^{2+} -канал, M4–M6 повышают эффективность переноса Ca^{2+} через мембрану ЭПР. SERCA экспрессируется в виде 12 изоформ, кодируемых тремя генами *SERCA1*–*SERCA3*. Все изоформы SERCA ингибируются тапсигаргином и циклопиазоновой кислотой [145]. Известно, что изоформы SERCA

различаются по сродству к Ca^{2+} , например, SERCA2b имеет в 2 раза большую чувствительность к Ca^{2+} , чем SERCA2a [146]. Белок SERCA2b был обнаружен в большинстве нейронов, главным образом в клетках Пуркиньи и пирамидальных нейронах гиппокампа. Известно, что SERCA вовлечена в механизм переноса Ca^{2+} из цитоплазмы в ЭПР при генерации ПД в постсинаптических дендритных шипиках [147, 148].

2. МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ ОДНОВАЛЕНТНЫХ И ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Установлено, что для индукции LTP в CA1 пирамидальных нейронах гиппокампа требуется повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. При исследовании синаптической пластичности Линч и коллеги обнаружили, что в нейронах гиппокампа крыс внутриклеточный Ca^{2+} -хелатор EGTA блокировал развитие LTP [10]. Как отмечалось выше вход Ca^{2+} в нейроны происходит при участии NMDAR, Ca_v и CP-AMPA. Известно, что действие селективного антагониста NMDAR аминокислоты (APV) до тетанической стимуляции нейронов приводит к блокированию LTP, в то время как после тетанической стимуляции APV не вызывает аналогичного эффекта [149]. Вероятно, NMDAR выполняют важную роль при индукции LTP, а активация AMPAR важна как для индукции, так и для формирования LTP. Действительно, присутствие антагониста AMPAR цианхиноксалина (CNQX), блокировало как индукцию, так и формирование LTP [150, 151]. Установлено также, что ингибитор SERCA и антагонисты InsP3R и RyR приводят к снижению LTP и LTD [150, 152]. Доказано, что за счет высокого электрохимического градиента Ca^{2+} активация Ca^{2+} -каналов и транспортеров приводит к быстрому увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ от ~ 0.1 до 1 мкМ. С помощью фотоактивного Ca^{2+} -буфера, diazo-4, выявлен интервал времени, в течение которого после ритмического раздражения нейрона концентрация Ca^{2+} возрастает и формируется LTP. Известно, что сродство diazo-4 к Ca^{2+} возрастает в 1600 раз при импульсном фотолизе, что позволяет в эксперименте нивелировать повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и доказать, что повышение постсинаптического $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в течение 2–2.5 с после ритмического раздражения нейрона достаточно для индукции LTP, а снижение или увеличение длительности возбуждения приводит к краткосрочной потенциации [153]. При увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ происходит взаимодействие Ca^{2+} с CaM и кальцинефрином, которые, в свою очередь, влияют на сопряжение “возбуждение—транскрипция” (excitation-transcription

coupling, ETC) [16, 154, 155], в том числе экспрессию генов раннего ответа *c-Fos*, *c-Jun* и *Egr1* (immediate early genes, IEG) [14, 156, 157]. Cole и коллеги обнаружили, что в нейронах гиппокампа крыс частота и амплитуда электростимуляции, необходимые для повышения уровня мРНК *Egr1* аналогичны тем, что необходимы для индуцирования LTP в постсинаптическом нейроне. Кроме того, как и при LTP, экспрессия *Egr1* не наблюдалась в присутствии антагонистов NMDAR [158]. В экспериментах Fleischmann и коллеги использовали нейроны мышей с нокаутом *c-Fos* и наблюдали нормальное общее и эмоциональное поведение животных, хотя были выявлены нарушения при выполнении задач пространственного и ассоциативного обучения, зависящих от гиппокампа. Эти эффекты коррелировали со снижением LTP в синапсах CA3—CA1 гиппокампа, свидетельствуя об участии экспрессии IEG в формировании молекулярных механизмов обучения и памяти [159, 160]. Greenberg и коллеги, используя модель (клеточную линию феохромоцитомы PC12), обнаружили, что экспрессия *c-Fos*, вызванная K^+ -деполяризацией клеток, не происходит в присутствии 3 мМ EGTA, что может быть связано с повышением Ca^{2+} или, возможно, с неспецифическим повышением Na^+ и K^+ [161]. В наших экспериментах показано, что добавление EGTA приводило к увеличению проницаемости плазматической мембраны для одновалентных катионов и повышению отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в сосудистых клетках гладких мышц [162, 163].

Важно, что экспрессия генов, запускаемая при возбуждении нейронов, в основном блокируется ингибиторами Ca_v L-типа, нежели антагонистами ионотропных глутаматных рецепторов [47]. Установлено, что LTP сопровождается транслокацией CaM в ядро [164, 165], а введение в клетку кальмидозолия, ингибитора CaM-зависимого сигналинга, блокирует LTP [166]. Отметим, что изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ влияет на транскрипцию за счет следующих процессов:

- 1) повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ способствует перемещению из цитозоля в ядро фактора транскрипции NF- κ B. Этот процесс связан с активацией Ca^{2+} /кальмодулин-чувствительной протеинкиназы (CaMKI, II или III), которая запускает фосфорилирование ингибитора κ B (I κ B) фосфорилированной I κ B-киназой. Фосфорилированный I κ B отсоединяется от NF- κ B, далее NF- κ B перемещается в ядро;

- 2) повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ способствует транспорту из цитозоля в ядро NFAT, в результате дефосфорилирования NFAT кальцинефрином, (Ca^{2+} /кальмодулин)-зависимой фосфатазой [167];

- 3) повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитоплазме и ядре приводит к фосфорилированию CREB Ca^{2+} /каль-

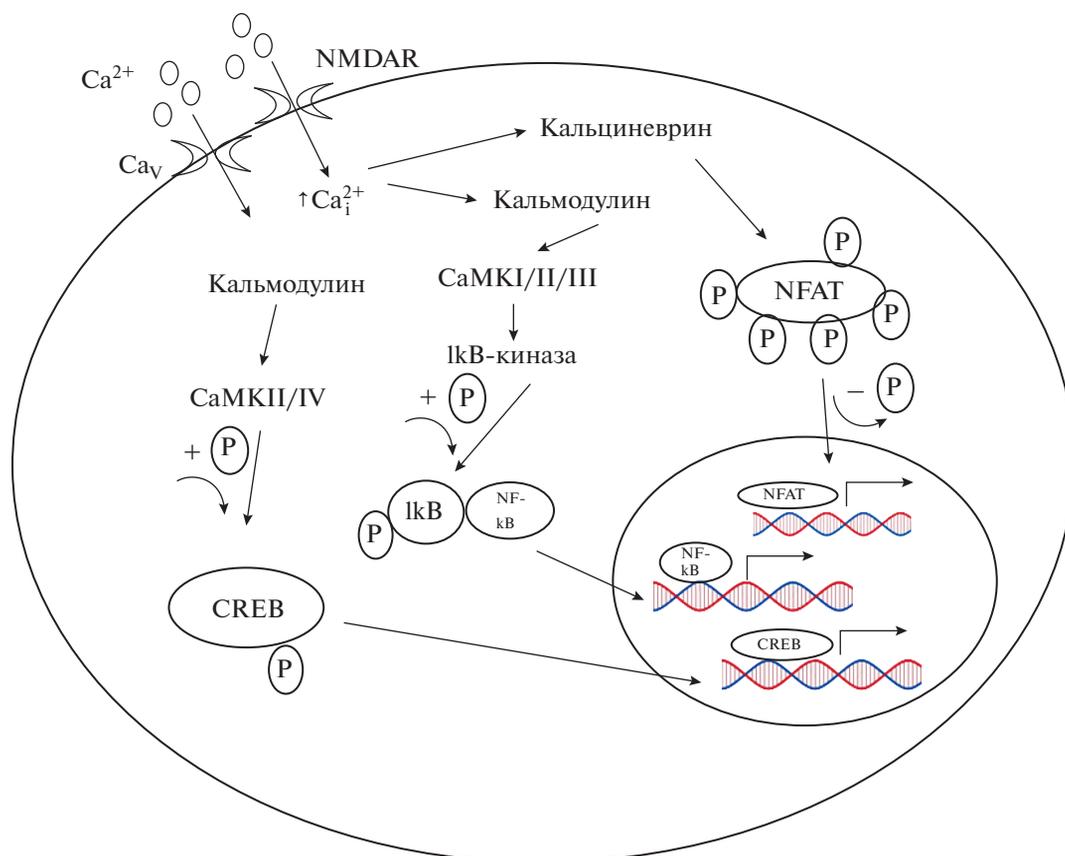


Рис. 4. Механизмы вовлечения кальция в регуляцию транскрипции в нейронах. NMDAR – глутаматные ионотропные NMDA-рецепторы; Ca_v – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы.

модулин-чувствительными протеинкиназами – CaMKII и CaMKIV, соответственно. Фосфорилированный CREB и его коактивирующий белок регулируют транскрипцию за счет связывания с CRE-последовательностями ДНК [14, 168] (рис. 4).

Tsien и коллеги доказали, что фосфорилирование CREB зависит от активации Ca_v при деполяризации мембраны нейрона [16]. Помимо регуляции транскрипции, которая, вероятно, участвует в формировании долгосрочной памяти посредством дифференциальной экспрессии генов, стимулирующей рост дендритов и развитие синапса, Ca^{2+} -зависимые белки влияют на быстрые изменения в синапсах вместе с включением или удалением субъединиц глутаматных рецепторов из плазматической мембраны и изменения функций синаптических белков посредством их посттрансляционных модификаций (фосфорилирование) [14, 24, 169]. Так, на проводимость AMPAR влияют CaMKII и Ca^{2+} -активируемая протеинкиназа A (PKA) [170, 171]. В нейронах гиппокампа мышей CaMKII фосфорилирует GluA1-субъединицу AMPAR по аминокислотному остатку Ser831, что способствует входу Ca^{2+} и Na^+ и при-

водит к временному увеличению концентрации этих ионов. Фосфорилирование PKA GluA1 в положении Ser845 увеличивает вероятность активации GluA1 канала в 1.5 раза [172, 173]. PKA фосфорилирует не только AMPAR, но и NMDAR, регулируя таким образом проницаемость мембраны нейрона для Ca^{2+} [174–176]. В отличие от CaMKII, роль которой важна на стадии индукции LTP, активация протеинкиназы C (PKC) необходима для формирования LTP. Последнее подтверждается экспериментами с применением ингибиторов PKC полимиксина В, Н-7, сфингозина и К-252b [166, 177–180]. Доказано, что ингибирование пептидами или нокаут CaMKII предотвращали поддержание LTP.

В процессе LTP происходит синтез новых AMPAR и доставка их к поверхности плазматической мембраны нейрона. Этот процесс связан с реорганизацией актинового цитоскелета. Многочисленные исследования продемонстрировали, что активация GTP-связывающих белков (Rho GTP-аз), способствующих полимеризации актина, является обязательным элементом как структурной, так и функциональной регуляции LTP [181, 182]. Murakoshi с коллегами показали, что ингибирование

ние NMDAR APV инактивирует Rho GTP-азы (RhoA и Cdc42) и повышает плотность шипиков в CA1 гиппокампа. Ингибитор CaMKII частично блокировал активацию RhoA и Cdc42 в процессе временных и постоянных фаз LTP [183]. Показано, что высокочастотная стимуляция нейронов, используемая для индукции LTP, приводит к активации кальпаинов, деградации спектринов и тем самым к разборке актина и облегчению доставки новых AMPAR к поверхности мембраны [184]. Amini с коллегами показал, что при удалении кальпаина-1 и -2 только из ЦНС происходит снижение ответа LTP на 30–40% [185].

Как отмечалось выше, активация Na⁺-проницаемых AMPAR приводит к деполяризации постсинаптической мембраны, в результате чего происходит удаление Mg²⁺-блока с NMDAR и их активация [13]. Эти данные позволили предположить, что деполяризация представляет собой единственный и достаточный механизм вовлечения потоков Na⁺ в индукцию и пролонгацию синаптической пластичности [182]. Однако, учитывая, что активация AMPAR важна как для индукции LTP, так и для ее развития, можно предположить, что возбуждение нейронов связано с высокой концентрацией Na⁺ или повышением соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i. На рис. 5 представлена кинетика изменений [Na⁺]_i и [Ca²⁺]_i при электростимуляции нейронов гиппокампа [186]. Изменения Ca²⁺ являются быстрыми, в то время как изменения [Na⁺]_i длятся несколько минут. Очевидно, что при активации синаптической передачи транспорт Na⁺ и K⁺ осуществляется не только AMPAR, но и NMDAR, что регулирует [Na⁺]_i/[K⁺]_i. Действительно, на первичных культурах гранулярных клеток мозжечка крыс с применением Na⁺-чувствительного флуоресцентного красителя SBFI было показано, что активация NMDAR повышает [Na⁺]_i от 5 до 60 мМ [187]. В CA1 пирамидальных клетках мышей при электрической стимуляции было обнаружено ~10-кратное повышение [Na⁺]_i в присутствии ингибитора Na_v тетродотоксина и антагониста AMPAR CNQX [188]. На тонких срезах ткани мозжечка мышей с флуоресцентным Na⁺-красителем обнаружено, что при действии глутамата в дендритах нейронов Пуркинье [Na⁺]_i обратимо повышается на 5–10 мМ [91]. Установлено, что длительное возбуждение нейронов сопровождается уменьшением [K⁺]_i/[Na⁺]_i в цереброспинальной жидкости [17, 189–191], что также свидетельствует о том, что наряду с повышением [Ca²⁺]_i возбуждение приводит к изменению трансмембранных градиентов одновалентных катионов и повышению внутриклеточного соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i. Linden с коллегами, используя культуру тканей с моделью

LTD, установили, что при замене экстраклеточного Na⁺ на N-метил-D-глукосамин, а также на Li⁺ или Cs⁺ LTD не возникает. Все это свидетельствует о том, что постсинаптический поток Na⁺ и повышение [Na⁺]_i необходимы для индукции LTD и что LTD запускается не только за счет входа Ca²⁺ [19].

В связи с этим важно отметить, что входу Ca²⁺ в дендриты предшествует генерация Na⁺-зависимых ПД [90]. Callaway и коллеги обнаружили, что при стимуляции нейронов повышение [Na⁺]_i частично блокируется ингибиторами Na_v [192]. Показано, что активация Na_v вератридином меняет процесс индукции LTD [19]. Исследований о связи AMPAR и NMDAR с повышением [Na⁺]_i в нейронах в настоящее время явно не достаточно. В дендритных шипиках Miyazaki и Ross, используя методику одновременной визуализации изменений содержания Na⁺ и Ca²⁺, обнаружили, что в одном дендритном шипике пирамидальных нейронов гиппокампа крыс после электрической стимуляции основное количество Na⁺ входит через AMPAR и малое количество через NMDAR и Na_v [193]. Кроме того, блокирование Ca²⁺-транспорта и Ca²⁺-опосредованного сигналинга приводило к частичному, а не полному подавлению LTP и LTD. Так, Behnisch и Reumann установили, что в CA1 нейронах гиппокампа крыс блокирование SERCA тапсигаргином снижает индукцию LTP только при слабой стимуляции, но не при тетаническом возбуждении [194]. Установлено, что у животных с нокаутом всех изоформ CREB (Ca²⁺-чувствительного интермедиата ETC) не было обнаружено изменений в формировании LTP и LTD в нейронах гиппокампа и выявлено нормальное условно-рефлекторное замирание [195]. Вероятно, это свидетельствует о Ca²⁺-независимом механизме сопряжения “возбуждение—транскрипция”.

Итак, мы считаем, что наряду с Ca²⁺-опосредованной синаптической пластичностью и долгосрочной памятью, связанной с транскриптомными изменениями, в организме может реализовываться Ca²⁺-независимый процесс, опосредованный изменениями внутриклеточной концентрации одновалентных ионов [196].

3. РОЛЬ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ

Известно, что повышение экспрессии IEG, а именно *c-Fos*, происходит спустя 30 мин после индукции LTP в CA1 нейронах гиппокампа [197]. Убаин, вызывающий повышение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i, также приводит к резко повышенной

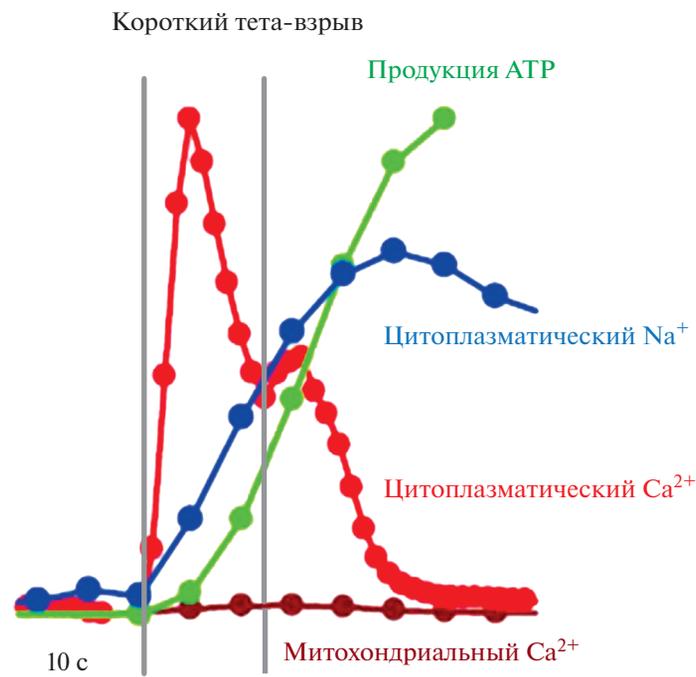


Рис. 5. Изменения внутриклеточной концентрации Na^+ и Ca^{2+} в нейронах гиппокампа при действии электрической стимуляции [186].

экспрессии IEG *c-Fos* и *c-Jun* в клетках VSMC и HeLa [198, 199]. Увеличение *c-Fos* обнаруживается через 30 мин, когда $[\text{Na}^+]_i$ увеличена в ~ 5 раз, а $[\text{K}^+]_i$ снижена на 10–15%. Установлено, что повышение экспрессии *c-Fos*, вызванной убаином, сохраняется в среде, свободной от Ca^{2+} , и в присутствии внеклеточных (EGTA) и внутриклеточных (BAPTA) Ca^{2+} -хелаторов. Очевидно, что увеличение $[\text{Na}^+]_i$, а не снижение $[\text{K}^+]_i$ генерирует сигнал, который приводит к экспрессии *c-Fos* в данных типах клеток. Вероятно, что изменение экспрессии *c-Fos* вызвано повышением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [200]. Убаин и бескальциевая среда, вызывающие повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, изменяли экспрессию 80 одинаковых $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов независимо от присутствия Ca^{2+} -хелаторов в трех типах клеток HUVEC, HeLa, RVSMC [196]. Почти половина $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов были генами раннего ответа, участвующими в регуляции транскрипции, среди которых также были обнаружены *Fos*, *Jun*, увеличение экспрессии которых является маркером долговременной памяти.

В нейронах мозжечка установлено, что убаин, увеличивающий соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, приводит к повышению экспрессии таких регуляторов транскрипции, как *Fosb*, *Junb*, а также *Ptgs2*, *Rgs2*, *Rnd3*, *Vgf* [201], для которых показано участие в синаптической пластичности. Известно,

что при активации NMDAR происходит выброс арахидоновой кислоты из культивируемых нейронов [150]. PTGS (простагландин-эндопероксидаза или циклооксигеназа, COX) — это фермент, лимитирующий скорость превращения арахидоновой кислоты в простагландины. У млекопитающих были идентифицированы два изофермента COX: COX-1 и COX-2, участвующие в заживлении ран и воспалительной реакции. COX-2 обнаруживается в дискретных популяциях нейронов и в большом количестве в коре, гиппокампе, в областях мозга, играющих ключевую роль в обучении и хранении памяти [202, 203]. Известно, что COX-2 участвует в синаптической передаче. Yamagata с коллегами показали, что COX-2 локализован в дендритных шипиках нейронов и его экспрессия вызывается NMDAR при высокочастотной стимуляции нейронов, связанной с индукцией LTP [203]. Показано, что предварительная обработка селективным ингибитором COX-2 NS398 значительно уменьшала LTP в перфорантном пути в срезах гиппокампа [204]. Участие COX-2 в синаптической пластичности гиппокампа было подтверждено исследованиями, демонстрирующими, что ингибирование COX-2 подавляет как LTP, так и LTD и экспериментами *in vivo*, в которых введение ингибиторов COX-2 препятствует запоминанию и консолидации памяти. Воздействие COX-2 проявляется в усилении выработки простагландина E2 (PGE2) в постсинаптических терминалях. Далее PGE2 вза-

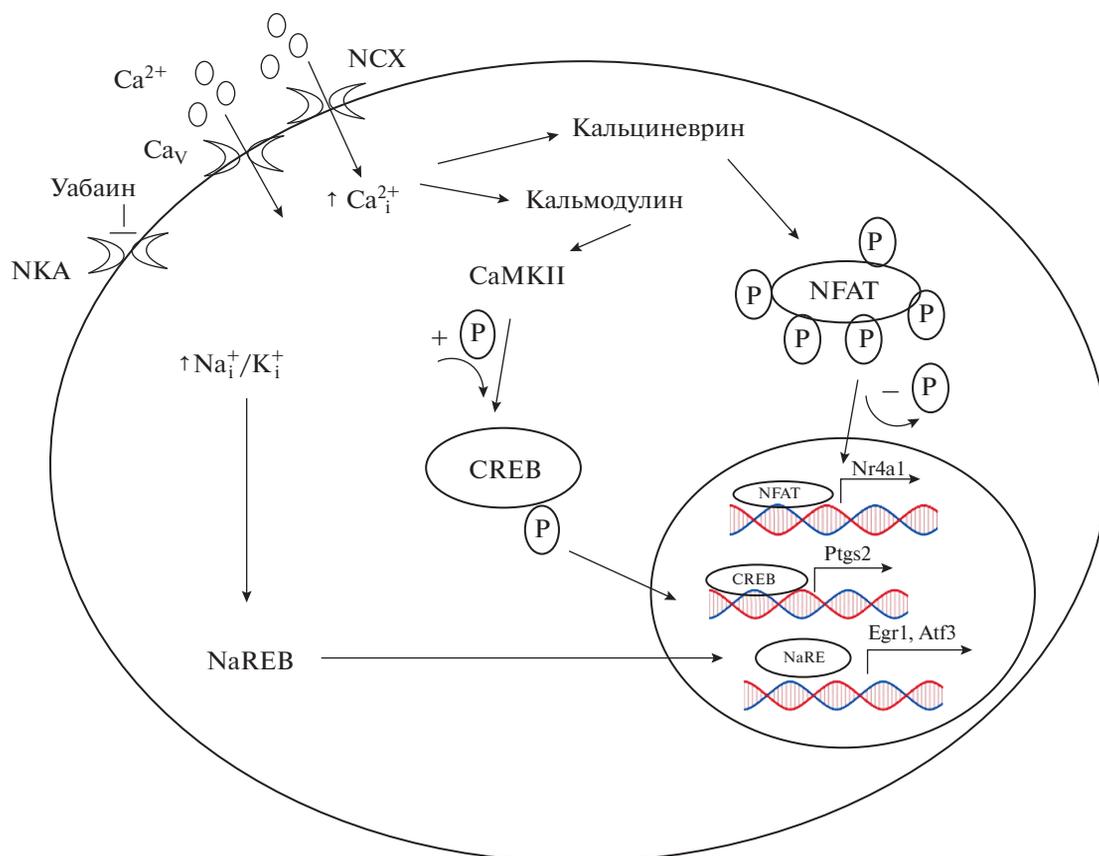


Рис. 6. Механизмы вовлечения одновалентных катионов и Ca^{2+} в регуляцию экспрессии генов в не-нейронных клетках. NKA – Na^+ , K^+ -АТФ-аза; Ca_V – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы; NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; NaREB – неидентифицированный сенсор изменения $[\text{Na}^+]_i$, активирующий NaRE; NaRE – Na^+ -чувствительный элемент, регулирующий транскрипцию генов *Egr1*, *Atf3*. Остальные сокращения приведены в тексте.

имодействует с EP2 рецепторами в пресинаптических терминалах, что, в свою очередь, приводит к активации аденилатциклазы, повышению cAMP, PKA-опосредованной активации Ca_V L-типа, входу Ca^{2+} и усилению выброса нейротрансмиттеров [202, 205, 206]. Механизмы, приводящие к увеличению активности COX-2 в постсинаптических терминалах во время их возбуждения, остаются плохо изученными. Мы предполагаем, что это явление может быть вызвано усиленной экспрессией COX-2, вызванной диссипацией трансмембранных градиентов одновалентных ионов. Действительно, повышение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в нейронах мозжечка после действия убаина сопровождалось повышением содержания мРНК *Ptgs2* в ~18 раз [201]. Воздействие высоких доз убаина на нейроны мозжечка приводит к повышению содержания мРНК *Rgs2*. Белок RGS2 принадлежит к большому семейству белков, активирующих GTP-азы, которые ингибируют сигнальные каскады с участием G-белков [207]. Ingi и коллеги показали, что RGS2 быстро увеличивается в нейронах гиппокампа, коры и стриатума в ответ на стимулы, которые влияют на

синаптическую пластичность [208]. Известно, что RGS2 влияет на краткосрочную пластичность путем понижения G_i -опосредованной пресинаптической сигнализации, что приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} и повышению вероятности высвобождения нейротрансмиттера. Мутантные мыши, не имеющие *Rgs2*, демонстрируют нормальное поведение при выполнении задач обучения и памяти, однако их CA1 пирамидальные нейроны гиппокампа проявляют более слабую связь, измеряемую как уменьшенные количества шипиков [209]. Помимо *Ptgs2* и *Rgs2* убаин повышает экспрессию *Rnd3*. Белок RND3 из Rho семейства Ras суперсемейства GTP-аз, регулирует организацию актинового цитоскелета в ответ на внеклеточные стимулы. Исследования продемонстрировали вовлечение актинового цитоскелета в синаптическую пластичность в дендритах [210] и экспрессию Na_v в HCA [211]. Данные, полученные как в бесклеточных экспериментах [212], так и с использованием клеток, после воздействия на них ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФ-азы [213–215], убедительно свидетельствуют о том, что на организацию ак-

тинового цитоскелета влияет изменение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, индуцированное убаином, сопровождалось также повышением экспрессии *Vgf*. Ранее было показано, что VGF регулирует синаптическую пластичность гиппокампа [216] и его экспрессия увеличивается в ~2.5 раза в гиппокампе после острых электроконвульсивных припадков [217].

Важно отметить, что удаление внеклеточного и внутриклеточного Ca^{2+} с помощью Ca^{2+} -хелаторов увеличивало, а не уменьшало число $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов. Повышение числа $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов при использовании внеклеточного хелатора Ca^{2+} (EGTA) может быть связано с его возможностью увеличивать проницаемость плазматической мембраны для одновалентных катионов и приводить к повышению отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [162, 163]. В связи с этим требуется использовать другие подходы для оценки механизма регуляции экспрессии $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов, например, ингибиторы Ca^{2+} -регулируемых белков. В экспериментах, выполненных на клетках RVSMC, применение антагонистов Ca_v L-типа (никардипина) и кальмодулина (A-7 и W-7) совместно с убаином снижало экспрессию *Ptgs2* и *Nr4a1*, но не влияло на экспрессию *Egr1* и *Atf3* [218] (рис.6). Экспрессия *Ptgs2* также не зависела от присутствия антагониста Ca_v L-типа в клетках C2C12 [219].

Итак, Ca_i^{2+} -независимые механизмы сопряжения “возбуждение—транскрипция” способствуют экспрессии генов за счет увеличения соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Однако необходимо отметить, что воздействие Ca_i^{2+} -опосредованного и Ca_i^{2+} -независимого сигналинга в общие транскриптомные изменения, по-видимому, является специфическим для разного типа клеток. Таким образом, роль Ca_i^{2+} -опосредованного и Ca_i^{2+} -независимого сигналинга в регуляции механизмов экспрессии $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов, вовлеченных в синаптическую пластичность нейронов, требует дальнейших исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50358.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project no. 19-14-50358.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bailey C.H., Kandel E.R., Harris K.M. 2015. Structural components of synaptic plasticity and memory

- consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (7), 1–29.
2. Kojima M., Klein R.L., Hatanaka H. 2002. Pre- and post-synaptic modification by neurotrophins. *Neurosci. Res.* 43 (3), 193–199.
3. Ghanbari A., Malyshev A., Volgushev M., Stevenson I.H. 2017. Estimating short-term synaptic plasticity from pre- and postsynaptic spiking. *PLoS Comput. Biol.* 13 (9), 1–28.
4. Castro-Alamancos M.A., Connors B.W. 1997. Distinct forms of short-term plasticity at excitatory synapses of hippocampus and neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (8), 4161–4166.
5. Tallent M.K., Varghis N., Skorobogatko Y., Hernandez-Cuebas L., Whelan K., Vocadlo D.J., Vosseller K. 2009. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284 (1), 174–181.
6. Hafner A.-S., Donlin-Asp P.G., Leitch B., Herzog E., Schuman E.M. 2019. Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science.* 364 (6441), eaau3644.
7. Kukushkin N.V., Carew T.J. 2017. Memory takes time. *Neuron.* 95 (2), 259–279.
8. Bliss T.V.P., Collingridge G.L., Morris R.G.M., Ryanmann K.G. 2018. Long-term potentiation in the hippocampus: Discovery, mechanisms and function. *Neuroforum.* 24 (3), A103–A120.
9. Artola A., Singer W. 1993. Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 16 (11), 480–487.
10. Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G., Schotter F. 1983. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature.* 305 (5936), 719–721.
11. Eccles J.C. 1983. Calcium in long-term potentiation as a model for memory. *Neuroscience.* 10 (4), 1071–1081.
12. Malenka R.C. 1991. The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* 5 (2–4), 289–295.
13. Lüscher C., Malenka R.C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (6), a005710–a005710.
14. Flavell S.W., Greenberg M.E. 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (1), 563–590.
15. Tsutsuo S. 1994. Protein kinases involved in the expression of long-term potentiation. *Int. J. Biochem.* 26 (6), 735–744.
16. Ma H., Groth R.D., Wheeler D.G., Barrett C.F., Tsien R.W. 2011. Excitation—transcription coupling in sympathetic neurons and the molecular mechanism of its initiation. *Neurosci. Res.* 70 (1), 2–8.
17. Orlov S.N., Mongin A.A. 2007. Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 293 (4), H2039–H2053.

18. Sobolevsky A.I., Rosconi M.P., Gouaux E. 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. **462** (7274), 745–756.
19. Linden D.J., Smeyne M., Connor J.A. 1993. Induction of cerebellar long-term depression in culture requires postsynaptic action of Sodium Ions. *Neuron*. **11** (6), 1093–1100.
20. Dickenson A.H. 2006. Amino acids: Excitatory. In: *Neurotransmitters, Drugs Brain Funct.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 211–223.
21. Henley J.M., Wilkinson K.A. 2016. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **17** (6), 337–350.
22. Luscher C., Malenka R.C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005710.
23. Lalanne T., Oyrer J., Farrant M., Sjöström P.J. 2018. Synapse type-dependent expression of calcium-permeable AMPA receptors. *Front. Synaptic Neurosci.* **10**, 1–8.
24. Malinow R., Malenka R.C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25** (1), 103–126.
25. Liu S.Q.J., Cull-Candy S.G. 2000. Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature*. **405** (6785), 454–458.
26. Gielen M., Sieglar Retchless B., Mony L., Johnson J.W., Paoletti P. 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*. **459** (7247), 703–7.
27. Yuan H., Hansen K.B., Vance K.M., Ogden K.K., Traynelis S.F. 2009. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J. Neurosci.* **29** (39), 12045–12058.
28. Hansen K.B., Furukawa H., Traynelis S.F. 2010. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* **78** (4), 535–549.
29. Karakas E., Furukawa H. 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*. **344** (6187), 992–7.
30. Uteshev V. V. 2012. $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors as a ligand-gated source of Ca^{2+} ions: The search for a Ca^{2+} optimum. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**, 603–638.
31. Bean B.P. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **8** (6), 451–465.
32. Yu F.H., Catterall W.A. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* **4** (3), 207.
33. Catterall W.A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms. *Neuron*. **26** (1), 13–25.
34. George A.L. 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J. Clin. Invest.* **115** (8), 1990–1999.
35. Savio-Galimberti E., Gollob M.H., Darbar D. 2012. Voltage-gated sodium channels: Biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front. Pharmacol.* **3**, 1–19.
36. Caldwell J.H., Schaller K.L., Lasher R.S., Peles E., Levinson S.R. 2000. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97** (10), 5616–5620.
37. Hu W., Tian C., Li T., Yang M., Hou H., Shu Y. 2009. Distinct contributions of Nav1.6 and Nav1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat. Neurosci.* **12** (8), 996–1002.
38. Duflocq A., Le Bras B., Bullier E., Couraud F., Davenne M. 2008. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol. Cell. Neurosci.* **39** (2), 180–192.
39. Solé L., Tamkun M.M. 2020. Trafficking mechanisms underlying Nav channel subcellular localization in neurons. *Channels*. **14** (1), 1–17.
40. Kim Y., Hsu C.L., Cembrowski M.S., Mensh B.D., Spruston N. 2015. Dendritic sodium spikes are required for long-term potentiation at distal synapses on hippocampal pyramidal neurons. *Elife*. **4**, 1–30.
41. Miller C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* **1** (4), 1–5.
42. Zemel B.M., Ritter D.M., Covarrubias M., Muqem T. 2018. A-Type KV channels in dorsal root ganglion neurons: Diversity, function, and dysfunction. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–17.
43. Giese K.P., Storm J.F., Reuter D., Fedorov N.B., Shao L.R., Leicher T., Pongs O., Silva A.J. 1998. Reduced K^+ channel inactivation, spike broadening, and after-hyperpolarization in $Kv\beta 1.1$ -deficient mice with impaired learning. *Learn. Mem.* **5** (4–5), 257–273.
44. Hofmann F., Lacinová L., Klugbauer N. 1999. Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 33–87.
45. Brehm P., Eckert R. 1978. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science*. **202** (4373), 1203–1206.
46. Striessnig J., Pinggera A., Kaur G., Bock G., Tuluc P. 2014. L-type Ca^{2+} channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **3** (2), 15–38.
47. Ma H., Cohen S., Li B., Tsien R.W. 2013. Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. *Biosci. Rep.* **33** (1), 97–101.
48. Di Biase V., Obermair G.J., Szabo Z., Altier C., Sanguesa J., Bourinet E., Flucher B.E. 2008. Stable membrane expression of postsynaptic Cav1.2 calcium channel clusters is independent of interactions with AKAP79/150 and PDZ proteins. *J. Neurosci.* **28** (51), 13845–13855.
49. Jenkins M.A., Christel C.J., Jiao Y., Abiria S., Kim K.Y., Usachev Y.M., Obermair G.J., Colbran R.J., Lee A. 2010. Ca^{2+} -Dependent facilitation of cav1.3 Ca^{2+} channels by densin and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci.* **30** (15), 5125–5135.
50. Striessnig J., Koschak A. 2008. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca^{2+} channels with gene Knockout models. *Channels* **2** (4), 233–251.
51. Moosmang S., Haider N., Klugbauer N., Adelsberger H., Langwieser N., Müller J., Stiess M., Marais E.,

- Schulla V., Lacinova L., Goebbels S., Nave K.A., Storm D.R., Hofmann F., Kleppisch T. 2005. Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* **25** (43), 9883–9892.
52. White J.A., McKinney B.C., John M.C., Powers P.A., Kamp T.J., Murphy G.G. 2008. Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V1.2 disrupts remote spatial memories in mice. *Learn. Mem.* **15** (1), 1–5.
53. Barad M. 2006. Divide and conquer: An L-type voltage-gated calcium channel subtype finds a role in conditioned fear: Commentary. *Learn. Mem.* **13** (5), 560–561.
54. Horrigan F.T., Aldrich R.W. 2002. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **120** (3), 267–305.
55. Rothberg B.S., Magleby K.L. 1999. Gating kinetics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in high Ca²⁺ suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J. Gen. Physiol.* **114** (1), 93–124.
56. Berkefeld H., Sailer C.A., Bildl W., Rohde V., Thumfart J.O., Eble S., Klugbauer N., Reisinger E., Bischofberger J., Oliver D., Knaus H.G., Schultes U., Fakler B. 2006. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science*. **314** (5799), 615–620.
57. Berkefeld H., Fakler B. 2008. Repolarizing responses of BKCa-cav complexes are distinctly shaped by their cav subunits. *J. Neurosci.* **28** (33), 8238–8245.
58. Raffaelli G., Saviane C., Mohajerani M.H., Pedarzi P., Cherubini E. 2004. BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **557** (1), 147–157.
59. Zhang J., Guan X., Li Q., Meredith A.L., Pan H.L., Yan J. 2018. Glutamate-activated BK channel complexes formed with NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115** (38), E9006–E9014.
60. Li Q., Yan J. 2016. Modulation of BK channel function by auxiliary beta and gamma subunits. *Physiol. Behav.* **128**, 51–90.
61. Li B., Gao T.M. 2016. Functional role of mitochondrial and nuclear BK channels. *Int. Rev. Neurobiol.* **128**, 163–191.
62. Springer S.J., Burkett B.J., Schrader L.A. 2015. Modulation of BK channels contributes to activity-dependent increase of excitability through MTORC1 activity in CA1 pyramidal cells of mouse hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–12.
63. Xia X.M., Fakler B., Rivard A., Wayman G., Johnson-Pais T., Keen J.E., Ishii T., Hirschberg B., Bond C.T., Lutsenko S., Maylie J., Adelman J.P. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. **395** (6701), 503–507.
64. Kohler M., Hirschberg B., Bond C.T., Kinzie J.M., Marrion N. V., Maylie J., Adelman J.P. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*. **273** (5282), 1709–1714.
65. Hirschberg B., Maylie J., Adelman J.P., Marrion N. V. 1998. Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K⁺ channels by calcium. *J. Gen. Physiol.* **111** (4), 565–581.
66. Logsdon N.J., Kang J., Togo J.A., Christian E.P., Aiyar J. 1997. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272** (52), 32723–32726.
67. Ishii T.M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C.T., Adelman J.P., Maylie J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94** (21), 11651–11656.
68. Sforza L., Megaro A., Pessia M., Franciolini F., Catacuzzeno L. 2018. Structure, gating and basic functions of the Ca²⁺-activated K channel of intermediate conductance. *Curr. Neuropharmacol.* **16** (5), 608–617.
69. King B., Rizwan A.P., Asmara H., Heath N.C., Engbers J.D.T., Dykstra S., Bartoletti T.M., Hameed S., Zamponi G.W., Turner R.W. 2015. IKCa channels are a critical determinant of the slow AHP in CA1 pyramidal neurons. *Cell Rep.* **11** (2), 175–182.
70. Faber E.S.L., Delaney A.J., Sah P. 2005. SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat. Neurosci.* **8** (5), 635–641.
71. Marrion N. V., Tavalin S.J. 1998. Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*. **395** (6705), 900–905.
72. Ngo-Anh T.J., Bloodgood B.L., Lin M., Sabatini B.L., Maylie J., Adelman J.P. 2005. SK channels and NMDA receptors form a Ca²⁺-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* **8** (5), 642–649.
73. Hammond B., Lemen J., Dudek R., Ward D., Jiang C., Nemeth M., Burns J. 2006. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn root-worm-protected corn. *Food Chem. Toxicol.* **44** (2), 147–160.
74. Dryer S.E. 1994. Na⁺-activated K⁺ channels: A new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci.* **17** (4), 155–160.
75. Kameyama M., Kakei M., Sato R., Shibasaki T., Matsuda H., Irisawa H. 1984. Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*. **309** (5966), 354–356.
76. Budelli G., Hage T.A., Wei A., Rojas P., Ivy Jong Y.J., O'Malley K., Salkoff L. 2009. Na⁺-activated K⁺ channels express a large delayed outward current in neurons during normal physiology. *Nat. Neurosci.* **12** (6), 745–750.
77. Lu S., Das P., Fadool D.A., Kaczmarek L.K. 2010. The slack sodium-activated potassium channel provides a major outward current in olfactory neurons of Kv1.3-/- super-smeller mice. *J. Neurophysiol.* **103** (6), 3311–3319.
78. Nuwer M.O., Picchione K.E., Bhattacharjee A. 2010. PKA-induced internalization of Slack KNa channels

- produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *J. Neurosci.* **30** (42), 14165–14172.
79. Hage T.A., Salkoff L. 2012. Sodium-activated potassium channels are functionally coupled to persistent sodium currents. *J. Neurosci.* **32** (8), 2714–2721.
 80. Kaczmarek L.K. 2013. Slack, slick, and sodium-activated potassium channels. *ISRN Neurosci.* **2013**, 1–14.
 81. Pfeiffer B.E., Huber K.M. 2009. The state of synapses in fragile X syndrome. *Neurosci.* **15** (5), 549–567.
 82. Noma A. 1983. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* **305** (5930), 147–148.
 83. Seino S., Miki T. 2003. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81** (2), 133–176.
 84. Ashcroft F.M., Harrison D.E., Ashcroft S.J.H. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature.* **312** (5993), 446–448.
 85. Haller M., Mironov S.L., Karschin A., Richter D.W. 2001. Dynamic activation of K ATP channels in rhythmically active neurons. *J. Physiol.* **537** (1), 69–81.
 86. Zawar C., Plant T.D., Schirra C., Konnerth A., Neumcke B. 1999. Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **514** (2), 327–341.
 87. Choeiri C., Staines W.A., Miki T., Seino S., Renaud J.M., Teutenberg K., Messier C. 2006. Cerebral glucose transporters expression and spatial learning in the K-ATP Kir6.2^{-/-} knockout mice. *Behav. Brain Res.* **172** (2), 233–239.
 88. Moriguchi S., Ishizuka T., Yabuki Y., Shioda N., Sasaki Y., Tagashira H., Yawo H., Yeh J.Z., Sakagami H., Narahashi T., Fukunaga K. 2018. Blockade of the K ATP channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy. *Mol. Psychiatry.* **23** (2), 211–221.
 89. Brini M., Carafoli E. 2011. The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane Sodium Calcium exchanger cooperate in the regulation of cell Calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (2), 1–15.
 90. Jaffe D.B., Johnston D., Lasser-Ross N., Lisman J.E., Miyakawa H., Ross W.N. 1992. The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca²⁺ entry into hippocampal neurons. *Nature.* **357** (6375), 244–246.
 91. Bennay M., Langer J., Meier S.D., Kafitz K.W., Rose C.R. 2008. Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia* **56** (10), 1138–1149.
 92. Verkhratsky A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* **85** (1), 201–279.
 93. Block B.A., Imagawa T., Campbell K.P., Franzini-Armstrong C. 1988. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **107** (6), 2587–2600.
 94. Samsó M., Feng W., Pessah I.N., Allen P.D. 2009. Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS Biol.* **7** (4), e1000085.
 95. Gao L., Tripathy A., Lu X., Meissner G. 1997. Evidence for a role of C-terminal amino acid residues in skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) function. *FEBS Lett.* **412** (1), 223–226.
 96. Kunerth S., Langhorst M.F., Schwarzmann N., Gu X., Huang L., Yang Z., Zhang L., Mills S.J., Zhang L.H., Potter B.V.L., Guse A.H. 2004. Amplification and propagation of pacemaker Ca²⁺ signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J. Cell Sci.* **117** (10), 2141–2149.
 97. Gerasimenko J. V., Flowerdew S.E., Voronina S.G., Sukhomlin T.K., Tepikin A. V., Petersen O.H., Gerasimenko O. V. 2006. Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J. Biol. Chem.* **281** (52), 40154–40163.
 98. Sukhareva M., Smith S. V., Maric D., Barker J.L. 2002. Functional properties of ryanodine receptors in hippocampal neurons change during early differentiation in culture. *J. Neurophysiol.* **88** (3), 1077–1087.
 99. Korkotian E., Segal M. 2011. Synaptopodin regulates release of calcium from stores in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J. Physiol.* **589** (24), 5987–5995.
 100. Raymond C.R., Redman S.J. 2002. Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP. *J. Neurophysiol.* **88** (1), 249–255.
 101. Raymond C.R., Redman S.J. 2006. Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J. Physiol.* **570** (1), 97–111.
 102. Balschun D., Wolfer D.P., Bertocchini F., Barone V., Conti A., Zuschratter W., Missiaen L., Lipp H.P., Frey J.U., Sorrentino V. 1999. Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. *EMBO J.* **18** (19), 5264–5273.
 103. Santulli G., Nakashima R., Yuan Q., Marks A.R. 2017. Intracellular calcium release channels: An update. *J. Physiol.* **595** (10), 3041–3051.
 104. Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. 1994. Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3)-gated Ca channels from cerebellum: Conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J. Gen. Physiol.* **104** (5), 821–856.
 105. Boehning D., Mak D.O.D., Foskett J.K., Joseph S.K. 2001. Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **276** (17), 13509–13512.
 106. Boehning D., Joseph S.K., Mak D.O.D., Foskett J.K. 2001. Single-channel recordings of recombinant inositol trisphosphate receptors in mammalian nuclear envelope. *Biophys. J.* **81** (1), 117–124.
 107. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N., Kostyuk P.G., Thomas R.C. 2005. Spontaneously

- active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J. Physiol.* **565** (3), 897–910.
108. Fujii S., Matsumoto M., Igarashi K., Kato H., Mikoshiba K. 2000. Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Learn. Mem.* **7** (5), 312–320.
109. Qiu Z., Nicoll D.A., Philipson K.D. 2001. Helix packing of functionally important regions of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* **276** (1), 194–199.
110. Nicoll D.A., Ottolia M., Lu L., Lu Y., Philipson K.D. 1999. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* **274** (2), 910–917.
111. Hilge M., Aelen J., Vuister G.W. 2006. Ca²⁺ Regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors. *Mol. Cell* **22** (1), 15–25.
112. Lytton J. 2007. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem. J.* **406** (3), 365–382.
113. Quednau B.D., Nicoll D.A., Philipson K.D. 2004. The sodium/calcium exchanger family – SLC8. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **447** (5), 543–548.
114. Quednau B.D., Nicoll D.A., Philipson K.D. 1997. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am. J. Physiol. Physiol.* **272** (4), C1250–C1261.
115. DiPolo R., Beaugé L. 2006. Sodium/calcium exchanger: Influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol. Rev.* **86** (1), 155–203.
116. Blaustein M.P., Juhaszova M., Golovina V.A., Church P.J., Stanley E.F. 2006. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976** (1), 356–366.
117. Jeon D., Yang Y.M., Jeong M.J., Philipson K.D., Rhim H., Shin H.S. 2003. Enhanced learning and memory in mice lacking Na⁺/Ca²⁺ exchanger 2. *Neuron* **38** (6), 965–976.
118. Molinaro P., Viggiano D., Nisticò R., Sirabella R., Secondo A., Boscia F., Pannaccione A., Scorziello A., Mehdaawy B., Sokolow S., Herchuelz A., di Renzo G.F., Annunziato L. 2011. Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX3) knock-out mice display an impairment in hippocampal long-term potentiation and spatial learning and memory. *J. Neurosci.* **31** (20), 7312–7321.
119. Scheiner-Bobis G. 2002. The sodium pump. *Eur. J. Biochem.* **269** (10), 2424–2433.
120. Blanco G. 2005. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* **25** (5), 292–303.
121. Hieber V., Siegel G.J., Fink D.J., Beaty M.W., Mata M. 1991. Differential distribution of (Na, K)-ATPase? isoforms in the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11** (2), 253–262.
122. McGrail K., Phillips J., Sweadner K. 1991. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* **11** (2), 381–391.
123. Peng L., Martin-Vasallo P., Sweadner K.J. 1997. Isoforms of Na,K-ATPase α and β subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.* **17** (10), 3488–3502.
124. Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmägi M., Lopachev A. V., Shah Z.A., Boldyrev A.A., Liu L. 2015. Functional interaction between Na/K-ATPase and NMDA receptor in cerebellar neurons. *Mol. Neurobiol.* **52** (3), 1726–1734.
125. Munzer J.S., Daly S.E., Jewell-Motz E.A., Lingrel J.B., Blostein R. 1994. Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269** (24), 16668–16676.
126. Jewell E.A., Lingrel J.B. 1991. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase α 1, α 2, and α 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **266** (25), 16925–16930.
127. Zahler R., Zhang Z.-T., Manor M., Boron W.F. 1997. Sodium kinetics of Na,K-ATPase α isoforms in intact transfected HeLa cells. *J. Gen. Physiol.* **110** (2), 201–213.
128. Dobretsov M. 2005. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front. Biosci.* **10**, 2373–2396.
129. Azarias G., Kruusmägi M., Connor S., Akkuratov E.E., Liu X.-L., Lyons D., Brismar H., Broberger C., Aperia A. 2013. A Specific and essential role for Na,K-ATPase α 3 in neurons co-expressing α 1 and α 3. *J. Biol. Chem.* **288** (4), 2734–2743.
130. Kim J.H., Sizov I., Dobretsov M., Von Gersdorff H. 2007. Presynaptic Ca²⁺ buffers control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the α 3 Na⁺/K⁺-ATPase. *Nat. Neurosci.* **10** (2), 196–205.
131. Glushchenko T.S., Izvarina N.L. 1997. Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. *Neurosci. Behav. Physiol.* **27** (1), 49–52.
132. Reich C.G., Mason S.E., Alger B.E. 2004. Novel form of LTD induced by transient, partial inhibition of the Na, K-pump in rat hippocampal CA1 cells. *J. Neurophysiol.* **91** (1), 239–247.
133. Niggli V., Sigel E., Carafoli E. 1982. The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J. Biol. Chem.* **257** (5), 2350–2356.
134. Smallwood J.I., Waisman D.M., Lafreniere D., Rasmussen H. 1983. Evidence that the erythrocyte calcium pump catalyzes a Ca²⁺:nH⁺ exchange. *J. Biol. Chem.* **258** (18), 11092–11097.
135. Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **476** (1), 65–74.
136. Greeb J., Shull G.E. 1989. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **264** (31), 18569–18576.

137. Stauffer T.P., Guerini D., Carafoli E. 1995. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca pump. *J. Biol. Chem.* **270** (20), 12184–12190.
138. Mata A.M. 2010. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in the nervous system during development and ageing. *World J. Biol. Chem.* **1** (7), 229.
139. Burette A.C., Strehler E.E., Weinberg R.J. 2009. 'Fast' plasma membrane calcium pump PMCA2a concentrates in GABAergic terminals in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **512** (4), 500–513.
140. Strehler E.E., Filoteo A.G., Penniston J.T., Caride A.J. 2007. Plasma-membrane Ca^{2+} pumps: Structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* **35** (5), 919–922.
141. Marques-da-Silva D., Gutierrez-Merino C. 2014. Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium.* **56** (2), 108–123.
142. Garside M.L., Turner P.R., Austen B., Strehler E.E., Beesley P.W., Empson R.M. 2009. Molecular interactions of the plasma membrane calcium ATPase 2 at pre- and post-synaptic sites in rat cerebellum. *Neuroscience.* **162** (2), 383–395.
143. Zanni G., Cali T., Kalscheuer V.M., Ottolini D., Barresi S., Lebrun N., Montecchi-Palazzi L., Hu H., Chelly J., Bertini E., Brini M., Carafoli E. 2012. Mutation of plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca^{2+} homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109** (36), 14514–14519.
144. Kip S.N., Gray N.W., Burette A., Canbay A., Weinberg R.J., Strehler E.E. 2006. Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons. *Hippocampus.* **16** (1), 20–34.
145. Misquitta C.M., Mack D.P., Grover A.K. 1999. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: Link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium.* **25** (4), 277–290.
146. Verboomen H., Wuytack F., Van den Bosch L., Mertens L., Casteels R. 1994. The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca^{2+} -transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochem. J.* **303** (3), 979–984.
147. Majewska A., Brown E., Ross J., Yuste R. 2000. Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: Role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* **20** (5), 1722–1734.
148. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron.* **29** (1), 197–208.
149. Collingridge B.Y.G.L., Kehl S.J., McLennan H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* **334**, 33–46.
150. Bliss T. V., Collingridge G.L. 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* **361** (6407), 31–39.
151. Aniksztejn L., Ben-Ari Y. 1995. Expression of LTP by AMPA and/or NMDA receptors is determined by the extent of NMDA receptors activation during the tetanus. *J. Neurophysiol.* **74** (6), 2349–2357.
152. Berridge M.J. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* **21** (1), 13–26.
153. Malenka R.C., Lancaster B., Zucker R.S. 1992. Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron.* **9** (1), 121–128.
154. Santana L.F. 2008. Editorial: NFAT-dependent excitation-transcription coupling in heart. *Circ. Res.* **103** (7), 681–683.
155. Gundersen K. 2011. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: The molecular pathways of exercise. *Biol. Rev.* **86** (3), 564–600.
156. Morgan J.I., Curran T. 1989. Stimulus-transcription coupling in neurons: Role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* **12** (11), 459–462.
157. Sheng M., Greenberg M.E. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* **4** (4), 477–485.
158. Cole A.J., Saffen D.W., Baraban J.M., Worley P.F. 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature.* **340** (6233), 474–476.
159. Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., Zacher C., Layer L.E., Kvello A., Reschke M., Spanagel R., Sprengel R., Wagner E.F., Gass P. 2003. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-fos in the CNS. *J. Neurosci.* **23** (27), 9116–9122.
160. Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. 2016. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 1–11.
161. Greenberg M.E., Ziff E.B., Greene L.A. 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science.* **234** (4772), 80–83.
162. Orlov S.N., Aksentsev S.L., Kotelevtsev S. V. 2005. Extracellular calcium is required for the maintenance of plasma membrane integrity in nucleated cells. *Cell Calcium.* **38** (1), 53–57.
163. Koltsova S. V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2015. Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: Role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio. *Cell Calcium.* **58** (3), 317–324.
164. Deisseroth K., Heist E.K., Tsien R.W. 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* **392** (6672), 198–202.
165. Ma H., Groth R.D., Cohen S.M., Emery J.F., Li B., Hoedt E., Zhang G., Neubert T.A., Tsien R.W. 2014. γCaMKII shuttles $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell.* **159** (2), 281–294.

166. Malenka R.C., Kauer J.A., Perkel D.J., Mauk M.D., Kelly P.T., Nicoll R.A., Waxham M.N. 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*. **340** (6234), 554–557.
167. McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J. 1994. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **74** (2), 365–507.
168. Greer P.L., Greenberg M.E. 2008. From synapse to nucleus: Calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*. **59** (6), 846–860.
169. Clapham D.E. 2007. Calcium signaling. *Cell*. **131** (6), 1047–1058.
170. Derkach V., Barria A., Soderling T.R. 1999. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96** (6), 3269–3274.
171. Kristensen A.S., Jenkins M. a., Banke T.G., Schousboe A., Johnson R.C., Huganir R., Traynelis S.F. 2011. Mechanism of CaMKII regulation of AMPA receptor gating. *Nat. Neurosci.* **14** (6), 727–735.
172. Mitsushima D., Ishihara K., Sano A., Kessels H.W., Takahashi T. 2011. Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108** (30), 12503–12508.
173. Banke T.G., Bowie D., Lee H., Huganir R.L., Schousboe A., Traynelis S.F. 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* **20** (1), 89–102.
174. Chetkovich D.M., Gray R., Johnston D., Sweatt J.D. 1991. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88** (15), 6467–6471.
175. Lau C.G., Takeuchi K., Rodenas-Ruano A., Takayasu Y., Murphy J., Bennett M.V.I., Zukin R.S. 2009. Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem. Soc. Trans.* **37** (6), 1369–1374.
176. Aman T.K., Maki B.A., Ruffino T.J., Kasperek E.M., Popescu G.K. 2014. Separate intramolecular targets for protein kinase A control N-Methyl-D-aspartate receptor gating and Ca²⁺ permeability. *J. Biol. Chem.* **289** (27), 18805–18817.
177. Matthews R.P., Guthrie C.R., Wailes L.M., Zhao X., Means A.R., McKnight G.S. 1994. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **14** (9), 6107–6116.
178. Reymann K.G., Frey U., Jork R., Matthies H. 1988. Polymyxin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* **440** (2), 305–314.
179. Kauer J.A., Malenka R.C., Nicoll R.A. 1988. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*. **1** (10), 911–917.
180. Lovinger D.M., Wong K.L., Murakami K., Routtenberg A. 1987. Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **436** (1), 177–183.
181. Finkbeiner S., Greenberg M.E. 1996. Ca²⁺-dependent routes to Ras: Mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron*. **16** (2), 233–236.
182. Herring B.E., Nicoll R.A. 2016. Long-term potentiation: From CaMKII to AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Physiol.* **78** (1), 351–365.
183. Murakoshi H., Wang H., Yasuda R. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*. **472** (7341), 100–104.
184. Lynch G., Rex C.S., Gall C.M. 2007. LTP consolidation: Substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*. **52** (1), 12–23.
185. Amini M., Ma C.-I., Farazifard R., Zhu G., Zhang Y., Vanderluit J., Zoltewicz J.S., Hage F., Savitt J.M., Lagace D.C., Slack R.S., Beique J.-C., Baudry M., Greer P.A., Bergeron R., Park D.S. 2013. Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *J. Neurosci.* **33** (13), 5773–5784.
186. Baeza-Lehnert F., Saab A.S., Gutiérrez R., Larenas V., Díaz E., Horn M., Vargas M., Höslí L., Stobart J., Hirrlinger J., Weber B., Barros L.F. 2019. Non-canonical control of neuronal energy status by the Na⁺ pump. *Cell Metab.* **29** (3), 668–680.e4.
187. Kiedrowski L., Wroblewski J.T., Costa E. 1994. Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol. Pharmacol.* **45** (5), 1050–1054.
188. Rose C.R., Konnerth A. 2001. NMDA receptor-mediated Na⁺ signals in spines and dendrites. *J. Neurosci.* **21** (12), 4207–4214.
189. Somjen G.G. 2002. Ion regulation in the brain: Implications for pathophysiology. *Neuroscientist*. **8** (3), 254–267.
190. Deitmer J.W., Rose C.R. 2010. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* **63** (1–2), 113–129.
191. Verkhatsky A., Noda M., Parpura V., Kirischuk S. 2013. Sodium fluxes and astroglial function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **961**, 295–305.
192. Callaway J.C., Ross W.N. 1997. Spatial distribution of synaptically activated sodium concentration changes in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurophysiol.* **77** (1), 145–152.
193. Miyazaki K., Ross W.N. 2017. Sodium dynamics in pyramidal neuron dendritic spines: synaptically evoked entry predominantly through AMPA receptors and removal by diffusion. *J. Neurosci.* **37** (41), 9964–9976.
194. Behnisch T., Reymann K.G. 1995. Thapsigargin blocks long-term potentiation induced by weak, but not strong tetanisation in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Lett.* **192** (3), 185–188.
195. Balschun D., Wolfer D.P., Gass P., Mantamadiotis T., Welzl H., Schütz G., Frey J.U., Lipp H.P. 2003. Does

- cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J. Neurosci.* **23** (15), 6304–6314.
196. Koltsova S. V., Trushina Y., Haloui M., Akimova O.A., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2012. Ubiquitous $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: Evidence for Ca^{2+}_i -independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* **7** (5), e38032.
197. Kasahara J., Fukunaga K., Miyamoto E. 2001. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J. Biol. Chem.* **276** (26), 24044–24050.
198. Taurin S., Dulin N.O., Pchejetski D., Grygorczyk R., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2002. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: Evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism. *J. Physiol.* **543** (3), 835–847.
199. Haloui M., Taurin S., Akimova O.A., Guo D.F., Tremblay J., Dulin N.O., Hamet P., Orlov S.N. 2007. $[Na^+]_i$ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements. *FEBS J.* **274** (14), 3557–3567.
200. Orlov S.N., Taurin S., Tremblay J., Hamet P. 2001. Inhibition of Na^+, K^+ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio: Possible implication in vascular remodelling. *J. Hypertens.* **19** (9), 1559–1565.
201. Smolyaninova L.V., Shiyani A.A., Kapilevich L.V., Lopachev A.V., Fedorova T.N., Klementieva T.S., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Orlov S.N. 2019. Transcriptomic changes triggered by ouabain in rat cerebellum granule cells: Role of α_3 - and α_1 - Na^+, K^+ -ATPase-mediated signaling. *PLoS One* **14** (9), 1–23.
202. Yang H., Chen C. 2008. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr. Pharm. Des.* **14** (14), 1443–1451.
203. Yamagata K., Andreasson K.I., Kaufmann W.E., Barnes C.A., Worley P.F. 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron.* **11** (2), 371–386.
204. Chen C., Magee J.C., Bazan N.G. 2002. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J. Neurophysiol.* **87** (6), 2851–2857.
205. Sang N., Chen C. 2006. Lipid signaling and synaptic plasticity. *Neuroscientist.* **12** (5), 425–434.
206. Yagami T., Koma H., Yamamoto Y. 2016. Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* **53** (7), 4754–4771.
207. Koelle M.R. 1997. A new family of G-protein regulators – the RGS proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (2), 143–147.
208. Ingi T., Krumins A.M., Chidiac P., Brothers G.M., Chung S., Snow B.E., Barnes C.A., Lanahan A.A., Siderovski D.P., Ross E.M., Gilman A.G., Worley P.F. 1998. Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J. Neurosci.* **18** (18), 7178–7188.
209. Leslie J.H., Nedivi E. 2011. Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. *Prog. Neurobiol.* **94** (3), 223–237.
210. Rudy J.W. 2014. *The neurobiology of learning and memory*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, p. 48–55.
211. Xu X., Shrager P. 2005. Dependence of axon initial segment formation on Na^+ channel expression. *J. Neurosci. Res.* **79** (4), 428–441.
212. Oda T., Makino K., Yamashita I., Namba K., Maéda Y. 2001. Distinct structural changes detected by X-ray fiber diffraction in stabilization of F-actin by lowering pH and increasing ionic strength. *Biophys. J.* **80** (2), 841–851.
213. Rajamanickam G.D., Kroetsch T., Kastelic J.P., Thundathil J.C. 2017. Testis-specific isoform of Na/K-ATPase (ATP1A4) regulates sperm function and fertility in dairy bulls through potential mechanisms involving reactive oxygen species, calcium and actin polymerization. *Andrology.* **5** (4), 814–823.
214. Rajasekaran A.K., Rajasekaran S.A. 2003. Role of Na/K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am. J. Physiol. – Ren. Physiol.* **285**, 388–396.
215. La J., Reed E.B., Koltsova S., Akimova O., Hamanaka R.B., Mutlu G.M., Orlov S.N., Dulin N.O. 2016. Regulation of myofibroblast differentiation by cardiac glycosides. *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* **310** (9), L815–L823.
216. Alder J., Thakker-Varia S., Bangasser D.A., Kuroiwa M., Plummer M.R., Shors T.J., Black I.B. 2003. Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **23** (34), 10800–10808.
217. Altar C.A., Laeng P., Jurata L.W., Brockman J.A., Lemire A., Bullard J., Bukhman Y. V., Young T.A., Charles V., Palfreyman M.G. 2004. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J. Neurosci.* **24** (11), 2667–2677.
218. Sidorenko S., Klimanova E., Milovanova K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. 2018. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca^{2+}_i -mediated and Ca^{2+}_i -independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio. *Cell Calcium.* **76**, 72–86.
219. Ng A.N., Toresson H. 2011. Endoplasmic reticulum dynamics in hippocampal dendritic spines induced by agonists of type I metabotropic glutamate but not by muscarinic acetylcholine receptors. *Synapse.* **65** (4), 351–355.

Contribution of Monovalent (Na^+ and K^+) and Divalent (Ca^{2+}) Ions to the Mechanisms of Synaptic Plasticity

L. V. Smolyaninova^{1, *}, A. A. Shiyan¹, G. V. Maksimov¹, S. N. Orlov¹

¹*Faculty of Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia*

**e-mail: smolyaninovalarisa1@gmail.com*

The review surveys the involvement of ions (Na^+ , K^+ , and Ca^{2+}) in the synaptic plasticity processes during long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) in a postsynaptic neuron. It is suggested that the main participants are AMPA and NMDA receptors; voltage-dependent Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} channels; Ca^{2+} - and Na^+ -activated K^+ channels; ATP-sensitive K^+ channels, and Ca^{2+} channels of the endoplasmic reticulum. Their molecular characteristics and the role in LTP and LTD are reviewed. The role of changes in the intracellular $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio and Ca^{2+} -dependent mechanisms in signal generation up to the level of gene expression is considered for the first time. We think that additional research is needed to identify the subset of neuronal genes, whose differential expression contributes to synaptic plasticity via the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive, Ca^{2+} -independent excitation–transcription coupling mechanism.

Keywords: sodium, potassium, calcium, synaptic plasticity, long-term potentiation, long-term depression, gene expression

УДК 576.31

ВЛИЯНИЕ *L*-АРГИНИНА И ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА ИНДУКЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ И ПАЛЬМИТОИЛКАРНИТИНОМ. ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NO/cGMP/PKG СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

© 2020 г. В. В. Дынник^а, *, Е. В. Гришина^а, Н. И. Федотчева^а

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: dynnik@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.05.2019 г.

После доработки 07.07.2020 г.

Принята к публикации 09.07.2020 г.

Работа посвящена исследованию механизмов защитного действия *L*-аргинина и донора оксида азота SNAP при индукции циклоспорин А-зависимой митохондриальной поры (MPTP) избытком Ca²⁺ или *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC). Нами было проанализировано возможное вовлечение в регуляцию MPTP сигнальной системы с участием митохондриальных ферментов NO-синтазы (mtNOS), гуанилатциклазы (GC) и cGMP-зависимой протеинкиназы G (PKG) (mtNOS/GC/PKG-SS). Эксперименты были проведены на изолированных митохондриях печени с использованием ингибиторного анализа. Результаты исследований показали, что *L*-аргинин и SNAP оказывают дозозависимое влияние на открытие MPTP. При низких концентрациях *L*-аргинин и SNAP (5–100 мкМ) активировали защитные механизмы, обеспечивая увеличение кальциевой буферной емкости митохондрий (CRC) и критической (пороговой) концентрации пальмитоилкарнитина (PC*), необходимой для индукции MPTP. При более высоких концентрациях *L*-аргинин (более 500 мкМ) и SNAP (более 100 мкМ) вызвали противоположный эффект, подавляя дыхание и способствуя открытию поры. Ингибиторы NOS, GC и PKG устраняли защитные эффекты, наблюдавшиеся при малых концентрациях *L*-аргинина и SNAP. Эксперименты, проведенные с использованием специфического ингибитора индуцибельной NOS (W1400), показали, что этот кальций-независимый фермент не участвует в регуляции MPTP в условиях наших экспериментов. На основании полученных результатов можно предположить, что кальций-зависимая митохондриальная сигнальная система mtNOS/GC/PKG-SS может быть вовлечена в регуляцию MPTP, обеспечивая увеличение CRC и PC*. При высоких концентрациях *L*-аргинина или SNAP избыток NO преодолевает защиту, обеспечиваемую mtPKG, и способствует открытию поры.

Ключевые слова: *L*-аргинин, доноры оксида азота, NO-синтаза, гуанилатциклаза, протеинкиназа G, митохондриальная пора

DOI: 10.31857/S0233475520060055

ВВЕДЕНИЕ

Влияние *L*-аргинина, доноров NO и ингибиторов Ca²⁺-зависимой изоформы митохондриальной NO-синтазы (mtNOS) на кальциевую емкость митохондрий (CRC), индукцию мито-

хондриальной поры (MPTP), высвобождение цитохрома C (CytC) изучается более 25 лет. Полученные за этот период результаты исследований противоречивы. Так, еще в 1999 году было показано, что активация mtNOS Ca²⁺ и *L*-аргинином вызывает высвобождение CytC, в то время как ингибирование mtNOS уменьшает выход CytC, повышает митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и CRC [1]. Позже было обнаружено, что NO вызывает концентрационно-зависимые эффекты [2]. Было показано, что очень низкие или высокие концентрации NO-доноров способствуют набуханию митохондрий, высвобождению CytC и открытию MPTP, индуцированному избытком ионов кальция. И наоборот, промежуточные кон-

Список сокращений: MPTP – циклоспорин А-зависимая митохондриальная пора; mtNOS – митохондриальная NO-синтаза; GC – гуанилатциклаза; NO – оксид азота; PKG – cGMP-зависимая протеинкиназа G; COX – цитохром-с-оксидаза; PC – *D,L*-пальмитоилкарнитин; PC* – критическая (пороговая) концентрация PC, вызывающая индукцию MPTP; CRC – кальциевая емкость митохондрий; CytC – цитохром c; $\Delta\Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал; TPP⁺ – тетрафенилфосфоний.

центрации доноров NO обеспечивают защитные эффекты, уменьшая набухание митохондрий и вероятность открытия поры. Защитные и неблагоприятные воздействия доноров NO объясняли возможным действием *S*-нитрозотиолов и пероксинитрита, соответственно [1, 2].

Неоднозначные эффекты доноров NO на открытие МРТР также наблюдались в экспериментах, выполненных на клетках. Было показано, что малые концентрации доноров NO уменьшают накопление митохондриального Ca^{2+} , а высокие концентрации, наоборот, способствуют выходу Ca^{2+} и открытию МРТР [3]. В этих экспериментах добавленный *L*-аргинин ингибировал поглощение Ca^{2+} митохондриями и предотвращал открытие МРТР [2, 4]. Авторы предположили, что внутримитохондриальный NO может быть вовлечен в отрицательную обратную связь, предотвращающую открытие МРТР за счет ингибирования транспорта Ca^{2+} [3]. Согласно другой точке зрения, уменьшение поглощения Ca^{2+} может быть обусловлено деполяризацией митохондрий, вызываемой NO [5].

Представленные выше противоречивые эффекты доноров NO и *L*-аргинина на $\Delta\Psi_m$ и контроль МРТР не могут быть объяснены действием механизмов, основанных только на редокс-регуляции митохондриальных процессов *S*-нитрозилированием [6, 7] и *S*-глутатионированием [8–11] различных белков. Потенциальные механизмы защиты могут включать внутримитохондриальные сигнальные цепи, учитывающие взаимодействие кальция и NO и другие, пока неизвестные обратные связи. Недавно Seza и соавторы обнаружили, что митохондриальная фракция сердца обладает активностью *s*GMP-зависимой протеинкиназы G (PKG) [12]. Продукция *s*GMP митохондриальной гуанилатциклазой (GC) также была продемонстрирована этой группой [13]. Было показано, что SNAP и 8-Bromo-*s*GMP способствуют кальций-зависимому высвобождению CytC из митохондрий сердца, вовлекая потенциал-зависимый анионный канал (VDAC) в качестве конечной мишени сигнального пути. Наблюдаемые эффекты предотвращались применением ингибиторов NOS, GC, PKG и VDAC. Гидролиз *s*GMP митохондриальной фосфодиэстеразой циклических нуклеотидов PDE2A также был продемонстрирован в митохондриях мозга и печени в независимых экспериментах [14]. Эти данные указывают на то, что митохондрии содержат все элементы автономной Ca^{2+} -зависимой сигнальной системы: $Ca^{2+} \rightarrow mtNOS \rightarrow NO \rightarrow GC \rightarrow sGMP \rightarrow PKG$ (*mtNOS/GC/PKG-SS*), которая может участвовать в регуляции митохондриального дыхания [15] и МРТР.

В данной работе были проведены эксперименты на изолированных митохондриях печени кры-

сы, в которых анализировалось влияние агонистов и ингибиторов *mtNOS/GC/PKG-SS* на диссипацию $\Delta\Psi_m$ и индукцию МРТР, вызываемые избытком Ca^{2+} или пальмитоилкарнитина (PC). Предварительные результаты были опубликованы ранее [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар (6–8 недель) содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20–22°C (свет/темнота = 12 ч/12 ч). Эксперименты проводили при 26°C. Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA и 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала: 125 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 1 мМ $MgCl_2$. Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi_m$) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония (TPP^+), концентрацию которого во внешней среде $[TPP^+]_{out}$ регистрировали с помощью TPP^+ -селективного электрода. Измерение концентрации кальция в среде производили с использованием Ca^{2+} -селективного электрода (Nico, Москва, Россия). Все эксперименты проводили в закрытой или открытой кювете объемом 1 мл, содержащей 1.0 мг мит. белка, при постоянном перемешивании. В качестве субстратов дыхания использовали *L*-глутамат (10 мМ) и пируват (1 мМ) для поддержания полного оборота цикла Кребса и сохранения субстратного фосфорилирования в цикле. В некоторых экспериментах дыхание митохондрий поддерживалось окислением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (1–2 мкМ) или пирувата (1 мМ) и *L*-малата (5 мМ). Все эксперименты выполнялись в присутствии 10 ед. гексокиназы, 10 мМ глюкозы и 1 мМ $MgCl_2$. Последующие добавки 0.75 мМ ADP обеспечивали высокую стационарную скорость дыхания (VO_{2SS}), которая была близка к максимальной скорости дыхания, наблюдающейся в Состоянии 3 ($VO_{2SS} = 80–85\%$ от VO_{2max} (V_3)). Часть экспериментов была выполнена при низкой скорости дыхания митохон-

дрий, в отсутствие гексокиназы и ADP в среде (Состояние 4, V_4). Скорость набухания митохондрий ($V_{sw} = \Delta o.d./\text{мин}$) определялась в открытой кювете объемом 2 мл при 0.35 мг. мит. белка на 1 мл с использованием спектрофотометра Ocean Optics USB4000. Открытие МРТР регистрировали как: выход кальция из митохондрий в инкубационную среду; диссипацию митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$; набухание митохондрий. Индукция МРТР достигалась путем последовательных добавок в инкубационную среду 20 мкМ Ca^{2+} (CaCl_2) или 20 мкМ РС. Критические концентрации Ca^{2+} или РС, необходимые для индукции поры, представляют митохондриальную кальциевую буферную емкость (CRC) и пороговую концентрацию РС (PC^*). Величины этих параметров характеризуют чувствительность комплекса МРТР к действию различных модуляторов поры. Влияние mtNOS/PKG-SS на открытие МРТР оценивали путем определения значений CRC, PC^* и V_{sw} , соответственно. Активацию mtNOS-SS обеспечивали введением в среду инкубации *L*-аргинина, NO доноров или Ca^{2+} . 7-NI, ODQ и KT5823 были использованы для ингибирования mtNOS, GC и PKG соответственно. В работе использованы реактивы фирмы "Sigma" (США). Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием *t*-критерия с использованием SigmaPlot 11. Данные представлены как среднее значение \pm S.E.M. $n = 4-6$ независимых экспериментов. За уровень значимости было принято $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция МРТР избытком кальция и защитные эффекты *L*-аргинина. На рис. 1а показано, что при последовательных добавках 20 мкМ Ca^{2+} в контроле CRC составляет 100 мкМ (нижняя кривая). Преинкубация митохондрий с 300 мкМ *L*-аргинина приводит к увеличению CRC до 180 мкМ. Введение в среду инкубации ингибитора NOS 7NI (100 мкМ) уменьшает величину CRC до 80 мкМ, при достижении которой происходит диссипация $\Delta\Psi_m$ (рост TPP^+ в среде, верхняя кривая). Преинкубация митохондрий с селективным ингибитором iNOS 1400W (50–100 нМ) не влияла на величину CRC, что свидетельствует об отсутствии iNOS в митохондриях в исследуемых условиях.

Защитный эффект *L*-аргинина также устраняется ингибиторами GC (100 мкМ ODQ, рис. 1б, верхняя кривая) и PKG (1.5 мкМ KT5823, рис. 1в, верхние кривые). Из рис. 1в видно, что уменьшение $\Delta\Psi_m$ (верхняя кривая) сопряжено с выбросом Ca^{2+} из митохондрий (нижние кривые). Видно также, что преинкубация митохондрий с KT5823,

селективным ингибитором PKG, уменьшает CRC от 180 до 120 мкМ.

Эти данные свидетельствуют о том, что защитный эффект *L*-аргинина, направленный на уменьшение вероятности индукции поры избытком Ca^{2+} , может быть обусловлен функционированием mtNOS/GC/PKG-SS, эффектором которой является PKG. Можно предположить, что наблюдаемый защитный эффект *L*-аргинина связан с фосфорилированием структурных элементов комплекса белков МРТР с участием PKG.

Влияние скорости дыхания митохондрий на РС-индуцированное открытие МРТР и защитный эффект SNAP. Известно, что скорость продукции NO mtNOS экспоненциально зависит от величины $\Delta\Psi_m$ и максимальна в Состоянии 4 [17, 18]. Кроме того, хорошо известно, что вероятность открытия поры различными агентами сильно уменьшается при наличии аденилатов, гексокиназы и Mg^{2+} в среде инкубации [19, 20]. Последнее может быть связано со стабилизацией конформации элементов макрокомплекса МРТР, включая транслокатор аденилатов, АТФ-синтазу и др. В наших условиях, в присутствии избытка гексокиназы и глюкозы в среде, добавка 0.75 мМ ADP увеличивает скорость дыхания митохондрий от $\text{VO}_2 = 20-24$ нг-атом О/мин/мг (V_4 , Состояние 4, ADP = 0) до стационарных значений $\text{VO}_{2SS} = 70-77$ нг-атом О/мин/мг ($\text{VO}_2 = 80-90\%$ от скорости дыхания в Состоянии 3). Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что в митохондриях, находящихся в состоянии активного дыхания (VO_{2SS}), критические величины PC^* в контроле и в присутствии SNAP выше, чем в Состоянии 4 (V_4). Сравнение верхних кривых, представленных на рис. 2, показывает, что в митохондриях, находящихся в Состоянии 4 (верхняя линия на рис. 2а), 40 мкМ РС вызывает диссипацию $\Delta\Psi_m$, тогда как в состоянии с высокой скоростью дыхания (верхняя линия на рис. 2б), критическая концентрация PC^* превышает 60 мкМ. В присутствии 20 мкМ SNAP в Состоянии 4 величина PC^* увеличивается до 80 мкМ, в то время как при высокой скорости дыхания (VO_{2SS}) величина PC^* составляет 100 мкМ и выше (нижние линии на рис. 2а, 2б).

Диссипация $\Delta\Psi_m$, ингибирование дыхания и набухание митохондрий, вызываемые РС. Защитный эффект циклоспорина А. Преинкубация митохондрий с пируватом, *L*-глутаматом и низкими концентрациями РС (20 мкМ) повышает $\Delta\Psi_m$ и увеличивает стационарную скорость митохондриального дыхания на 35–40% по сравнению со значениями, достигаемыми при дыхании митохондрий в присутствии пирувата и *L*-глутамата ($\text{VO}_{2SS} = 85-88$ нг-атом О/мин/мг). Напротив, высокие дозы РС (выше 50 мкМ) вызывают быст-

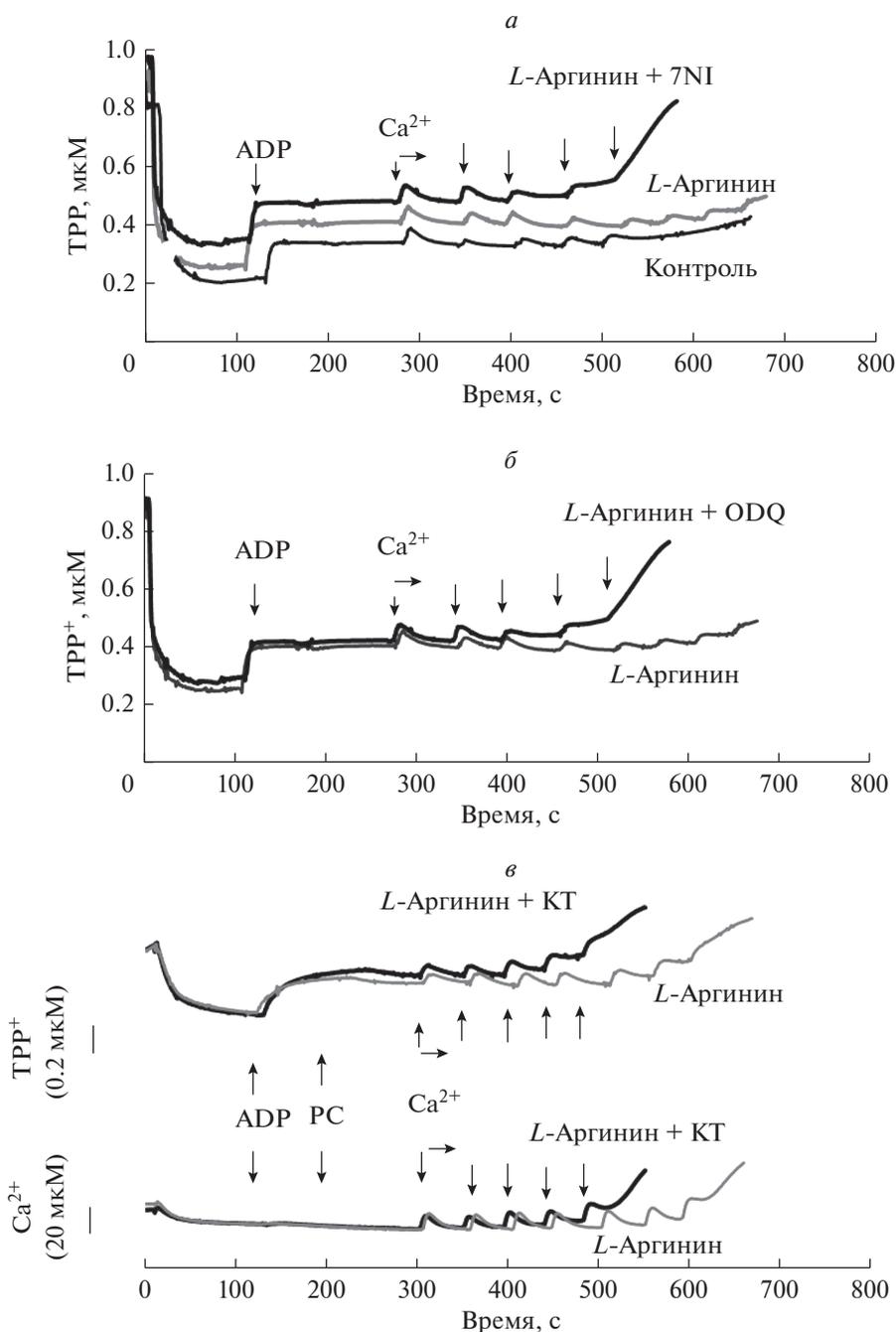


Рис. 1. Диссипация $\Delta\Psi_m$ и индукция МРТР ионами Ca^{2+} . Защитный эффект *L*-аргинина (300 мкМ) и его устранение ингибиторами белков системы mtNOS/GC/PKG-SS: 7NI (*a*, 100 мкМ), ODQ (*б*, 100 мкМ) и KT5823 (*в*, 1.5 мкМ, КТ), соответственно. Представлены репрезентативные эксперименты. Митохондрии инкубировали в открытой камере объемом 1 мл. Среда инкубации (см. Материалы и методы) включала 1 мМ пирувата, 10 мМ *L*-глутамата и гексокиназу. Добавки Ca^{2+} и РС (по 20 мкМ), а также ADP показаны стрелками.

рую диссипацию $\Delta\Psi_m$ увеличение $[\text{TPP}^+]$ и прогрессирующее угнетение дыхания. Этот процесс развивается вскоре после добавки ADP (рис. 3а, черные линии). Преинкубация митохондрий с CsA предотвращает падение $\Delta\Psi_m$, несмотря на сильное подавление дыхания (рис. 3а, серые линии). Помимо диссипации $\Delta\Psi_m$ и подавления ды-

хания, РС вызывает набухание митохондрий. Как показано на рис. 3б, низкие концентрации РС (20 мкМ) вызывают набухание митохондрий, которое характеризуется скоростью набухания $V_{\text{sw}} = 0.26 \Delta \text{ o.d./мин}$ (черная кривая). Преинкубация митохондрий с CsA (2 мкМ) предотвращает этот эффект. Вторая добавка 20 мкМ РС приво-

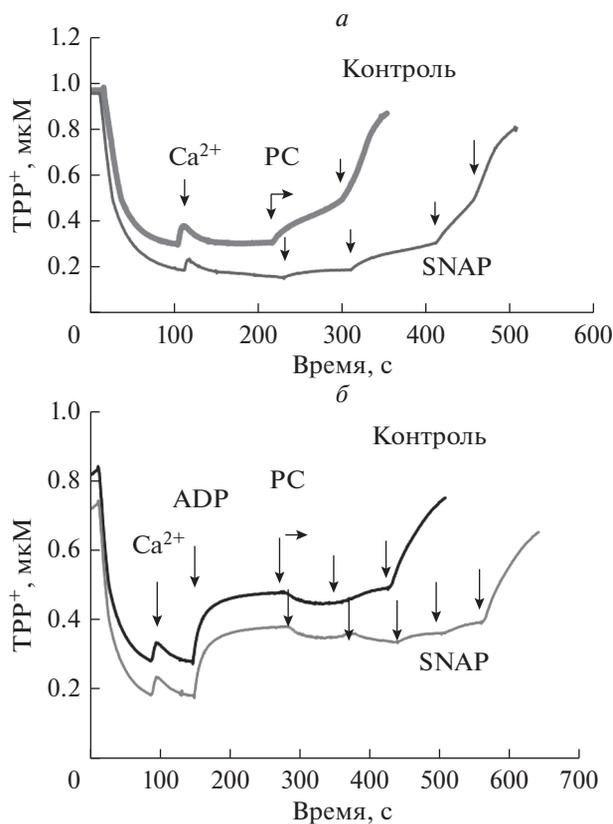


Рис. 2. Влияние скорости дыхания митохондрий на диссипацию $\Delta\Psi_m$ избытком PC и на защитный эффект SNAP. Представлены репрезентативные эксперименты. Инкубационная среда включала 10 мМ *L*-глутамата и 1 мМ пирувата, а также гексокиназу и глюкозу. Эксперименты, представленные на панели *a*, проведены в отсутствие ADP в среде (Состояние 4). На панели *b* высокая скорость дыхания ($VO_2 = 80\text{--}90\%$ от скорости дыхания в Состоянии 3) обеспечивалась добавками 0.75 мМ ADP. На панелях *a* и *b* черные (верхние) линии соответствуют контрольным экспериментам ($[SNAP] = 0$), а серые линии – опытам, в которых инкубационная среда содержала 20 мкМ SNAP. Добавки Ca^{2+} и PC (по 20 мкМ), а также ADP показаны стрелками.

дит к быстрому митохондриальному набуханию, характеризующемуся $V_{sw} = 2.4 \Delta \text{ o.d./мин}$ (черная кривая). Однако в этом случае CsA обеспечивает ограниченный защитный эффект, уменьшая V_{sw} в четыре раза до $0.57 \Delta \text{ o.d./мин}$ и не оказывая влияния на амплитуду набухания (серая кривая). Таким образом, наряду с кальцием PC является важным агентом, вызывающим индукцию МРТР.

Кальций и активные формы кислорода (АФК) обычно считаются ключевыми медиаторами, участвующими в индукции МРТР и гибели клеток [20, 21]. Однако ишемия/реперфузия и некоторые другие патологические процессы, помимо роста Ca^{2+} и АФК, характеризуются накоплением длинноцепочечных жирных кислот [22, 23] и их карнитиновых производных [23], которые окисляются в митохондриях в виде ацил-КоА. Хорошо известно, что длинноцепочечные ацил-КоА (C14 и выше) ингибируют различные NAD(P)H-зависимые дегидрогеназы [24]. Наши предварительные результаты показали, что PC индуцирует

CsA-зависимую диссипацию $\Delta\Psi_m$ в митохондриях печени [16]. Поэтому в настоящем исследовании для изучения влияния mtNOS/GC/PKG-SS на МРТР в качестве параметров “чувствительности” поры к токсинам были использованы величины CRC и PC*, определяемые при нагрузке митохондрий кальцием и PC.

Влияние модуляции активности mtNOS/GC/PKG-SS на PC*. Чтобы оценить статистическую достоверность полученных результатов, были определены средние величины PC* в сериях из четырех–шести экспериментов. Рассчитанные средние значения PC* представлены на рис. 4 в виде столбиков. Первый серый столбик соответствует контрольным экспериментам. Влияние SNAP и *L*-аргинина, а также ингибиторов 7-NI (100 мкМ), ODQ (100 мкМ), KT5823 (1.5 мкМ) и 1400W (100 нМ) на средние величины PC* показано на рис. 4. Видно, что увеличение концентрации SNAP до 100 мкМ (2 и 3 столбики) увеличивает критическое значение PC* до $109.2 \pm 8.1 \text{ мкМ}$,

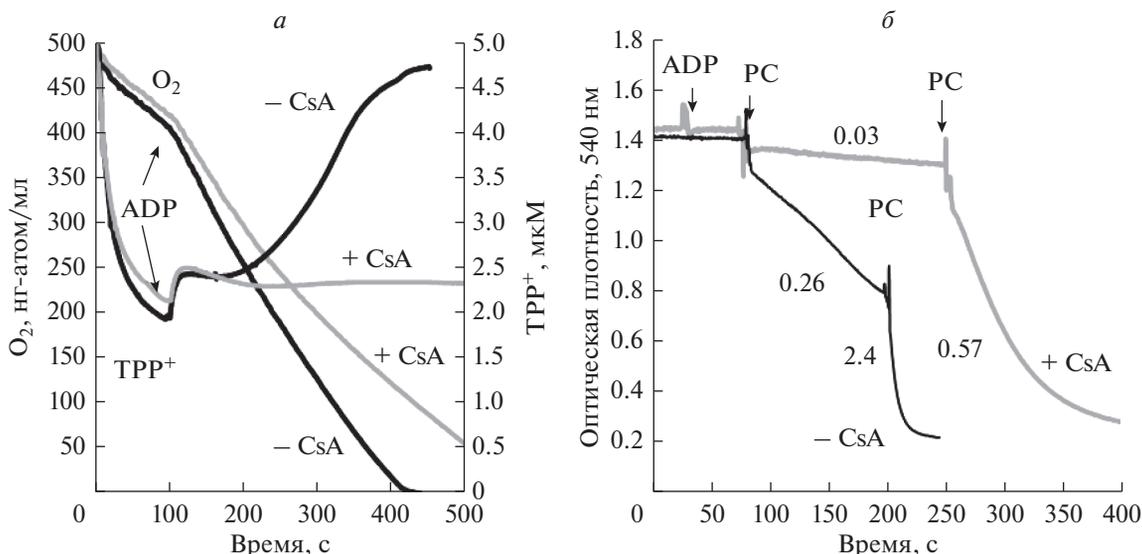


Рис. 3. Избыток PC вызывает диссипацию $\Delta\Psi_m$ и подавление дыхания (a), а также набухание митохондрий (б). Присутствие циклоспорина А (CsA, 1.5 мкМ) в среде препятствует диссипации $\Delta\Psi_m$, набуханию митохондрий и индукции поры (б). Представлены репрезентативные эксперименты. a – Влияние избытка PC (50 мкМ) и CsA (1.5 мкМ) на митохондриальное дыхание (линии O_2) и $\Delta\Psi_m$ (линии TPP^+). Инкубационная среда включала 10 мМ L-глутамата и 1 мМ пирувата. Митохондрии инкубировали с PC (черные линии) или с PC и CsA (1.5 мкМ, серые линии). Все остальные условия как на рис. 1. б – Набухание митохондрий, вызываемое добавлением PC в отсутствие (нижние черные линии) и в присутствии CsA (2 мкМ, верхние серые линии) в среде. Максимальные значения скорости набухания (V_{SW} , выраженные в изменениях ед. оптической плотности/мин; $V_{SW} = \Delta o.d./\text{мин}$) указаны на рисунке. 0.75 мМ ADP добавляли за 1 мин до первого введения PC. Инкубационная среда включала 5 мМ сукцината и 2 мкМ ротенона. Все остальные условия как на рис. 1.

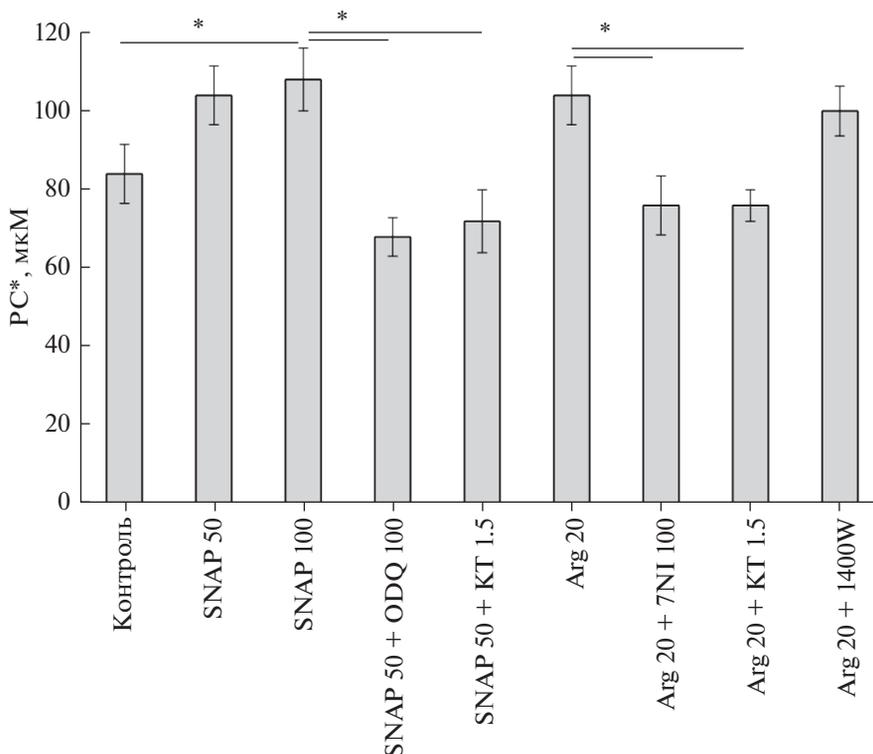


Рис. 4. Влияние модуляции активности mtNOS/GC/PKG-SS на величину PC^* . Столбики представляют средние значения величин $PC^* \pm S.E.M.$, полученные в 4–6 экспериментах при последовательных добавках 20 мкМ PC, подобно тому, как это показано на рис. 1 для Ca^{2+} . Инкубационная среда такая же, как и на рис. 1. 20 мкМ Ca^{2+} добавляли через 1 мин после активации дыхания 0.75 мМ ADP, затем митохондрии нагружали PC. Концентрации SNAP, L-аргинина (Arg), 7-NI, ODQ, KT5823 (KT) и 1400W приведены в мкМ. $n = 4$ (столбики 1–3), $n = 6$ (столбики 4–9). Линии над столбиками показывают сравнимые пары величин PC^* . * $p < 0.05$.

что на 28% выше величины РС* в контроле (84.3 ± 7.8 мкМ (1 столбик). Сходный защитный эффект вызывает преинкубация митохондрий с 20 мкМ L-аргинина (6 столбик).

Видно, что ингибиторы mtNOS/GC/PKG-SS 7-NI, ODQ и KT5823 устраняют защитные эффекты L-аргинина и SNAP, уменьшая критические (пороговые) концентрации РС*, необходимые для индукции поры (рис. 4, столбики 4, 5 и 7, 8), до величин ниже контрольных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основываясь на результатах, полученных с помощью ингибиторного анализа, можно предполагать участие митохондриальной mtNOS/GC/PKG-SS в регуляции МПТР. Следует отметить, что mtNOS/GC/PKG-SS нельзя рассматривать как избыточный элемент в многоуровневом контроле окислительного фосфорилирования и индукции МПТР. Будучи зависимой от кальция, эта сигнальная система может участвовать в функционировании нескольких петель обратной связи, две из которых направлены на активацию митохондриального дыхания и на уменьшение вероятности индукции МПТР. В этом случае митохондриальная PKG, наряду с цитозольной PKG1, может рассматриваться как конечный эффектор защиты, участвующий в контроле МПТР.

Вклад авторов: ВВД координировал проект и написал рукопись. НИФ и ЕВГ провели эксперименты, проанализировали и обсудили данные. НИФ приняла участие в доработке статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-01695 ВД).

Благодарности. Авторы благодарят М.А. Сиомову, М.Х. Галимову и А.И. Сергеева за техническую поддержку.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ghafourifar P., Schenk U., Klein S.D., Richter C. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.* **274** (44), 31185–31188. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31185>
- Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. 2000. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **275** (27), 20474–20479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M00.10.77200>
- Dedkova E.N., Blatter L.A. 2005. Modulation of mitochondrial Ca^{2+} by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289** (4), C836–C845. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00011.2005>
- Dedkova E.N., Blatter L.A. 2009. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J. Physiol.* **587** (4), 851–872. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165423>
- Davidson S.M., Duchon M.R. 2006. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Res.* **71** (1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcardiores.2006.01.019>
- Piantadosi C.A. 2012. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1820** (6), 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.008>
- Chang A.H., Sancheti H., Garcia J., Kaplowitz N., Cadenas E., Han D. 2014. Respiratory substrates regulate S-nitrosylation of mitochondrial proteins through a thiol-dependent pathway. *Chem. Res. Toxicol.* **27** (5), 794–804. <https://doi.org/10.1021/tx400462r>
- Queiroga C.S., Almeida A.S., Martel C., Brenner C., Alves P.M., Vieira H.L. 2010. Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **285** (22), 17077–17088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065052>
- Yap L.P., Garcia J.V., Han D.S., Cadenas E. 2010. Role of nitric oxide-mediated glutathionylation in neuronal function: potential regulation of energy utilization. *Biochem. J.* **428** (1), 85–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20100164>
- Mailloux R.J., Willmore W.G. 2014. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 68. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00068>
- Mailloux R.J., Treberg J.R. 2016. Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. *Redox Biol.* **8**, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.010>
- Seya K., Ono K., Fujisawa S., Okumura K., Motomura S., Furukawa K. 2013. Cytosolic Ca^{2+} -induced apoptosis in rat cardiomyocytes via mitochondrial NO-cGMP-protein kinase G pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344** (1), 77–84. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.198176>
- Seya K., Motomura S., Furukawa K. 2007. Cardiac mitochondrial cGMP stimulates cytochrome c release. *Clin. Sci. (Lond.)*. **112** (2), 113–121. <https://doi.org/10.1042/CS20060144>
- Acin-Perez R., Russwurm M., Günnewig K., Gertz M., Zoidl G., Ramos L., Buck J., Levin L.R., Rassow J., Manfredi G., Steegborn C. 2011. A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration. *J. Biol. Chem.* **286** (35), 30423–30432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266379>
- Dynn timer V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2019. Implication of mitochondrial NO/cGMP/PKG signaling system in the activation and inhibition of mitochondrial

- respiration by L-arginine and NO donors. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. **13** (4), 334–340.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040056>
16. Grishina E.V., Galimova M.H., Djafarov R.H., Sergeev A.I., Fedotcheva N.I., Dynnik V.V. 2016. Induction of cyclosporine-sensitive mitochondrial permeability transition pore by substrates forming acetyl-CoA under normal conditions and in type 2 diabetes. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A. Membrane and Cell Biology*. **10** (1), 11–18.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050049>
 17. Boveris A., Valdez L.B., Zaobornyj T., Bustamante J. 2006. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim. Biophys. Acta*. **1757** (5–6), 535–542.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.02.010>
 18. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. 2006. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1757** (3), 166–172.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.02.013>
 19. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. 2018. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*. **70**, 56–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>
 20. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. **1787**, 1395–1401.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.009>
 21. Halestrap A.P. 2010. A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem. Soc. Trans.* **38** (4), 841–860.
<https://doi.org/10.1042/BST0380841>
 22. Yamada K.A., McHowat J., Yan G.X., Donahue K., Peirick J., Cleber A.G. Corr P.B. 1994. Cellular uncoupling induced by accumulation of long-chain acylcarnitine during ischemia. *Circ. Res.* **74** (1), 83–95.
<https://doi.org/10.1161/01.res.74.183>
 23. De Windt L.J., Willems J., Roemen T.H., Coumans W.A., Reneman R.S., Van Den Vusse G.J., Bilsen M.V. 2001. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: Membrane damage and type IIA phospholipase A2. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280** (6), H2572–H2580.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2572>
 24. Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* **16** (7), 795–803.

Impact of L-Arginine and Nitric Oxide Donors on the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Calcium Ions and Palmitoylcarnitine. Possible Involvement of Mitochondrial NO/cGMP/PKG Signal System

V. V. Dynnik^{1, *}, E. V. Grishina¹, N. I. Fedotcheva¹

¹*Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: dynnik@rambler.ru

The work is devoted to the study of the impact of L-arginine and nitric oxide donor SNAP on the induction of cyclosporin A-dependent mitochondrial permeability transition pore (MPTP) evoked by the excess of Ca²⁺ or D,L-palmitoylcarnitine (PC). We analyzed a possible involvement of mitochondrial NO-dependent signaling system in the regulation of MPTP. This system includes NO synthase (mtNOS), guanylate cyclase (GC), and cGMP-dependent protein kinase G (PKG) (mtNOS/GC/PKG-SS). Experiments were performed on isolated rat liver mitochondria with application of the inhibitors of NOS, GC, and PKG. The results showed that L-arginine and SNAP exert concentration-dependent effects on the MPTP opening induced by Ca²⁺ or PC excess. At low concentrations (5–100 μM), L-arginine and SNAP exerted protective effects by increasing the mitochondrial calcium retention capacity (CRC) and critical (threshold) concentration of PC* required for the MPTP opening. At high concentrations, L-arginine and NO donors produced opposite effects, by inhibiting respiration and promoting the pore opening. Inhibitors of NOS, GC, and PKG eliminated protection observed at low concentrations of L-arginine and SNAP. Application of a specific inhibitor of inducible NOS (W1400) did not cause any effect, which indicates that this calcium-independent enzyme is not involved in the MPTP control in the applied experimental conditions. These results suggest that calcium-dependent mitochondrial mtNOS/GC/PKG-SS may be involved in the MPTP control by increasing CRC and PC* values. At high concentrations of L-arginine or SNAP, the NO excess overcomes the protecting action of mtPKG and promotes the pore opening.

Keywords: L-arginine, nitric oxide donors, mitochondrial NO synthase, guanylate cyclase, protein kinase G, mitochondrial respiration, permeability transition pore

УДК 577.352.465

IP₃-РЕЦЕПТОР ВТОРОГО ТИПА ЯВЛЯЕТСЯ ДОМИНАНТНОЙ ИЗОФОРМОЙ В КЛЕТКАХ НЕК-293

© 2020 г. М. Ф. Быстрова^а, О. А. Рогачевская^а, Е. Н. Кочкина^а,
Е. Е. Копылова^а, Н. П. Коваленко^а, С. С. Колесников^а, *

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Московская обл., Пущино, 142290 Россия

*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

После доработки 13.07.2020 г.

Принята к публикации 17.07.2020 г.

Многие первичные медиаторы способны инициировать внутриклеточную Ca²⁺-сигнализацию, стимулируя поверхностные рецепторы клеток, сопряженные с фосфоинозитидным каскадом. Ключевыми в этом процессе являются продукция вторичного медиатора IP₃, катализируемая фосфолипазой C, и IP₃-зависимый выброс депонированного Ca²⁺. Регуляторная роль IP₃ сводится к активации IP₃-рецепторов, являющихся лиганд-управляемыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах. Геномы позвоночных содержат три гена, кодирующие субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3. В разных клетках функционируют различные комбинации IP₃-рецепторов, активность которых находится под контролем различных механизмов, что определяет индивидуальные особенности IP₃-зависимых Ca²⁺-сигналов и специфическую роль IP₃-рецепторов в физиологии клеток данного типа. Клетки линии НЕК-293 повсеместно используются как модельная гетерологическая система для экспрессии рекомбинантных белков и исследования рецепторных систем и механизмов внутриклеточной сигнализации. В этих клетках функционируют все три изоформы IP₃-рецепторов. Для анализа связи активности IP₃-рецепторов и различных аспектов внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации определенные перспективы открывает создание линий клеток, в которых подтипы IP₃R-рецепторов функционируют в различных комбинациях. В данной работе в клетках НЕК-293 были последовательно инактивированы гены *IP₃R1* и *IP₃R3* с использованием системы CRISPR/Cas9 и была получена моноклональная линия клеток НЕК-293IP₃R2^{+/+}, в которой функционален только IP₃R2. Сравнительный анализ внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации, инициируемой ацетилхолином в клетках НЕК-293 и клетках НЕК-293IP₃R2^{+/+}, свидетельствовал о том, что генетическая инактивация генов *IP₃R1* и *IP₃R3* не привела к изменению параметров Ca²⁺-ответов на ацетилхолин. В целом, полученные данные указывают на то, что в клетках НЕК-293 ключевой вклад в генерацию Ca²⁺-ответов на агонисты вносит IP₃-рецептор второго типа.

Ключевые слова: внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, IP₃-рецепторы, система CRISPR/Cas9, клеточные моноклоны

DOI: 10.31857/S0233475520060031

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация является одним из ключевых процессов клеточной физиологии, который вовлечен в регуляцию самых разнообразных клеточных функций, включая подвижность, дифференцировку и пролиферацию, экспрессию генов, синаптическую передачу, трансэпителиальный транспорт, мышечную сократимость и апоптоз [1]. Многие рецепторы, функционирующие на клеточной поверхности, сопряжены с фосфоинозитидным каскадом и при активации агонистами способны инициировать мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺. Ключевым

этапом в этом процессе является продукция вторичного медиатора IP₃, катализируемая фосфолипазой C, и IP₃-зависимый выброс депонированного Ca²⁺ из Ca²⁺-депо, в роли которого выступает специализированная часть эндоплазматического ретикулума (ЭР), примыкающая к плазмолемме [2, 3]. Регуляторная роль IP₃ сводится к активации IP₃-рецепторов, которые фактически являются лиганд-управляемыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, функционирующими в ЭР и некоторых других внутриклеточных органеллах [4]. Помимо IP₃ цитозольный Ca²⁺ также является ключевым регулятором IP₃-рецепторов, оказывая при

относительно небольших концентрациях стимулирующее воздействие и ингибируя их активность при микромолярных концентрациях [4, 5]. Связывание Ca²⁺ с высокоаффинным активаторным сайтом IP₃-рецептора приводит к существенному росту вероятности открытого состояния этого Ca²⁺-канала [6], так что ионы Ca²⁺, высвободившиеся из Ca²⁺-депо через IP₃-рецептор, потенцируют его активность. Эта и аналогичная положительная обратная связь в случае риаинодиновых рецепторов лежат в основе Ca²⁺-индуцированного выброса депонированного Ca²⁺ (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, CICR) – регенеративного процесса, который детерминирует многие аспекты внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации [2, 7].

Геномы позвоночных содержат три гена, которые кодируют субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, которые способны формировать гомо- и гетеротетрамерные каналы [5], хотя ряд данных указывает на то, что доля гетеротетрамеров в клетках невелика [8]. Несмотря на высокую степень гомологии первичных последовательностей IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, они заметно отличаются по своим биофизическим свойствам и характеризуются разными регуляторными механизмами и чувствительностью к IP₃ и Ca²⁺ [4, 5]. Так, аффинности связывания IP₃ описываются рядом IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3 [9]. В разных клетках IP₃-рецепторы функционируют в различных комбинациях, и их индивидуальная активность находится под контролем специфических механизмов, что определяет характерные особенности IP₃-зависимой Ca²⁺-сигнализации и специфическую роль IP₃-рецепторов в физиологии клеток данного типа и биологической ткани в целом [4, 5]. Так, IP₃R1 играет существенную роль в Ca²⁺-сигнализации в ооцитах, и в его отсутствие процессы оплодотворения и развития протекают с нарушениями [10, 11]. Атаксия у млекопитающих ассоциируется с мутациями IP₃R1 [12, 13]. Основной изоформой в кардиомиоцитах является IP₃R2, и его аномально высокая экспрессия в этих клетках ассоциируется с сердечной гипертрофией [14]. IP₃R3 играет ключевую роль во вкусовой трансдукции, и инактивация гена IP₃R3 приводит к потере чувствительности к горьким и сладким стимулам и аминокислотам [15]. В ряде клеток было показано, что IP₃R3 локализован в мембранных контактах эндоплазматического ретикулума и митохондрий (mitochondria-associated membranes, MAMs); такая локализация указывает на его участие в формировании митохондриального Ca²⁺-сигнала, который может запустить апоптоз [16, 17].

Клетки линии НЕК-293 повсеместно используются как модельная гетерологическая система

для экспрессии рекомбинантных белков и для исследований рецепторных систем, механизмов внутриклеточной сигнализации и ионного транспорта. В этих клетках функционируют все три изоформы IP₃-рецепторов [18]. Для анализа роли IP₃-рецепторов в генерации различных форм Ca²⁺-сигналов, индуцированных агонистами рецепторов, целесообразно использовать линии клеток, в которых IP₃R-изоформы функционируют в различных комбинациях. В данной работе мы последовательно инактивировали гены IP₃R1 и IP₃R3 в клетках НЕК-293, используя систему CRISPR/Cas9. В результате была получена моноклональная линия клеток, в которых функционален только IP₃R2-подтип, и был проведен функциональный анализ этих генетически модифицированных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Редактирование генов IP₃-рецепторов

1.1. Конструкция для направленного редактирования гена IP₃R3. Экспрессионная кассета для внесения двухнитевого разрыва в выбранный участок гена IP₃R3 сконструирована с использованием плазмиды pGuide-it-tdTomato и реагентов набора Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara). Для конструирования плазмиды pGuide-it-tdTomato/IP₃R3 были синтезированы два взаимно-комплементарных олигонуклеотида 5'-ccggATGTCCAGCTTTCTTCACAT-3' и 5'-aaacATGTGAAGAAAGCTGGACAT-3'. Олигонуклеотиды содержали на 5'-концах адаптерные последовательности для последующего клонирования в вектор (подчеркнуты). Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью T4-полинуклеотидкиназы, из набора Anza™ T4 PNK kit (Invitrogen). Реакцию отжига фосфорилированных олигонуклеотидов проводили в буфере Annealing Buffer из набора Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученный дуплекс олигонуклеотидов клонировали в линейаризованную плазмиду pGuide-it Vector по липким концам адаптерных последовательностей. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки Stellar Competent Cells (Takara). Наличие вставки в полученных плазмидных клонах и правильность полученной конструкции подтверждались секвенированием.

1.2. Конструкция для направленного редактирования IP₃R1. Для выключения гена IP₃R1 использовали вектор AIO-GFP, обеспечивающий экспрессию Cas9-D10A никазы, слитой с EGFP, и двух РНК-гидов, содержащих последовательности смыслового и антисмыслового спейсеров [19]. Вектор AIO-GFP был предоставлен Steve Jackson (Addgene plasmid # 74119; <http://n2t.net/addgene:74119>;

RRID:Addgene_74119). Для конструирования плазмиды AIO-GFP/IP₃R1 были синтезированы две пары взаимно-комплементарных олигонуклеотидов: 5'-accgAAATGGATTATAGCACCT-3' и 5'-aaacAGGTGСТААААТССАТТТ-3', соответствующие РНК-гиду со смысловым спейсером, и 5'-accgAACAAATGTCTCCAATATGT-3' и 5'-aaacACATATTGGAGACATTTGTT-3', соответствующие РНК-гиду с антисмысловым спейсером. В вектор AIO-GFP последовательно клонировали сначала антисмысловый дуплекс фосфорилированных олигонуклеотидов по сайту BbsI, затем смысловый дуплекс по сайту BsaI. Наличие вставок в векторе AIO-GFP/IP₃R1 подтверждалось секвенированием.

1.3. Выявление клеточных моноклонов с биаллельными мутациями целевых генов. Геномная ДНК индивидуальных клеточных моноклонов использовалась в качестве матрицы для ПЦР-амплификации фрагмента целевого гена, предназначенного для редактирования, с праймерами AAGTCAGACTTTCCAGGTAAC и AGTGAATAAAGGCACTCTC для IP₃R1 (ожидаемый размер ампликона 769 п.н.) и с праймерами GGATTTGCATGTGTGTGGTG и СТАCTGAAGCTGGGAAGAACAGG для IP₃R3 (ожидаемый размер ампликона 962 п.н.). Амплифицированный участок геномной ДНК, содержащий предполагаемую мутацию, подвергался гидролизу комплексов гидРНК/Cas9 *in vitro* с использованием реагентов набора Guide-it™ Indel Identification Kit (Takara). Синтез РНК-гидов методом транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы фага T7 проводили с использованием реактивов набора Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara). Для получения ДНК матриц, содержащих последовательность промотора T7 РНК-полимеразы и спейсерные последовательности, были синтезированы олигонуклеотиды ССТСТААТАСГАСТСАСТАТАГГАААТGGATTATAGCACCTGTTТААГАГСТАТГС для IP₃R1 и ССТСТААТАСГАСТСАСТАТАГГААТGGTCCAGCTTTCTTCACATGTTТААГАГСТАТГС для IP₃R3 (последовательности спейсеров РНК-гидов в составе олигонуклеотидов подчеркнуты). Фрагменты геномной ДНК клонов с выявленными в реакции *in vitro* биаллельными мутациями клонировались в вектор pJET1.2/blunt по тупым концам. Для выявления инделей 10 индивидуальных плазмидных клонов каждой клонотекы были секвенированы.

2. Обратная транскрипция с ПЦР в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов семейства IP₃R-рецепторов оценивали методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реаль-

ного времени (ОТ-ПЦР-РВ). РНК из клеток НЕК-293 выделяли с помощью колонок и реагентов набора innuPREP DNA/RNA Mini Kit (Analytik Jena). Для удаления следов геномной ДНК и проведения реакции обратной транскрипции с отрицательным контролем использовали реагенты набора SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific). ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием прибора ДТлайт (“ДНК-Технология”, Россия) и готовой реакционной смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Для проведения реакции ПЦР-РВ использовались следующие ген-специфические праймеры: GTCGGAATTAAGGATCAGATGAC и AAGTGCAAAATCAGGTGCTTTC для IP₃R1, AAAGACCCAACAGAATCACTG и ATTCTTCTTTGTTCTGTCTCATCTG для IP₃R2, GACATGCTTCATCTGTGGTC и TTTCCGCTGCTCCGTCATC для IP₃R3. Специфичность амплификации оценивали с помощью кривых плавления. В качестве референсного гена использовали ген бета-актина. Уровень экспрессии генов рассчитывали согласно стандартному методу 2^{-ΔCt}.

3. Получение моноклональных сублиний клеток НЕК-293 с модифицированным геномом

Трансфекцию клеток НЕК-293 проводили с использованием Lipofectamin 3000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Через 72 ч после трансфекции клетки анализировались по интенсивности флуоресценции с помощью сортера клеток FACSAria SORP (BD Biosciences). Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции, переносили их по одной в лунку 96-луночного планшета, и по достижении 50–70% конфлюентности клеточные клоны переносили в лунки с большей ростовой поверхностью (последовательно в 24-, 12- и 6-луночные планшеты). После достижения монослоя в лунке 6-луночного планшета клетки использовались для генетического анализа. Клеточные моноклоны с выявленными биаллельными мутациями целевого гена культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в воздухе при 37°C. Перед экспериментом клетки обрабатывали последовательно раствором Версена и 0.25% раствора трипсина и ресуспендировали в полной ростовой среде. По этому протоколу с использованием плазмиды AIO-GFP/IP₃R1 сначала был получен клеточный моноклон с биаллельными мутация-

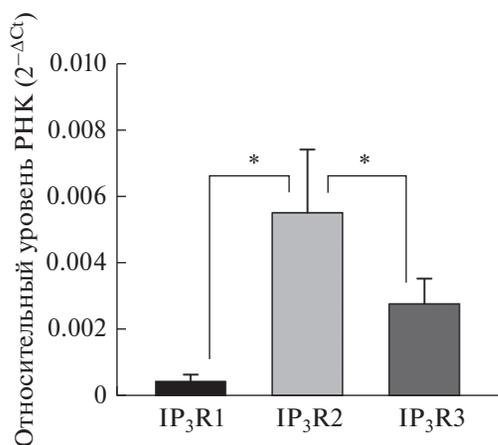


Рис. 1. Относительный уровень транскриптов генов *IP₃R1*, *IP₃R2* и *IP₃R3* в клетках HEK-293. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, полученные усреднением результатов четырех независимых экспериментов. Ген бета-актина использовался в качестве референсного. Уровень экспрессии генов рассчитывали согласно стандартному методу $2^{-\Delta C_t}$. Звездочками обозначены статистически значимые различия по Стьюденту ($p < 0.05$).

ми *IP₃R1*, который затем был трансфицирован плазмидой pGuide-it-tdTomato/*IP₃R3* с последующей селекцией и выявлением клеточного моноклона с биаллельными мутациями *IP₃R3*.

4. Микрофотометрия

Для анализа функциональных последствий инактивации генов IP₃-рецепторов проводился анализ агонист-зависимой Ca²⁺-сигнализации в модифицированных клетках HEK-293. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Затем клетки инкубировались в присутствии проникающего агента Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, США) в течение 20–30 мин, что обеспечивало загрузку клеток Ca²⁺-зондом Fluo-4. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgSO₄ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10. Бескальцевый раствор содержал 100 мкМ EGTA вместо 2 мМ CaCl₂. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20 \times /0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток поочередно возбуждали в диапазоне 480 \pm 105 нм, эмиссию регистрировали в областях 525 \pm 25 нм. Изменение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F_0 - F$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений проводили с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

ности флуоресценции $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F_0 - F$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений проводили с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспрессионный анализ

Как уже упоминалось выше, в клетках HEK-293 (human embryonic kidney) функционируют все три IP₃-рецептора человека [18]. С целью оценки относительного уровня экспрессии генов IP₃-рецепторов в образцах РНК, выделенной из клеток HEK-293, проводилась ОТ-ПЦР-РВ с использованием ген-специфических праймеров. Оказалось, что на уровне клеточной популяции уровень транскриптов гена *IP₃R2* превышал уровень транскриптов *IP₃R1* и *IP₃R3* в среднем на порядок и вдвое, соответственно (рис. 1). Это свидетельствовало о том, что в клетках HEK-293 IP₃R2 может вносить ключевой вклад в агонист-индуцированную Ca²⁺-сигнализацию. Поскольку до сих пор не разработаны изоформ-специфичные ингибиторы IP₃-рецепторов, для выяснения их роли в клеточной физиологии мы использовали технологию геномного редактирования CRISPR/ Cas9. Учитывая данные транскриптомного анализа, показывающего повышенный уровень экспрессии *IP₃R2* по сравнению с двумя другими генами, нами была получена стабильная клеточная сублиния с инактивированными генами *IP₃R1* и *IP₃R3* для проведения сравнительного функционального анализа с исходными клетками HEK-293 дикого типа (wild type, WT).

2. Получение клеточных моноклонов, экспрессирующих только IP₃R2-рецептор

Стабильная клеточная линия HEK293/ Δ IP₃R1/ Δ IP₃R3 с нокаутом генов *IP₃R1* и *IP₃R3* создавалась в два этапа. Сначала был получен клеточный моноклон HEK-293/ Δ IP₃R1 с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания *IP₃R1* человека, затем в этом моноклоне с использованием системы CRISPR/ Cas9 был инактивирован ген *IP₃R3*. Для редактирования *IP₃R1* человека мы использовали мутантный вариант Cas9-D10A с низкой активностью, применение которого способствует значительному снижению нецелевых эффектов по сравнению с действием нуклеазы Cas9. Целевое действие Cas9-D10A, приводящее к двухнитевому разрыву ДНК, обеспечивается кооперацией двух направляющих sgРНК. Экспрессионная кассета конструировалась на основе плазмиды

CCATCATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCGGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTGG
GGATGTATAACCTCTGTAAACAAGAGACATGCGCCTCCCTAGCTGTTTACCTAAATAATCGTGGAACC

Рис. 2. Положение последовательностей PAM (выделены красным) с протоспейсерами (подчеркнуты) на смысловой и антисмысловой цепях ДНК выбранного участка *IP₃R1*.

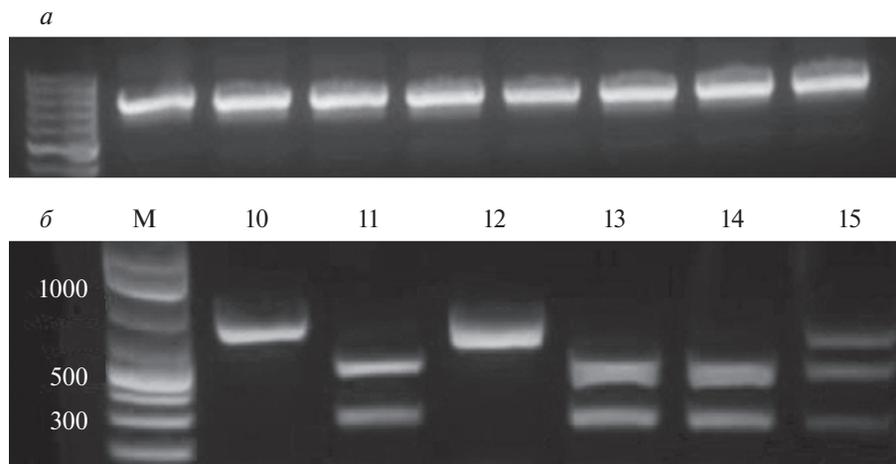


Рис. 3. ПЦР-амплификация фрагмента геномной ДНК, содержащей предположительный сайт мутации *IP₃R1*, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК индивидуальных клеточных моноклонов (а). Примеры гидролиза *in vitro* комплексом Cas9/sgRNA фрагментов геномной ДНК, амплифицированных из индивидуальных клеточных моноклонов 10–15 (б).

AIO-GFP, кодирующей никазу Cas9-D10A, сливную с зеленым флуоресцентным белком, и пару направляющих sgРНК под контролем промоторов U6 [19]. Потенциальные протоспейсеры для действия CRISPR/Cas9-10A, состоящие из 20 нуклеотидов и содержащие на 3'-конце мотив – NGG, были выбраны в третьем экзоне гена *IP₃R1* справа от старт-кодона (рис. 2).

Сконструированную плазмиду AIO-GFP/*IP₃R1* использовали для трансфекции клеток НЕК-293 с последующей селекцией клеточных моноклонов. Из индивидуальных клеточных моноклонов была выделена геномная ДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с ген-специфическими праймерами, фланкирующими предположительный сайт мутации (рис. 3а).

Следующим этапом работы было выявление моноклонов с моноаллельными и биаллельными мутациями, проведенное в модели *in vitro* с помощью комплекса Cas9-sgRNA. В этой модели для специфического гидролиза амплифицированных фрагментов геномной ДНК индивидуальных моноклонов использовался коммерчески доступный фермент нуклеаза Cas9 и синтезированная нами sgRNA. Далее для каждого индивидуально моноклона была поставлена реакция гидролиза амплифицированных с геномной ДНК фрагментов *IP₃R1* в системе Cas9-sgRNA *in vitro*. На рис. 3б показаны результаты детекции типа мута-

ций в шести моноклонах НЕК293/*ΔIP₃R1*. Биаллельные мутации содержат моноклоны 10 и 12, моноаллельные – 15, моноклоны 11, 13 и 14 содержат ДНК дикого типа. Генетические изменения в нокаутных субклинах подтвердились секвенированием целевого участка *IP₃R1*. По результатам секвенирования для дальнейшей работы был выбран клеточный моноклон со следующими биаллельными мутациями *IP₃R1*. Первая мутация состоит из делеции 48 пар нуклеотидов, приводящей к смещению открытой рамки считывания и изменению первичной последовательности *IP₃R1*-рецептора после 11-й аминокислоты. Вторая мутация представляет собой делецию 35 пар нуклеотидов, приводящую к смещению открытой рамки считывания и появлению стоп-кодона после 21-й аминокислоты (рис. 4а).

Для редактирования *IP₃R3* использовался вектор pGuide-it-tdTomato (Takara), кодирующий синтез sgRNA под управлением U6 промотора, нуклеазу Cas9 и красный флуоресцентный белок tdTomato. При конструировании плазмиды на участке вблизи старт-кодона *IP₃R3* в последовательности первого экзона был выявлен потенциальный протоспейсер для действия CRISPR/Cas9, содержащий с 3'-конца мотив PAM – CGG (ATGTCCAGCTTTCTTCACATCGG). Полученной плазмидой pGuide-it-tdTomato/*IP₃R3*, кодирующей элементы системы CRISPR/Cas9, трансфицировались клетки субклина с нокаути-

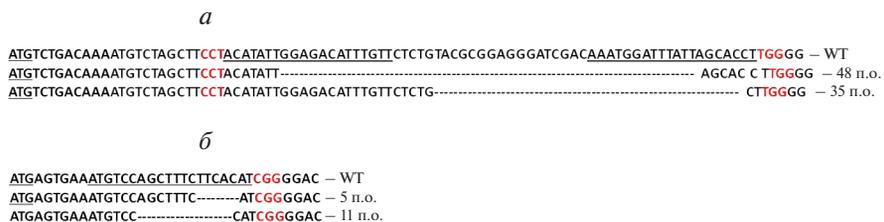


Рис. 4. Биаллельные делеции различной длины, выявленные в целевом участке *IP₃R1* (*a*). Области РАМ выделены красным, АТG-кодон и положение протоспейсера подчеркнуты. *б* – Биаллельные делеции различной длины в целевом участке *IP₃R3*. АТG-кодон и положение протоспейсера подчеркнуты.

рованным *IP₃R1*. Выявление мутаций *IP₃R3* в индивидуальных клеточных моноклонах проводили по тому же протоколу, что был использован при получении НЕК293/ Δ *IP₃R1*. Был получен клеточный моноклон с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания *IP₃R3* (рис. 4б). В результате первой мутации от первичной последовательности рецептора остается только 7 аминокислот, а в результате второй – только 5 аминокислот.

Таким образом, с помощью технологии CRISPR/Cas9 получена стабильная линия клеток НЕК293/ Δ *IP₃R1*/ Δ *IP₃R3* с биаллельными мутациями генов *IP₃R1* и *IP₃R3*, приводящими к их инактивации, при сохранении функционального гена *IP₃R2*. Для этой линии ниже используется термин НЕК-293IP₃R2⁺⁺.

3. Физиологические эксперименты

Далее проводился сравнительный функциональный анализ клеток НЕК-293WT и НЕК-293IP₃R2⁺⁺ с использованием микрофотометрии (Ca²⁺ imaging) и Ca²⁺-зонда Fluo-4. В типичном эксперименте в фотометрической камере находилось 100–120 клеток, загруженных Fluo-4, и осуществлялся мониторинг Fluo-4-индуцированной флуоресценции каждой клетки. Функциональные последствия инактивации генов *IP₃R1* и *IP₃R3* оценивались по способности клеток отвечать на ацетилхолин (АCh), который при достаточной дозе стимулирует Ca²⁺-сигнализацию в большинстве (70–80%) клеток НЕК-293WT. Следует отметить, что Ca²⁺-ответы клеток НЕК-293WT на АCh слабо зависели от внеклеточного Ca²⁺ и подавлялись ингибитором фосфолипазы С U73122, но не его неактивным аналогом U73343 (рис. 5а). Это свидетельствовало о незначительном вкладе никотиновых рецепторов в АCh-зависимые Ca²⁺-сигналы, которые, очевидно, генерировались в клетках НЕК-293WT за счет стимуляции мускариновых рецепторов, сопряженных G-белками с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией депонированного Ca²⁺. Примечательной особен-

ностью ответов клеток НЕК-293WT на АCh было то, что кратковременные последовательные аппликации агониста в увеличивающихся дозах либо не вызывали мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺, либо инициировали импульсное повышение Ca²⁺ практически до одной и той же величины при разных концентрациях выше пороговой (рис. 5б, верхняя кривая). При относительно малых концентрациях АCh генерировались гладкие одиночные Ca²⁺ пики, в то время как при увеличении дозы клеточные ответы носили осцилляторный характер (рис. 5б, верхняя кривая). В этом отношении генетически модифицированные клетки НЕК-293IP₃R2⁺⁺ фактически не отличались от клеток НЕК-293WT (рис. 5б, нижняя кривая). Такой характер ответов “все или ничего” на АCh и их рандаун (rundown), наблюдавшийся при длительных регистрациях у некоторых клеток, делали невозможным анализ дозозависимости величины ответов. Хотя частота осцилляций и глубина модуляции Ca²⁺-ответов в определенной степени зависели от концентрации АCh (рис. 5б), разброс этих параметров от клетки к клетке был слишком велик, чтобы использовать их в качестве параметров, характеризующих клеточную популяцию.

В силу сказанного выше мы охарактеризовали количественно дозозависимость клеточных ответов, используя популяционный параметр – фракцию клеток в популяции, способных генерировать Ca²⁺-ответ на АCh при данной концентрации. Клетки НЕК-293WT стимулировались АCh в диапазоне концентраций 125 нМ – 5 мкМ, где 125 нМ – это примерно пороговая концентрация для самых чувствительных клеток. Для клеток НЕК-293IP₃R2⁺⁺ использовалась область 125 нМ – 1 мкМ. В общей сложности мы проанализировали восемь клеточных популяций НЕК-293WT и изучили Ca²⁺-ответы 917 клеток. Для каждой популяции определялась фракция клеток, способных отвечать на агонист, концентрация которого варьировалась, и затем определялась средняя величина и стандартное отклонение по восьми популяциям. Соответствующая усредненная дозозависимость представлена на рис. 5в, светлые

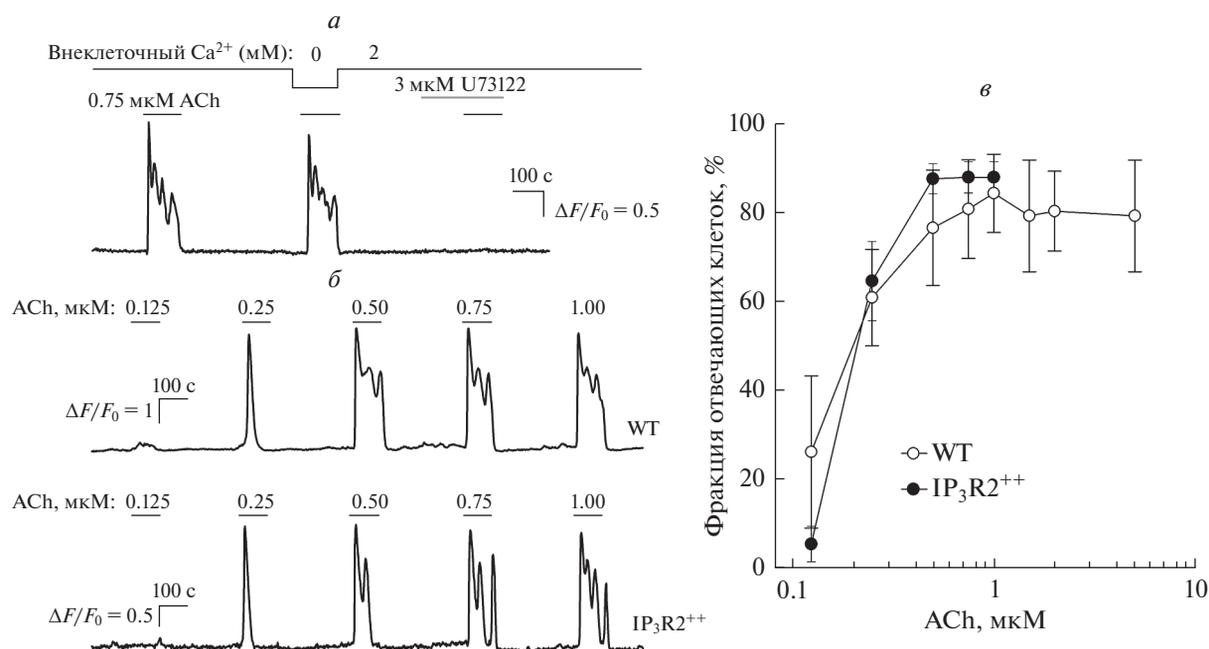


Рис. 5. Ca^{2+} -ответы клеток на ACh. *a* – Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в клетках HEK-293WT ($n = 53$), содержащих Fluo-4 (репрезентативный эксперимент; $n = 53$), в контроле, при удалении внеклеточного Ca^{2+} и в присутствии ингибитора фосфолипазы C U73122. *б* – Ответы клетки HEK-293WT (верхняя кривая) и HEK-293IP₃R2⁺⁺ (нижняя кривая) на ACh, апплицированный в разных дозах, как указано. *в* – Фракция клеток, генерирующих Ca^{2+} -ответы на ACh при данной концентрации, для популяции HEK-293WT (○) и HEK-293IP₃R2⁺⁺ (●). Моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Относительную флуоресценцию Ca^{2+} -индикаторов оценивали как $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F – текущая интенсивность флуоресценции, F_0 – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

кружочки. Аналогичные эксперименты были проведены с клетками HEK-293IP₃R2⁺⁺, в которых были изучены 296 клеток в четырех популяциях. Полученная для этих клеток дозозависимость представлена черными кружочками на рис. 5в. Оказалось, что в популяциях HEK-293WT и HEK-293IP₃R2⁺⁺ фракции клеток, в которых ACh вызывал детектируемую мобилизацию Ca^{2+} при использованных дозах, были статистически неотличимы, за исключением точки 125 нМ.

Таким образом, в согласии с данными ПЦР-РВ (рис. 1), которые предполагали заметно меньший уровень экспрессии IP₃R1 и IP₃R3 по сравнению с IP₃R2, а значит, меньшую функциональную значимость в клетках HEK-293WT, последнее прямо следовало из результатов функционального анализа клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺. Оказалось, что инактивация генов IP₃R1 и IP₃R3 существенно не затронула Ca^{2+} -сигнализацию, по крайней мере, в части, касающейся ответов на ACh, которые у клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺ по величине и кинетике были статистически неотличимы от таковых у клеток HEK-293WT. Поскольку популяционная кривая доза–ответ (рис. 5в) предполагает несколько более низкую чувствительность клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺, возможно, что это является

следствием инактивации IP₃R1 и/или IP₃R3, которые играют заметную роль в генерации Ca^{2+} -ответов клеток HEK-293WT при их стимуляции при дозах ACh, близких к пороговым.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток (поддержана Программой развития МГУ). Работа поддержана Российским научным фондом (грант 18-14-00347).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foskett J.K., White C., Cheung K.H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
2. Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
3. Thillaiappan N.B., Chakraborty P., Hasan G., Taylor C.W. 2019. IP₃ receptors and Ca^{2+} entry. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1866** (7), 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2018.11.007>
4. Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP₃ receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
5. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **11**(4), a035063.

6. Mak D.O., Foskett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*. **58**, 67–78.
7. Rios E. 2018. Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* **150**, 521–537.
8. Chandrasekhar R., Alzayady K.J., Yule D.I. 2015. Using concatenated subunits to investigate the functional consequences of heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 364–370.
9. Iwai M., Michikawa T., Bosanac I., Ikura M., Mikoshiba K. 2007. Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 12755–12764.
10. Miyazaki S., Yuzaki M., Nakada K., Shirakawa H., Nakanishi S., Nakade S., Mikoshiba K. 1992. Block of Ca_v2p wave and Ca_v2p oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*. **257** (5067), 251e5.
11. Takei K., Shin R.M., Inoue T., Kato K., Mikoshiba K. 1998. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science*. **282** (5394), 1705e8.
12. Matsumoto M., Nakagawa T., Inoue T., Nagata E., Tanaka K., Takano H., Minowa O., Kuno J., Sakakibara S., Yamada M., Yoneshima H., Miyawaki A., Fukuuchi Y., Furuichi T., Okano H., Mikoshiba K., Noda T. 1996. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*. **379** (6561), 168e71.
13. Tada M., Nishizawa M., Osamu O. 2014. IP₃ receptors in neurological disorders. In: *Pathologies of calcium channels*. Eds. Weiss N., Koschak A. Heidelberg: Springer. 731 p.
14. Nakayama H., Bodi I., Maillet M., DeSantiago J., Domeier T.L., Mikoshiba K., Lorenz J.N., Blatter L.A., Bers D.M., Molkenin J.D. 2010. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res.* **107** (5), 659e66.
15. Hisatsune C., Yasumatsu K., Takahashi-Iwanaga H., Ogawa N., Kuroda Y., Yoshida R., Ninomiya Y., Mikoshiba K. 2007. Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **282** (51), 37225–37231.
16. Mendes C.C., Gomes D.A., Thompson M., Souto N.C., Goes T.S., Goes A.M., Rodrigues M.A., Gomez M.V., Nathanson M.H., Leite M.F. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 40892–40900.
17. Kuo I.Y., Brill A.L., Lemos F.O., Jiang J.Y., Falcone J.L., Kimmerling E.P., Cai Y., Dong K., Kaplan D.L., Wallace D.P., Hofer A.M., Ehrlich B.E. 2019. Polycystin 2 regulates mitochondrial Ca²⁺ signaling, bioenergetics, and dynamics through mitofusin 2. *Sci. Signal.* **12** (580), eaat7397.
18. Lock J.T., Alzayady K.J., Yule D.I., Parker I. 2018. All three IP₃ receptor isoforms generate Ca²⁺ puffs that display similar characteristics. *Sci. Signal.* **11** (561), eaau0344.
19. Chiang T.W., le Sage C., Larriue D., Demir M., Jackson S.P. 2016. CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.* **6**, 24356.

IP₃ Receptor of Type 2 Is a Dominant Isoform in HEK-293 Cells

M. F. Bystrova¹, O. A. Rogachevskaja¹, E. N. Kochkina¹, E. E. Kopylova¹,
N. P. Kovalenko¹, S. S. Kolesnikov¹, *

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

The variety of the first messengers initiates intracellular Ca²⁺ signaling by stimulating cell surface receptors coupled to the phosphoinositide cascade. Fundamental for this process is the phospholipase C-mediated production of the second messenger IP₃ followed by IP₃-dependent Ca²⁺ release from Ca²⁺ stores. The regulatory role of IP₃ is to activate IP₃ receptors, which are ligand-gated Ca²⁺-permeable ion channels operating in endoplasmic reticulum and some other intracellular organelles. In invertebrate genomes, three genes encode IP₃ receptor subunits, including *IP₃R1*, *IP₃R2* и *IP₃R3*. Different cells employ distinct combinations of IP₃ receptors, and each of them is controlled by specific regulatory mechanisms. These factors determine attributes of IP₃-dependent Ca²⁺ signaling and a specific functional role for a given IP₃ receptor in physiology of a particular cell type. HEK-293 cells are ubiquitously used as a model heterologous system for the expression of recombinant proteins and studying receptors and related mechanisms of intracellular signaling. All three isoforms of IP₃ receptors are functional in HEK-293 cells. The link between IP₃ receptor activity and distinctive aspects of intracellular signaling can be explored by employing a set of cell lines, wherein IP₃ receptors function in certain combinations. Here we sequentially inactivated genes encoding IP₃R1 and IP₃R3 in HEK-293 cells by using the CRISPR/Cas9 approach. Eventually, the monoclonal cell line HEK-293IP₃R2^{+/+} was generated, wherein solely IP₃R2 was functional. The comparative analysis of intracellular Ca²⁺ signaling triggered by acetylcholine in HEK-293 и HEK-293IP₃R2^{+/+} cells indicated that the ablation of genes *IP₃R1* and *IP₃R3* did not lead to any evident change of characteristics of Ca²⁺ responses to acetylcholine. The overall data obtained suggested that in HEK-293 cells, agonist-induced Ca²⁺ signals are mainly mediated by IP₃R2.

Keywords: intracellular Ca²⁺ signaling, IP₃ receptors, CRISPR/Cas9 system, monoclonal cell lines

УДК 577.25

АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР GPVI: ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТВЕТА

© 2020 г. М. Г. Степанян^{a, b}, А. А. Филькова^{a, b, c}, А. К. Гарсон Дасгупта^{b, c},
А. А. Мартьянов^{a, b, c, d}, А. Н. Свешникова^{a, b, c, *}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, 109029 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
физический факультет, Москва, 119991 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

^dИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 24.04.2020 г.

После доработки 21.05.2020 г.

Принята к публикации 22.05.2020 г.

Тромбоциты – безъядерные клетки, ответственные за предотвращение кровопотери в случае нарушения целостности сосудистых стенок. При контакте с обнажившимся при повреждении сосуда коллагеном тромбоциты активируются через рецептор-гликопротеин, GPVI, что приводит к изменению формы, дегрануляции, проагрегантному и прокоагулянтному ответу. Целью данной работы было наблюдение изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и функциональных ответов тромбоцитов при стимуляции через рецептор GPVI. В исследовании приняли участие здоровые взрослые добровольцы. Также были использованы домовые мыши *Mus musculus* линии C57Bl6 (дикий тип). Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} оценивалась по изменению флуоресценции Fura-Red на проточном цитофлуориметре. Активация интегринов наблюдалась на проточном цитофлуориметре по связыванию фибриногена человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой, или на оптическом агрегометре. Тромбоциты активировались при помощи пептида, сходного по аминокислотной последовательности с коллагеном (collagen-related peptide, CRP) при работе на цитометре и с помощью фибриллярного коллагена при работе на агрегометре. У тромбоцитов человека была обнаружена существенная междонорская вариабельность в относительном изменении уровня Ca^{2+} в цитозоле в ответ на стимуляцию; значительно меньшей была междонорская вариабельность в активации тромбоцитарных интегринов, изменении формы и в агрегационном ответе. У мышей такой вариабельности не наблюдалось. Наблюдаемая вариабельность кальциевого ответа тромбоцитов могла быть вызвана различиями в экспрессии GPVI у здоровых доноров и полиморфизмами в гене рецептора GPVI у изученных доноров. Обнаруженное сходство в функциональных ответах тромбоцитов, при различных сигнальных ответах, позволяет предположить вариабельный вклад фосфоинозитидной ветви внутриклеточной сигнализации в ответ на активацию GPVI у тромбоцитов.

Ключевые слова: рецептор-гликопротеин, коллаген, внутриклеточная сигнализация, тромбоциты

DOI: 10.31857/S0233475520060079

ВВЕДЕНИЕ

Внутренней оболочкой кровеносного сосуда является интима. Она состоит из эндотелия и межклеточного матрикса, представляющего собой коллагеновые и ретикулиновые волокна, а также фибробласты и продольно ориентированные гладкомышечные клетки [1]. При повреждении интимы происходит обнажение фибрилляр-

ных коллагенов: фибронектина и ламинина [2]. Обнажившийся коллаген связывается с фактором Виллебранда (vWF) – мультимерным белком плазмы крови, разворачивающимся при связывании с коллагеном под действием гемодинамических сил сопротивления [3]. В развернутой конформации vWF привлекает тромбоциты крови через их механорецептор GPIb [4]. Тромбоциты – безъядерные клетки, входящие в состав крови, главной задачей которых является образование гемостатических пробок в области нарушения це-

Список сокращений: PRP – богатая тромбоцитами плазма, CRP – коллаген-подобный пептид.

лостности кровеносных сосудов [5]. Переходя в активированное состояние, тромбоциты изменяют форму и выпускают наружу содержимое своих гранул, что привлекает другие тромбоциты и приводит к росту тромба [6]. Адгезия тромбоцитов к коллагену за счет связи GPIb и vWF не является стабильной, поэтому после привлечения тромбоцита к коллагену через vWF-GPIb, необходима его дальнейшая активация [7]. Коллаген запускает активацию тромбоцита через гликопротеин-VI (GPVI) и интегрин $\alpha_2\beta_1$ [8]. В то время как последний является адгезионным, именно GPVI отвечает за генерацию внутриклеточных сигналов, запускающих активацию и функциональные ответы тромбоцитов – изменение формы, дегрануляцию, проагрегантный (активацию тромбоцитарных интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$) и прокоагулянтный ответы [8, 9]. Активированные интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ связываются с плазменным белком фибриногеном, который служит своеобразным “мостиком” для связывания двух тромбоцитов, что приводит к формированию тромбоцитарных агрегатов [10].

Рецептор GPVI экспрессируется совместно с FcR γ -цепью, их комплекс формируется посредством нековалентного трансмембранного контакта [11]. GPVI присутствует только на поверхности тромбоцитов и производящих их мегакариоцитов [11]. GPVI мыши имеет идентичность 67.3 и 64.4% с GPVI человека на уровне нуклеотидной и аминокислотной последовательностей белка соответственно [12]. Внеклеточные и внутриклеточные домены рецептора GPVI человека и мыши не идентичны. Например, большинство блокирующих антител, направленных против GPVI человека, не связываются с GPVI мыши, что осложняет доклинические испытания анти-GPVI агентов [13]. Уровень гомологии между GPVI человека и мыши несколько выше в Ig-доменах (78%), содержащих сайты связывания для активаторов (коллагена, коллаген-подобного пептида (CRP) и конвульксина) [14]. Недавно было продемонстрировано, что фибрин также является активатором тромбоцитарного GPVI рецептора человека и мыши [15]. Наконец, иммобилизованный фибриноген способен активировать димеризованные рецепторы GPVI [16]. Данные исследования были проведены *in vivo* на человеческих тромбоцитах, а также на тромбоцитах мышей, в которых была экспрессирована человеческая форма рецептора GPVI [17].

Каждая цепь FcR γ содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), состоящий из двух последовательностей YxxL, разделенных 6–12 аминокислотами [18]. При активации GPVI связанные с ним тирозинкиназы семейства Src (SFK) фосфорилируют ITAM [19]. Это приводит к связыванию с ITAM и активации тирозин-киназ Syk. Syk-зависимый сигнальный

каскад ведет к формированию LAT-сигналысомы, в комплексе которой активируется фосфоинозитид-3 киназа (PI3K), фосфорилирующая фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (PIP₂) до фосфоинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP₃). К PIP₃ присоединяется тирозинкиназа Брутона (Btk), которая запускает активацию фосфолипазы C γ 2 (PLC γ 2). Она гидролизует фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (PIP₂), в результате чего образуется инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃). IP₃ активирует находящийся на ЭПР IP₃-рецептор, что приводит к выходу Ca²⁺ в цитозоль [20]. Схема сигнализации, опосредованной рецептором GPVI, представлена на рис. 1.

Мутации в гене рецептора GPVI (GP6) вызывают возникновение петехий, меноррагий и носовых кровотечений легкой степени тяжести [22–24]. Однако при этом у пациентов с мутациями в гене GP6 не наблюдалось тромбоцитопений [25]. Функциональное тестирование тромбоцитов показало ослабленную агрегацию богатой тромбоцитами плазмы пациентов с мутацией в гене GP6 в ответ на CRP и конвульксин (индукторы активации тромбоцитарного GPVI), но при этом нормальную агрегацию в ответ на ADP (активатор P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторов), арахидоновую кислоту, U46617 (активаторы TP рецептора), TRAP1 (активатор рецептора PAR1), ристоцетин (агент, вызывающий агглютинацию тромбоцитов через GPIb α -vWF) [26]. Также было показано, что мутация в гене рецептора GPVI приводит к нарушению свертываемости крови и формированию тромбов *ex vivo* как у людей, так и у мышей [17, 25–28].

В настоящее время рецептор GPVI рассматривается в качестве мишени для антитромботической и противовоспалительной терапии [29]. Показано, что введение растворимого GPVI (sGPVI) здоровым донорам не вызывает кровоточивости, однако ингибирует агрегацию тромбоцитов в ответ на коллаген *in vitro* [30]. Также рассматривались ингибиторы сигнального пути GPVI, Syk-киназы (пицеатаннол, малеат, десантиниб), однако отсутствие специфичности в связи с большим количеством различных биологических ролей у целевых киназ является основным недостатком данного подхода [31]. Использование антител к GPVI также было эффективным для терапии тромбозов [32–34].

Изучение сигнальных путей и описание доноров по их индивидуальным показателям открывают новые возможности для разработки более безопасных антитромботических лекарств, основанных на ингибировании рецептора GPVI. Цель данной работы – описание кальциевой сигнализации и активации тромбоцитарных интегринов при активации тромбоцитарного рецептора GPVI в человеческих и мышинных тромбоцитах.

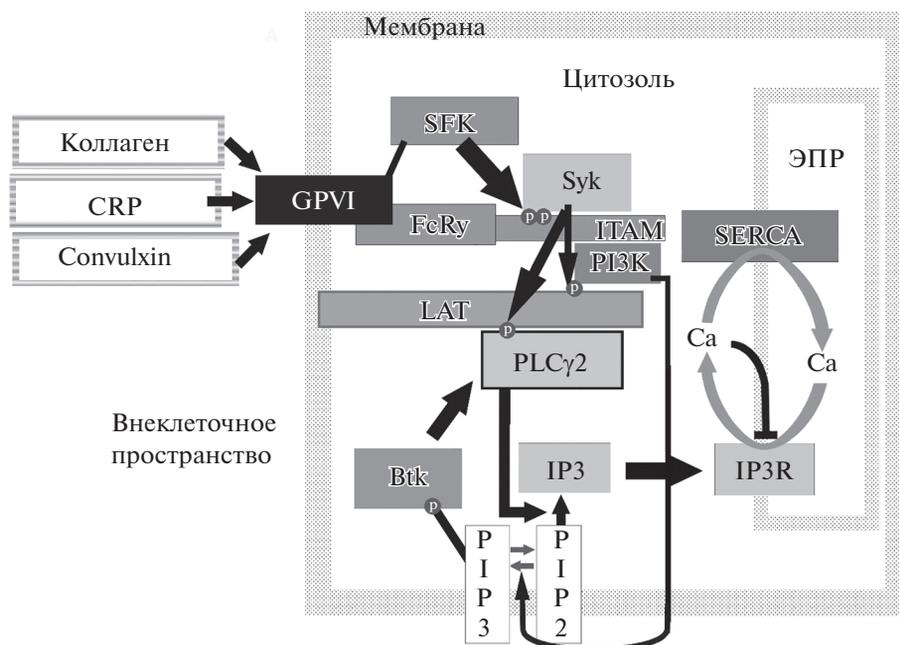


Рис. 1. Сигнальный каскад при активации тромбоцита через рецептор GPVI. Связывание коллагена/CRP/конвульксина и GPVI запускает активацию SFK, фосфорилирующих ITAM [21]. Это приводит к связыванию киназы Syk, которая фосфорилирует адаптерный белок LAT. К фосфорилированным LAT присоединяются PLCγ₂ и PI3K. Ассоциированные с LAT PI3K активируются и фосфорилируют PIP₂, производя PIP₃. Тирозинкиназы Брутона (Btk) связываются своим плекстрин-гомологичным доменом с PIP₃, активируются и запускают активацию соединенных с LAT фосфолипаз PLCγ₂. Активные PLCγ₂ гидролизуют комплекс PIP₂, производя IP₃. IP₃ активирует рецептор к инозитолтрифосфату (IP₃R), находящийся на мембране ЭПР. Происходит выход кальция в цитозоль клетки, корректируемый также самим IP₃R и сарко/эндоплазматическоретикулярной Ca²⁺-ATP-азой SERCA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В исследование были включены 14 здоровых добровольцев, как мужчин, так и женщин в возрасте от 18 до 58 лет, отрицавших наличие сердечно-сосудистых заболеваний в семейной истории и давших письменное информированное согласие. Кровь здоровых доноров забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (SARSTEDT Monovette, для использования в проточной цитометрии) и цитрат натрия (Improvacuter, для турбидиметрической агрегометрии). Также были использованы 12 домашних мышей (*Mus musculus*) линии C57Bl6 возрастом от 4 до 5 месяцев, весом 25–35 г, обоих полов. Кровь мышей была взята на ACD (кислотно-цитратную декстрозу). Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и директивой Европейского парламента 63/2010/EU и были одобрены этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН.

Реагенты. Были использованы следующие материалы: флуоресцентный зонд Fura-Red-AM (Molecular Probes, Eugene, Орегон, США); FITC, фибриноген человека, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), D(+)-глюкоза (Sigma, США); NaCl; Na₂HPO₄; KCl; NaHCO₃; MgCl₂; CaCl₂;

C₆H₅Na₃O₇ · 2(H₂O); C₆H₈O₇ · H₂O (Агат-Мед, Москва, Россия), коллаген (Технология-Стандарт, Россия). Цистеинсодержащая версия шитого подобного коллагену пептида (CRP) была любезно предоставлена профессором R.W. Farn-dale (Университет Кембриджа, Кембридж, Великобритания) [35].

Протокол выделения клеток для проточной цитометрии. Цельная кровь, антикоагулированная гирудином, была инкубирована с кальций-чувствительным зондом Fura-Red-AM в концентрации 2 мкМ в присутствии 0.2 ед/мл апиразы в течение 35 мин при 37°C. Апираза была добавлена для снижения негативного влияния секретиремого осажденными эритроцитами ADP на активацию тромбоцитов. По истечении 35 мин кровь была разведена буфером Тирода (134 мМ NaCl; 0.34 мМ Na₂HPO₄; 2.9 мМ KCl; 12 мМ NaHCO₃; 20 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы; 1 мМ MgCl₂; 2 мМ CaCl₂; BSA 2% по массе; pH 7.3) до концентрации тромбоцитов 1 × 10³ в 1 мкл.

Кровь мышей была взята из брюшной артерии в шприц, содержащий антикоагулянт ACD (85 мМ дигидрата тринайтритцита, 66.6 мМ моногидрата лимонной кислоты и 111 мМ D(+)-глюкозы в растворе дистиллированной воды (осмолярность 450 мОсм/л, pH 4.5) в соотношении объемов 1 : 6

(антикоагулянт к крови). Тромбоциты были выделены согласно протоколу [36]. Клетки были окрашены Fura-Red в концентрации 2 мкМ в присутствии 0.2 ед/мл апиразы в течение 35 мин при 37°C.

Проточная цитометрия. Методика измерения концентрации кальция в цитозоле тромбоцита и активации интегринов аналогична описанной ранее [37–41]. В исследовании был использован проточный цитометр BD FACS Canto II. В начальный момент времени к пробам добавляли флуоресцентно меченный фибриноген в концентрации 100 мкг/мл. Через 60 с от начала исследования к пробам добавляли агонист рецептора GPVI CRP (0.25, 1 и 5 мкг/мл). При обработке результатов по значениям прямого и бокового светорассеяния клетками выбиралась область, соответствующая тромбоцитам. Затем оценивалась флуоресценция Fura-Red в свободном состоянии (возбуждение 488 нм, излучение 640 ± 30 нм) и в связанном с ионами кальция состоянии (возбуждение 405 нм, излучение 670 ± 30 нм). Усреднение проводилось по 1000 клеток. В качестве меры концентрации кальция в цитозоле тромбоцита рассматривалось отношение средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI), $R = (MFI_{405}/MFI_{488})$. $[Ca^{2+}]$ измерялась в относительных единицах R/R_0 , где R_0 – наблюдаемое для данного образца значение R в покое (до активации). Связывание фибриногена (возбуждение 488 нм, излучение 520 ± 20 нм) считалось максимальным после инкубации пробы с 1 мкМ иономицина в течение 10 мин и использовалось для расчета степени связывания фибриногена при активации CRP. Для оценки изменения формы клеток использовалось боковое светорассеяние (SSC, параметр проточной цитометрии, растущий при увеличении неоднородности поверхности клетки), где за 0% принималось усредненное значение бокового светорассеяния за первые 60 с измерений (без активации), а за 100% – отсутствие детектированных лучей.

Турбидиметрическая агрегометрия. Для исследования агрегации тромбоцитов методом турбидиметрической агрегометрии кровь доноров забирали из локтевой вены в пробирки, содержащие цитрат натрия (финальная концентрация $Na_3C_6H_5O_7$ в полученной крови 0.129 моль/л). Затем кровь центрифугировали (8 мин, 150 g) и отбирали богатую тромбоцитами плазму (platelet rich plasma, PRP). Оставшуюся часть крови центрифугировали 15 мин с ускорением 2000 g для получения бедной тромбоцитами плазмы с целью калибровки прибора. К богатой тромбоцитами плазме добавляли гирудин в концентрации 10 ед/мл и $CaCl_2$ до концентрации 20 мМ (расчетная концентрация свободных ионов кальция в плазме составляет 2.5 мМ), и 3 мин инкубировали

при температуре 37°C, затем проводили измерение на агрегометре Viola LA-230 при скорости перемешивания 800 оборотов в минуту. Активация проводилась коллагеном (1 и 2.5 мкг/мл).

Анализ данных. Обработка данных проточной цитометрии и агрегометрии проводилась посредством Python 3.7. Для оценки значимости различий был использован U-критерий Манна–Уитни, статистически значимым отличием считалось значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ответы тромбоцитов на активацию GPVI в проточной цитофлуориметрии. При исследовании внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и мышей в качестве маркера сигнальной активности использовалось относительное изменение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле в ответ на активацию (рис. 2а, 2г, 2ж). Функциональные характеристики тромбоцитов оценивались по связыванию фибриногена (проагрегантный тромбоцитарный ответ, рис. 2б, 2д, 2з) и изменению формы (первичный ответ тромбоцитов на активацию, рис. 2в, 2е, 2и). По сигнальным и функциональным ответам тромбоцитов в ходе исследования были выделены две отдельные группы (рис. 2а–2в и рис. 2г–2е соответственно). Доноры, максимальное изменение внутриклеточного кальция которых в ответ на активацию 5 мкг/мл CRP превышало 1.4 отн. ед. (рис. 2а, 2г), были отнесены к типу 1 (рис. 2а–2в), в обратном случае к типу 2 (рис. 2г–2е). Мышинные тромбоциты были выделены в отдельную группу (рис. 2ж–2и). Выбор границы был сделан на основании визуального разделения доноров на две группы при наблюдении кривых зависимости относительной концентрации внутриклеточного Ca^{2+} от времени.

Дальнейший анализ полученных данных был проведен для выявления закономерностей в измеренных параметрах в зависимости от типа объекта исследования. Так, степень связывания фибриногена и процент изменения бокового светорассеяния (далее изменение формы) также различался в зависимости от группы: мышинные тромбоциты демонстрировали существенно большее связывание фибриногена по сравнению с человеческими (рис. 2б, 2д, 2з), а изменение формы у доноров типа 2 было снижено по сравнению с типом 1 и мышами (рис. 2в, 2е, 2и).

В ответ на высокую концентрацию CRP наблюдается вариабельность ответа по относительному изменению концентрации внутриклеточного кальция в тромбоцитах человека (2.02 ± 0.45 отн. ед. и 1.22 ± 0.13 отн. ед. у типа 1 и типа 2, соответственно). Тромбоциты мышей были выделены в группу 3 (1.49 ± 0.06 отн. ед.), ста-

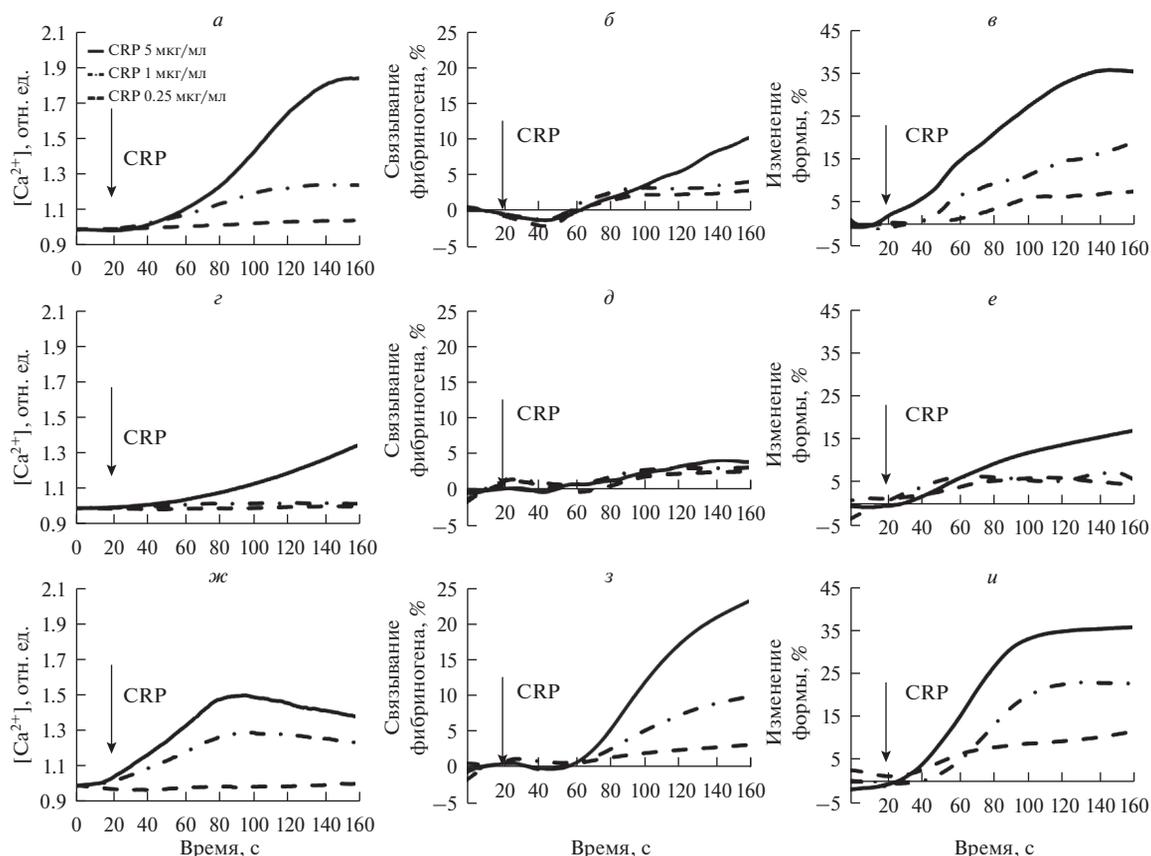


Рис. 2. Типичные кривые для трех видов ответов, полученные в ходе экспериментов. Стрелка указывает на время добавления активатора. Концентрация CRP в образце: 0.25 (1), 1 (2) и 5 мкг/мл (3). Относительное изменение концентрации кальция в цитозоле, R/R_0 (а), связывание фибриногена (б) и изменение формы (в) тромбоцитов в течение 140 с после добавления CRP для получения трех различных концентраций активатора в образце для доноров типа 1. Относительное изменение концентрации кальция в цитозоле, R/R_0 (е), связывание фибриногена (д) и изменение формы (е) тромбоцитов в течение 140 с после добавления CRP для получения трех различных концентраций активатора в образце для доноров типа 2. Относительное изменение концентрации кальция в цитозоле, R/R_0 (ж), связывание фибриногена (з) и изменение формы (и) тромбоцитов в течение 140 с после добавления CRP для получения трех различных концентраций активатора в образце у мышей.

тистически значимо отличающуюся от типа 2 (рис. 3а). Связывание фибриногена напрямую не коррелирует со значением внутриклеточной концентрации кальция (рис. 3а, 3б). Максимальный процент связывания фибриногена был наивысшим у мышей (17.6 ± 5.8), средним для типа 1 (9.1 ± 1.7) и низким для типа 2 (4.6 ± 2.3). Также была продемонстрирована двукратная варибельность по изменению формы для типа 1 и типа 2 (рис. 3в).

При помощи критерия Манна–Уитни были исследованы численные характеристики ответов доноров на стимуляцию CRP для поиска статистически значимых различий. При концентрациях активатора 5, 1 и 0.25 мкг/мл изменение внутриклеточной концентрации кальция различалось между типом 1 и типом 2 и между типом 2 и мышами (рис. 3а). Процент связывания фибриногена тромбоцитами типа 2 при концентрации CRP 5 мкг/мл был значимо ниже, чем у двух оставших-

ся групп (рис. 3б). При уменьшении количества активатора до 1 мкг/мл человеческие тромбоциты демонстрировали схожие ответы по фибриногену (4.5 ± 0.9 для типа 1 и 3.9 ± 1.8 для типа 2), меньшие, чем ответ мышиных клеток (9.0 ± 2.1) (рис. 3б). Оба типа ответа человеческих тромбоцитов при концентрациях агониста 5 и 1 мкг/мл различались по изменению формы, и сходным образом наблюдалось отличие между типом 2 и мышиными тромбоцитами (рис. 3в).

Снижение концентрации CRP приводило к уменьшению варибельности функциональных видов ответов, так, различия по фибриногену и изменению формы при концентрации CRP 0.25 мкг/мл были незначимы (рис. 3б–3в).

Ответы тромбоцитов на активацию GPVI в агрегометрии. Плазма 12 доноров была исследована методом турбидиметрической агрегометрии. Используя данные, полученные эксперименталь-

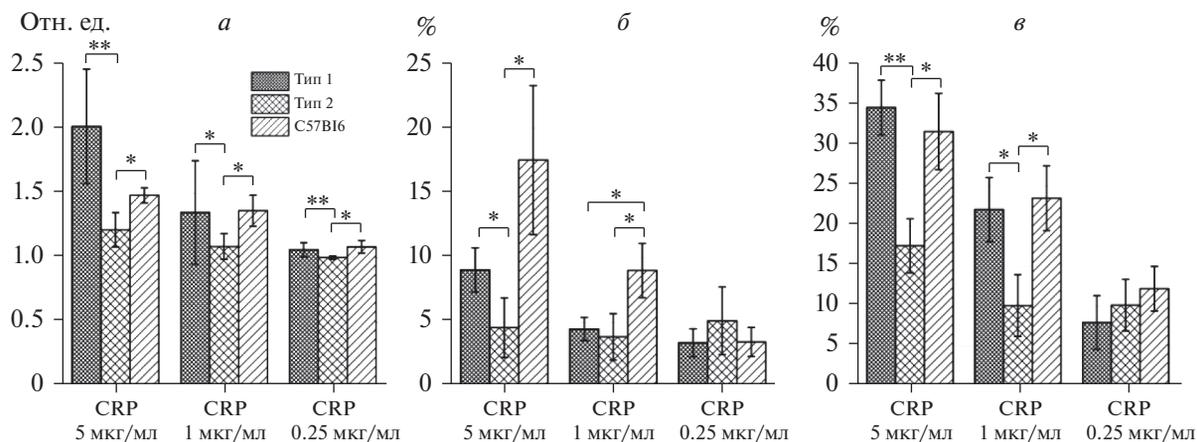
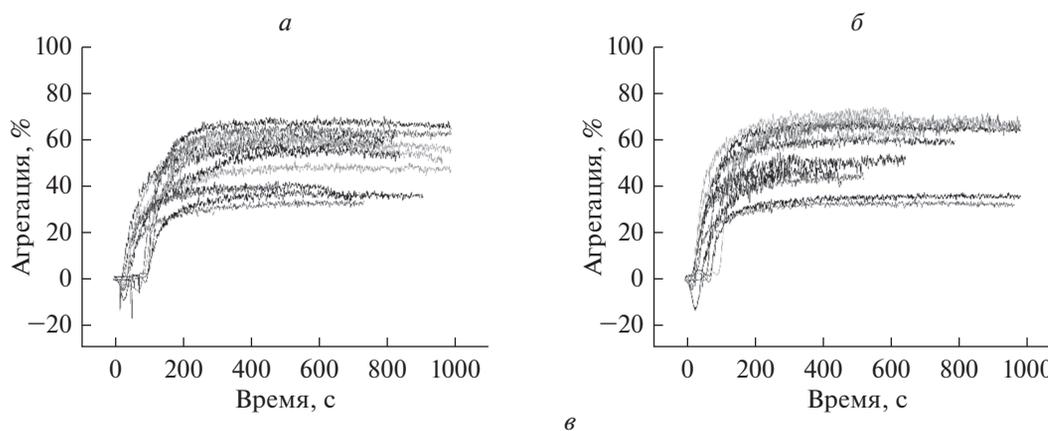


Рис. 3. Количественное сравнение ответов тромбоцитов на стимуляцию рецептора GPVI. *а* – Средние значения максимума R/R_0 для трех типов ответов при трех различных концентрациях CRP. *б* – Средние значения максимального процента связывания фибриногена для трех типов ответов при трех различных концентрациях CRP. *в* – Средние значения максимального процента изменения формы для трех типов ответов при трех различных концентрациях CRP. Две звездочки обозначено статистически значимое различие при $p < 0.01$, одной – при $p < 0.05$.



Концентрация коллагена, мкг/мл	Максимальная агрегация, %	Начальная скорость агрегации, %/с
1	52 ± 13	0.61 ± 0.19
2.5	53 ± 14	0.65 ± 0.17

Рис. 4. Результаты агрегометрии в ответ на коллаген. Агрегационные кривые тромбоцитов 12 доноров в ответ на концентрации коллагена 1 (*а*) и 2.5 мкг/мл (*б*). *в* – Значения средних максимумов агрегации и начальной скорости агрегации для доноров двух типов при концентрациях коллагена 1 и 2.5 мкг/мл.

ным путем, мы получили значения максимального изменения оптической плотности раствора при активации коллагеном I типа (концентрации 2.5 и 1 мкг/мл), а также начальную скорость агрегации. Значения данных параметров для различных концентраций активатора сходятся в пределах погрешности (рис. 4в).

Агрегационные ответы различных доноров также оказались вариабельны, как при стимуляции 1 мкг/мл коллагена (рис. 4а), так и при сти-

муляции 2.5 мкг/мл коллагена (рис. 4б). Однако, в отличие от данных проточной цитометрии (рис. 2, 3), выделить две различные подгруппы доноров по данным агрегометрии оказалось невозможно (рис. 4а, 4б). Важно отметить, что группировка доноров по результатам проточной цитометрии проводилась по максимальному достижимым концентрациям свободных ионов кальция в ответ на активацию, так как провести четкое разделение по степени связывания фибриногена данных групп было затруднительно (рис. 2б, 2д).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были проанализированы различные показатели ответа тромбоцитов при их активации коллагеном или подобным коллагену пептидом через рецептор GPVI и показана вариабельность по уровню внутриклеточного кальция, связыванию фибриногена и изменению формы (рис. 2, 3) для разных доноров. В то время как кальциевые ответы позволяли выделить несколько групп здоровых доноров, различия по фибриногену между группами были менее выражены или вовсе отсутствовали (рис. 3а, 3б). Результаты турбидиметрической агрегометрии не выявили разделения доноров на группы. Мышиные тромбоциты по концентрации свободных ионов кальция и изменению формы были близки к ответам типа 1, а также демонстрировали существенно большее связывание фибриногена (рис. 3). Согласно литературным данным, существует множество потенциальных причин наблюдаемого нами феномена.

Авторами [42] было показано, что экспрессия GPVI у здоровых доноров может иметь пятикратные различия, а также была продемонстрирована значительная разница в индуцированной конвульсином активности протромбиназы на тромбоцитах, которая коррелировала с уровнем GPVI-рецепторов. В той же работе прямой связи между агрегацией тромбоцитов в ответ на конвульсин и CRP и экспрессией GPVI не наблюдалось, и корреляции между адгезией тромбоцитов к лигандам GPVI и содержанию данного рецептора также не было продемонстрировано. Однако существуют исследования, в которых экспрессия рецептора имеет меньшую вариабельность, так, среди 102 доноров она различалась только в 1.5 раза [43]. Для проверки гипотезы о том, что изменение уровня внутриклеточного кальция в ответ на активацию CRP (рис. 2, 3) зависит от уровня экспрессии GPVI, необходимо дальнейшее изучение феномена, включающее в себя подсчет числа интересующих нас рецепторов на мембране. Вопрос о причинах столь значительных отличий экспрессии тромбоцитарного рецептора GPVI также остается открытым на сегодняшний день.

Другой причиной вариабельных ответов у здоровых доноров могли быть различные полиморфизмы в аминокислотной последовательности рецептора GPVI. Пять однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) были найдены в гене GP6. Были выделены два общих гаплотипа, каждый из которых определяется пятью связанными полиморфизмами, три из которых находятся во внеклеточном домене и два в цитоплазматическом (аллель “а” – SKTQH и аллель “b” – PEALN с аллельными частотами 0.85 и 0.13) [44, 45]. Аллель “b” ассоциирована с низкой плотностью GPVI и уменьшает функциональные ответы на коллаген

и CRP [43]. С другой стороны, Трифирио и коллеги показали отсутствие связи между генотипом и экспрессией GPVI [46]. Также было показано, что гаплотипы SKTQH и PEALN отвечали только за 35% вариабельности [47]. Была найдена связь между гаплотипом “bb” и коронарным тромбозом [48]. Гомозиготность по “b” аллелю была ассоциирована с развитием инфаркта миокарда у японцев [49]. При этом была найдена корреляция между уменьшением повторов сердечно-сосудистых событий и снижением смертности у пациентов с аллелем “b”, но не первым инфарктом миокарда [50]. Интерес также представляют различия в отдельных SNP. N322 ослабляет связывание с Fyn/Lyn и, следовательно, фосфорилирование Syc [46]. Для проверки предположения, что гаплотип доноров связан с наблюдаемой вариабельностью кальциевого ответа (рис. 3а), необходимо дальнейшее расширение выборки и скрининг доноров на предмет наличия полиморфизмов.

Механизмы взаимодействия GPVI индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах и функциональных ответов тромбоцита не являются до конца определенными. Отдельный интерес представляет фосфоинозитидная сигнализация в тромбоцитах. Тромбоцитарные интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$, ответственные за проагрегантный ответ, запускаются GTP-азой Rap1, ключевым регулятором которой является Ca^{2+} -регулируемый фактор обмена нуклеотидов CalDAG-GEFI [51, 52]. Было продемонстрировано, что активация Rap1 по GPVI-зависимому пути зависит от активности PI3K [53]. Таким образом, при разной концентрации внутриклеточного кальция (рис. 3а) может быть достигнута схожесть в активации комплекса $\alpha_{IIb}\beta_3$ (рис. 3б) и агрегационного ответа (рис. 4) у здоровых доноров.

Кроме того, при активации GPVI происходит активация металлопротеиназы ADAM10, которая отделяет эктодомен GPVI рецептора [54]. В результате данного процесса в плазму выделяется 55 кДа белок sGPVI [55]. Ингибиторы кальциевой сигнализации и компонентов сигнального пути рецептора GPVI блокируют данный процесс [54, 56]. Растворимый GPVI связывается с коллагеном, а также уменьшает адгезию и агрегацию тромбоцитов *in vivo* [57]. Участие sGPVI в агрегации (рис. 4) может быть причиной меньших функциональных различий по сравнению с проточной цитометрией (рис. 2, 3) в связи с большей концентрацией клеток в растворе.

Оптическая агрегометрия является одним из широко используемых методов выявления нарушений функционирования тромбоцитов, однако существует большое количество ограничений при использовании данного метода и численной оценке данных. Так, результат одного и того же пациента зависит от большого числа условий: ти-

па антикоагулянта, количества липидов в плазме, гемолиза, количества тромбоцитов, свежести образца. Отсутствие стандартизации и контроля качества существенно усложняет наблюдение малых различий [58]. Таким образом, не выявленное в ходе этого исследования разделение доноров на подгруппы тестом турбидиметрической агрегометрии (рис. 4) может также быть следствием низкой точности теста.

В настоящей работе нами было продемонстрировано существование различных типов активации тромбоцитов по GPVI-пути и не связанных между собой напрямую кальциевого и фибриногенового ответа тромбоцитов и выдвинуто несколько гипотез о природе данного явления. Полученные нами данные позволяют предположить, что в тромбоците существует больше одного уровня регуляции внутриклеточных процессов, отвечающих за активацию и агрегацию. Дальнейшее изучение вопроса необходимо для уточнения механизмов и потенциального использования знаний о группе пациента (рис. 2, 3) для персонализированной терапии.

Авторы благодарны М.А. Пантелееву (ЦТП ФХФ РАН, Москва, РФ) за обсуждения в ходе работы и В.В. Попову (факультет фундаментальной медицины МГУ, Москва, РФ) за консультации по работе с животными. Разработка предложенной методики наблюдения активации тромбоцитов на проточном цитометре поддержана грантом Российского научного фонда № 17-74-20045, анализ полученных данных поддержан стипендией Президента РФ СП-2675.2019.4, работа со здоровыми донорами поддержана грантом фонда “Врачи, инновации, наука – детям”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weinberg C.B., Bell E. 1986. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. **231** (4736), 397–400.
- Monroe D.M., Hoffman M. 2006. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (1), 41–48.
- Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S. 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **1** (7), 1602–1612.
- Siedlecki C.A., Lestini B.J., Kottke-Marchant K., Eppell S.J., Wilson D.L., Marchant R.E. 1996. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. **88** (8), 2939–2950.
- Koupenova M., Kehrel B.E., Corkrey H.A., Freedman J.E. 2016. Thrombosis and platelets: an update. *Eur. Heart J.* **38** (11), 785–791.
- Yun S.H., Sim E.H., Goh R.Y., Park J.I., Han J.Y. 2016. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2016**, 9060143.
- Jackson S.P. 2011. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nature Medicine*. **17** (11), 1423–1436.
- Snell D.C., Schulte V., Jarvis G.E., Arase K., Sakurai D., Saito T., Watson S.P., Nieswandt B. 2002. Differential effects of reduced glycoprotein VI levels on activation of murine platelets by glycoprotein VI ligands. *Biochem. J.* **368** (1), 293–300.
- Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M., Reitsma P.H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **93** (1), 327–358.
- Bennett J.S. 2015. Regulation of integrins in platelets. *Biopolymers*. **104** (4), 323–333.
- Lagrué-Lak-Hal A.H., Debili N., Kingbury G., Lecut C., Le Couedic J.P., Villeval J.L., Jandrot-Perrus M., Vainchenker W. 2001. Expression and function of the collagen receptor GPVI during megakaryocyte maturation. *J. Biol. Chem.* **276** (18), 15316–15325.
- Nieswandt B., Watson S.P. 2003. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood*. **102** (2), 449–461.
- Boylan B., Berndt M.C., Kahn M.L., Newman P.J. 2006. Activation-independent, antibody-mediated removal of GPVI from circulating human platelets: development of a novel NOD/SCID mouse model to evaluate the in vivo effectiveness of anti-human platelet agents. *Blood*. **108** (3), 908–914.
- Polgár J., Clemetson J.M., Kehrel B.E., Wiedemann M., Magnenat E.M., Wells T.N.C., Clemetson K.J. 1997. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J. Biol. Chem.* **272** (21), 13576–13583.
- Alshehri O.M., Hughes C.E., Montague S., Watson S.K., Frampton J., Bender M., Watson S.P. 2015. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. **126** (13), 1601–1608.
- Induruwa I., Moroi M., Bonna A., Malcor J.D., Howes J.M., Warburton E.A., Farndale R.W., Jung S.M. 2018. Platelet collagen receptor glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation during thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **16** (2), 389–404.
- Mangin P.H., Onselae M.B., Receveur N., Le Lay N., Hardy A.T., Wilson C., Sanchez X., Loyau S., Dupuis A., Babar A.K., Miller J.L.C., Philippou H., Hughes C.E., Herr A.B., Ariëns R.A.S., Mezzano D., Jandrot-Perrus M., Gachet C., Watson S.P. 2018. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica*. **103** (5), 898–907.
- Getahun A., Cambier J.C. 2015. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: Revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol. Rev.* **268** (1), 66–73.
- Andrews R.K., Suzuki-Inoue K., Shen Y., Tulasne D., Watson S.P., Berndt M.C. 2002. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI. *Blood*. **99** (11), 4219–4221.
- Moroi M., Jung S.M. 2004. Platelet glycoprotein VI: Its structure and function. *Thromb. Res.* **114** (4), 221–233.
- Quek L., Pasquet J., Hers I., Cornall R., Knight G., Barnes M., Hibbs M., Dunn A., Lowell C., Watson S.

2001. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood*. **96**, 4246–4253.
22. Dumont B., Lasne D., Rothschild C., Bouabdelli M., Ollivier V., Oudin C., Ajzenberg N., Grandchamp B., Jandrot-Perrus M. 2009. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood*. **114** (9), 1900–1903.
23. Hermans C., Wittevrongel C., Thys C., Smethurst P.A., Van Geet C., Freson K. 2009. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J. Thromb. Haemost.* **7** (8), 1356–1363.
24. Matus V., Valenzuela G., Sáez C.G., Hidalgo P., Lagos M., Aranda E., Panes O., Pereira J., Pillois X., Nurden A.T., Mezzano D. 2013. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J. Thromb. Haemost.* **11** (9), 1751–1759.
25. Arthur J.F., Dunkley S., Andrews R.K. 2007. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *British J. Haematology*. **139** (3), 363–372.
26. Moroi M., Shinmyozut K., Hospital K.C. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J. Clin. Investig.* **84**, 1440–1445.
27. Nieswandt B., Bergmeier W., Schulte V., Rackebrandt K., Gessner J.E., Zirngibl H. (2000) Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR γ chain. *J. Biol. Chem.* **275** (31), 23998–24002.
28. Nieswandt B., Schulte V., Bergmeier W., Mokhtari-Nejad R., Rackebrandt K., Cazenave J.P., Ohlmann P., Gachet C., Zirngibl H. 2001. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J. Exp. Med.* **193** (4), 459–469.
29. Dütting S., Bender M., Nieswandt B. 2012. Platelet GPVI: A target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 583–590.
30. Ungerer M., Rosport K., Bültmann A., Piechatzek R., Uhland K., Schlieper P., Gawaz M., Münch G. 2011. Novel antiplatelet drug revacept (dimeric glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. **123** (17), 1891–1899.
31. Geahlen R.L. (2014) Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.* **35** (8), 414–422.
32. Mangin P.H., Tang C.J., Bourdon C., Loyau S., Freund M., Hechler B., Gachet C., Jandrot-Perrus M. 2012. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341** (1), 156–163.
33. Li H., Lockyer S., Concepcion A., Gong X., Takizawa H., Guertin M., Matsumoto Y., Kambayashi J., Tandon N.N., Liu Y. 2007. The fab fragment of a novel anti-GPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (5), 1199–1205.
34. Takayama H., Hosaka Y., Nakayama K., Shirakawa K., Naitoh K., Matsusue T., Shinozaki M., Honda M., Yatagai Y., Kawahara T., Hirose J., Yokoyama T., Kurihara M., Furusako S. 2008. A novel antiplatelet antibody therapy that induces cAMP-dependent endocytosis of the GPVI/Fc receptor γ -chain complex. *J. Clin. Investig.* **118** (5), 1785–1795.
35. Morton L.F., Hargreaves P.G., Farndale R.W., Young R.D., Barnes M.J. 1995. Integrin $\alpha 2\beta 1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: Collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for $\alpha 2\beta 1$ -independent platelet reactivity. *Biochem. J.* **306** (2), 337–344.
36. Cazenave J.P., Ohlmann P., Cassel D., Eckly A., Hechler B., Gachet C. 2004. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol. Biol.* **272** (5), 13–28.
37. Alberio L., Ravanat C., Hechler B., Mangin P.H., Lanza F., Gachet C. 2017. Delayed-onset of procoagulant signalling revealed by kinetic analysis of COAT platelet formation. *Thromb. Haemost.* **117** (06), 1101–1114.
38. Martyanov A.A., Morozova D.S., Sorokina M.A., Filkova A.A., Fedorova D.V., Uzueva S.S., Suntsova E.V., Novichkova G.A., Zharkov P.A., Panteleev M.A., Svshnikova A.N. 2020. Heterogeneity of integrin $\alpha IIb\beta 3$ function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (9), 3035.
39. Martyanov A.A., Balabin F.A., Dunster J.L., Panteleev M.A., Gibbins J.M., Svshnikova A.N. 2020. Control of platelet CLEC-2-mediated activation by receptor clustering and tyrosine kinase signaling. *Biophys. J.* **118** (11), 2641–2655.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023>
40. Svshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* **14** (10), 2045–2057.
41. Мартянов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пanteleev M.A., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. 2020. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта-Олдрича. *Вопросы онкологии/гематологии и иммунопатологии в педиатрии*. **19** (1), 100–107.
42. Furihata K., Clemetson K.J., Deguchi H., Kunicki T.J. 2001. Variation in human platelet glycoprotein VI content modulates glycoprotein VI-specific prothrombinase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** (11), 1857–1863.
43. Best D., Senis Y.A., Jarvis G.E., Eagleton H.J., Roberts D.J., Saito T., Jung S.M., Moroi M., Harrison P., Green F.R., Watson S.P. 2003. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*. **102** (8), 2811–2818.
44. Joutsu-Korhonen L., Smethurst P.A., Rankin A., Gray E., IJsseldijk M., Onley C.M., Watkins N.A., Williamson L.M., Goodall A.H., de Groot P.G., Farndale R.W., Ouweland W.H. 2003. The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glyco-

- protein VI is associated with reduced functional responses and expression. *Blood*. **101** (11), 4372–4379.
45. Croft S.A., Samani N.J., Teare M.D., Hampton K.K., Steeds K.S., Channer K.S., Daly M.E. 2001. Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*. **104** (13), 1459–1463.
 46. Trifiro E., Williams S.A., Cheli Y., Furihata K., Pulcinelli F.M., Nugent D.J., Kunicki T.J. 2009. The low-frequency isoform of platelet glycoprotein VIb attenuates ligand-mediated signal transduction but not receptor expression or ligand binding. *Blood*. **114** (9), 1893–1899.
 47. Jones C.I., Garner S.F., Angenent W., Bernard A., Berzuini C., Burns P., Farndale R.W., Hogwood J., Rankin A., Stephens J.C., Tom B.D., Walton J., Dudbridge F., Ouwehand W.H., Goodall A.H. 2007. Mapping the platelet profile for functional genomic studies and demonstration of the effect size of the GP6 locus. *J. Thromb. Haemost.* **5** (8), 1756–1765.
 48. Ollikainen E., Mikkelsen J., Perola M., Penttilä A., Karhunen P.J. (2004) Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis*. **176** (1), 95–99.
 49. Takagi S., Iwai N., Baba S., Mannami T., Ono K., Tanaka C., Miyata T., Miyazaki S., Nonogi H., Goto Y. 2002. A GPVI polymorphism is a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *Atherosclerosis*. **165** (2), 397–398.
 50. Snoep J.D., Gaussem P., Eikenboom J.C.J., Emmerich J., Zwaginga J.J., Holmes C.E., Vos H.L., De Groot P.H.G., Herrington D.M., Bray P.F., Rosendaal F.R., Van der Bom J.G. 2010. The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: Results from the SMILE–Platelets project. *J. Thromb. Haemost.* **8** (11), 2377–2384.
 51. Bernardi B., Guidetti G.F., Campus F., Crittenden J.R., Graybiel A.M., Balduini C., Torti M. 2006. The small GTPase Rap1b regulates the cross talk between platelet integrin alpha2beta1 and integrin alphaIIb beta3. *Blood*. **107** (7), 2728–2735.
 52. Bertoni A., Tadokoro S., Eto K., Pampori N., Parise L.V., White G.C., Shattil S.J. 2002. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alphaIIb beta3, and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **277** (28), 25715–25721.
 53. Gilio K., Munnix I.C.A., Mangin P., Cosemans J.M.E.M., Feijge M.A.H., van der Meijden P.E.J., Olieslagers S., Chrzanowska-Wodnicka M.B., Lillian R., Schoenwaelder S., Koyasu S., Sage S.O., Jackson S.P., Heemskerk J.W.M. 2009. Non-redundant roles of phosphoinositide 3-kinase isoforms alpha and beta in glycoprotein VI-induced platelet signaling and thrombus formation. *J. Biol. Chem.* **284** (49), 33750–33762.
 54. Gardiner E.E., Karunakaran D., Shen Y., Arthur J.F., Andrews R.K., Berndt M.C. 2007. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb–IX–V by ADAM family metalloproteinases. *J. Thromb. Haemost.* **5** (7), 1530–1537.
 55. Andrews R.K., Karunakaran D., Gardiner E.E., Berndt M.C. 2007. Platelet receptor proteolysis: A mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (7), 1511–1520.
 56. Stephens G., Yan Y., Jandrot-Perrus M., Villeval J.L., Clemetson K.J., Phillips D.R. 2005. Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GP VI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen. *Blood*. **105** (1), 186–191.
 57. Massberg S., Konrad I., Bültmann A., Schulz C., Münch G., Peluso M., Lorenz M., Schneider S., Besta F., Müller I., Hu B.I.N., Langer H., Kremmer E., Rudekus M., Heinzmann U., Ungerer M., Gawaz M. 2003. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.* **18** (2), 397–399.
 58. Alessi M.C., Sié P., Payrastre B. 2020. Strengths and weaknesses of light transmission aggregometry in diagnosing hereditary platelet function disorders. *J. Clin. Med.* **9** (3), 763.

Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response

M. G. Stepanyan^{1, 2}, A. A. Filkova^{1, 2, 3}, A. K. Garzon Dasgupta^{2, 3},
A. A. Martyanov^{1, 2, 3, 4}, A. N. Sveshnikova^{1, 2, 3, *}

¹Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Moscow Lomonosov State University, Physics Faculty, Moscow, 119991 Russia

³Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

⁴Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Platelets are nuclear-free cell fragments responsible for preventing blood loss in case of the vascular wall injury. After a contact with collagen exposed when the vessel is damaged, platelets become activated through the receptor glycoprotein GPVI. This leads to platelet shape change, degranulation, aggregation, and procoagulant responses. The aim of this study was to detect changes in calcium mobilization and functional responses of platelets upon stimulation through the GPVI receptor. The study involved healthy adult volunteers and house mice *Mus musculus* of the C57Bl6 line (wild type). Calcium signaling was monitored by Fura-Red fluorophore's fluorescence using BD FACS Canto II flow cytometer. Integrin activation was observed either by platelets' binding of human fibrinogen or by Biola optical aggregometry. For the flow cytometry analysis, platelets were activated by collagen-related peptide CRP; when tested by aggregometry, platelets were activated

ed using collagen. As a result of the study, the following phenomenon was revealed: in human platelets, significant inter-donor variability was detected in the relative change in the level of Ca^{2+} in the cytosol in response to stimulation; inter-donor variability in platelet integrin activation, shape change, and aggregation response was significantly less. In mice, such variability in the relative cytosolic calcium increase induced by stimulation was not observed. The observed variability of the calcium response of human platelets could be caused by differences in the GPVI expression or polymorphisms of the GPVI receptor gene in the studied donors. Similarities in the functional responses of platelets with different signaling patterns suggest a variable contribution of the phosphoinositide branch of the intracellular signaling in platelets in response to activation of GPVI.

Keywords: collagen, GPVI, platelets, intracellular signaling, cytosolic Ca^{2+}

УДК 615.225.1/612.018.2

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ РИАНОДИНОВЫХ RyR2 И ИНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИСФОСФАТНЫХ IP₃R1,2,3 РЕЦЕПТОРОВ И ИХ МОДУЛЯТОРОВ CaM И Epac В АОРТЕ И МИОКАРДЕ КРЫС

© 2020 г. Л. М. Кожевникова^а, *, И. Ф. Суханова^а, Н. П. Семенова^а, С. А. Крыжановский^б

^аНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

^бНаучно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, 125315 Россия

*e-mail: lubovmih@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.04.2020 г.

После доработки 22.05.2020 г.

Принята к публикации 23.05.2020 г.

Целью исследования была оценка возрастных изменений транскрипционной активности генов, участвующих в регуляции Ca²⁺-сигнализации — IP₃R, RyR и модуляторов их активности CaM и Epac, в сосудах и миокарде крыс обоего пола. Экспрессию оценивали по содержанию мРНК исследуемого белка относительно содержания мРНК β-актина. Показано, что у крыс обоего пола при старении в аорте развиваются однонаправленные изменения экспрессии генов, кодирующих IP₃Rs и RyR2, и различные, в зависимости от пола животных, изменения экспрессии генов белков, модулирующих их активность — CaM и Epac. В сосудах старых крыс (24 мес.) обоего пола снижен относительный уровень мРНК для IP₃R 2 и 3 типа, не изменен для IP₃R1 и значительно повышен для рецепторов RyR2 по сравнению с этими показателями у молодых крыс (4 мес.). В аорте старых самок снижено относительное содержание мРНК для CaM и Epac1 и не изменено для Epac2, у самцов, напротив, повышена экспрессия Epac1 и Epac2 на 67 и 50%, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями у молодых крыс (4 мес.) и не изменяется для CaM, что свидетельствует о гендерных различиях в нарушении тонких механизмов модуляции активности RyR2 и IP₃Rs в сосудах. Значительные изменения выявлены в миокарде старых крыс. У старых самцов возрастает экспрессия RyR2, IP₃R1,2,3 в левом желудочке, RyR2 и IP₃R1 — в левом предсердии, RyR2 и IP₃R3 — в правом предсердии. В отличие от самцов в левом желудочке самок содержание мРНК для RyR2, IP₃R1,2,3 было значительно ниже, чем у молодых животных. В правом предсердии старых самок выявлен высокий уровень экспрессии IP₃R1 и IP₃R3, в левом — IP₃R3. Во всех отделах сердца самок неизменной была экспрессия IP₃R2. В миокарде старых крыс обоего пола значительно возрастала экспрессия белков CaM и Epac2. Выявленные возрастные различия в транскрипционной активности генов, участвующих в регуляции внутриклеточного Ca²⁺-сигналинга на уровне IP₃Rs- и RyR2-опосредованных механизмов позволяют предположить, что с увеличением продолжительности жизни у самцов вероятность развития гипертрофии миокарда и нарушения сердечного ритма значительно выше, чем у самок.

Ключевые слова: аорта, сердце, возраст, риаинодиновые рецепторы, RyR2, инозитол-1,4,5-трисфосфатные рецепторы, IP₃R, CaM, Epac1,2, Ca²⁺-сигналинг

DOI: 10.31857/S0233475520050084

ВВЕДЕНИЕ

В мире с каждым годом растет численность пожилого населения. С увеличением продолжительности жизни возрастает и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются ведущей причиной смертности во всем мире [1, 2]. С возрастом в сосудах и сердце изменяются структурные и электромеханические свойства гладкомышечных клеток и кардиомиоцитов. Предшественниками или проявлением подобных трансформаций являются изменения уровней

экспрессии генов белков, принимающих участие в регуляции внутриклеточной сигнализации и функциональной активности клеток [3–7]. Знание, в какой степени возрастные изменения способствуют адаптации или развитию сердечно-сосудистых заболеваний, является чрезвычайно важным. Показано, что в процессе физиологического старения целостность структуры миокарда в большей степени сохраняется в женском организме, что может быть одной из причин различия в продолжительности жизни между женщинами и

мужчинами [8]. У пожилых людей возрастает частота и тяжесть мерцательных аритмий, которая играет критическую роль в генезе внезапной сердечной смерти. По результатам эпидемиологического исследования возникновение фибрилляции предсердий (Atrial fibrillation, AF) у пожилых мужчин выше, чем у женщин [7, 9–11]. Полагают, что это связано с более ранним поражением коронарных артерий у мужчин. У женщин AF диагностируется в более пожилом возрасте, чем у мужчин, но у них высок риск развития связанных с AF осложнений. В экспериментах на крысах также продемонстрировано, что возрастные структурные и функциональные изменения в сосудах и миокарде у самцов развиваются раньше, чем у самок [12]. Полагают, что это связано с дефицитом тестостерона, который может вызвать аритмогенную утечку ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула (sarcoplasmic reticulum, SR) [13].

Поддержание внутриклеточного кальциевого гомеостаза имеет решающее значение для нормального функционирования клеток, поскольку Ca^{2+} играет центральную роль в регуляции процессов возбуждения, сокращения, транскрипции и пролиферации клеток. Важнейшую роль в генерации, распространении и регуляции внутриклеточных кальциевых сигналов играют встроенные в мембрану сарко/эндоплазматического ретикула (SR/ER) Ca^{2+} -селективные внутриклеточные каналы — инозитол-1,4,5-трисфосфатные (IP_3R) и рианодинные (RyR) рецепторы. Они регулируют многочисленные физиологические и патологические процессы в организме [14–16]. Нарушения тонуса сосудов и сердечного ритма связывают, в первую очередь, с IP_3R - и RyR2-индуцированной дисрегуляцией внутриклеточного кальциевого обмена [17–19].

Идентифицировано по три изоформы IP_3Rs ($IP_3R1,2,3$) и RyRs (RyR1,2,3) рецепторов [20–22]. В сосудах и миокарде существует региональная гетерогенность в экспрессии изоформ IP_3Rs и RyRs, что, по-видимому, имеет значение в реализации различных физиологических функций, таких как возбудимость, сократимость и экспрессия генов [18, 23–25]. Локализация этих рецепторов на мембране SR/ER также является изоформной и тканеспецифичной [14, 26].

Показано, что в гладкомышечных клетках сосудов (ГМК) наиболее высокоэкспрессируемой изоформой является IP_3R1 , затем со значительной гетерогенностью в экспрессии — IP_3R3 и IP_3R2 , в кардиомиоцитах — RyR2. Активность IP_3Rs и RyRs стимулируется многими эндогенными молекулами, которые действуют через сопряженные с G-белками рецепторы (G protein-coupled receptors — GPCR), и модулируется Ca^{2+} , кальмодулином (CaM), протеинкиназами A и G (PKA и PKG),

активными формами кислорода и др. [27–32]. Агонисты, действующие через Gs-белок, активируют аденилатциклазу, что приводит к повышению концентрации циклического аденозинмонофосфата (сAMP), активации PKA и сAMP-связывающих белков Ерас (Exchange Proteins Directly Activated by сAMP), последующему фосфорилированию IP_3Rs и RyRs и изменению их функциональной активности [16, 33]. Для понимания механизмов, лежащих в основе биологического старения, и выявления возможных факторов риска развития ассоциированных с возрастом сердечно-сосудистых заболеваний нам представлялось важным изучить особенности изменений транскрипционной активности генов IP_3Rs , RyRs и модуляторов их активности — сигнальных белков CaM и Ерас в сосудах и миокарде крыс в зависимости от пола животных.

Цель исследования — оценка возрастных изменений транскрипционной активности генов белков, участвующих в регуляции Ca^{2+} -сигналикации — IP_3Rs , RyRs рецепторов и модуляторов их активности CaM и Ерас в сосудах и миокарде крыс обоего пола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на беспородных крысах самцах и самках в возрасте 4 и 24 мес. Условия содержания животных соответствовали приказу МЗ РФ № 708н “Об учреждении правил лабораторной практики” от 23.08.2010 и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинской декларации (2000).

Включенные в исследование крысы были рандомизированы на 4 группы: 1-я группа — самцы в возрасте 4 мес. (молодые, $n = 10$); 2-я группа — самцы в возрасте 24 мес. (старые, $n = 8$); 3-я группа — самки в возрасте 4 мес. (молодые, $n = 14$); 4-я группа — самки в возрасте 24 мес. (старые, $n = 10$). Наркотизированных (25%-ный раствор уретана, 4 мл/кг) крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали фрагменты сердца и аорты, отмывали от крови в физиологическом растворе натрия хлорида при $4^{\circ}C$, после чего ткани помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и хранили до выделения РНК при температуре $-20^{\circ}C$. Кусочки тканей предсердий, левого желудочка и аорты перетирали в жидком азоте. Выделение РНК из тканей проводили с помощью набора GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Выделенную суммарную РНК для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Синтез кДНК проводили с помощью на-

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых в работе.

Белок	Прямой праймер	Обратный праймер	Праймер с флуоресцентным зондом
RyR2	CAGCAGACTGGAGAGACTGG	CCTTCTTTGATGATATTCAGAG	FAM-GTCCTCTGGTATCCTG-GAGGTC-BHQ1
IP ₃ R3	AACTCAACGAGGGCTTCATC	CATTGTTGGGAACATCGC	FAM-GACCGCAGGTTTGTATC-CAG-BHQ1
IP ₃ R2	CATAGACACAGAGGAAGAGAG	CACACGATGGCAAAGGCT	FAM-CATGCTGAAAATTGG-GACCTGC-BHQ1
IP ₃ R1	CCCTGACTTTGAGGAAGAATG	CACAGAGACCAGAGAGTACACC	FAM-AGCCCTCAGTGGACCCT-GATC-BHQ1
CaM	GGTGGATGCTGATGGCAAT	GTATCTCCTCCTCGCTGTCTG	FAM-CATTGACTTCCCA-GAGTTCCTGAC-BHQ1
Erac1	GCTCCCTGGACTTCAGAGTG	CAAGAGATGACGGTACAGGA	FAM-CTGGAGCAGGCCACCACA-GAG-BHQ1
Erac2	GGACGCCTGTTTGCCTG	CATCTGGTACGCCAAGTCT	FAM-CGACTCACTGACTCCCTTG-CCA-BHQ1

бора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Для синтеза брали 76 нг тотальной РНК. ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRMix-HS (Евроген, Россия), используя праймеры и флуоресцентные зонды (ДНК-синтез, Россия), согласно протоколам производителей на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Полученные значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии для референсного гена. В качестве референсного гена был использован ген β-актина. Уровень экспрессии гена β-актина между сравниваемыми группами (самки 4 и 24 мес.; самцы 4 и 24 мес.) в условиях наших экспериментов оставался неизменным. Изменение уровня экспрессии гена-мишени оценивали по изменению уровня мРНК исследуемого гена/мРНК β-актина. Отрицательные контроли были поставлены согласно общепринятым стандартам к отрицательным контролям при проведении количественной ПЦР: для исключения контаминации реагентов реакция была запущена без фрагментов кДНК; для исключения контаминации кДНК геномной ДНК реакция была запущена с образцом тотальной РНК.

Статистика. Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Дальнейшая обработка проводилась в приложении Microsoft Excel с использованием алгоритма $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистическую значимость различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аорта. В тканях аорты крыс самцов и самок оценивали уровень мРНК рианодиновых (RyR2) и инозитол-1,4,5-трисфосфатных (IP₃R1, IP₃R2, IP₃R3) рецепторов, а также регуляторных белков – CaM, Erac1 и Erac2. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в аорте старых крыс обоего пола (24 мес.) снижается уровень мРНК для IP₃R2 (до 63 и 61% соответственно у самок и самцов) и IP₃R3 (до 62 и 67% соответственно у самок и самцов) и не меняется экспрессия рецепторов IP₃R2-типа по сравнению с аналогичными данными у молодых крыс (4 мес.). Установлено, что у старых крыс независимо от пола животных в сосудах более чем в 1.5 раза возрастает содержание мРНК для RyR2 (до 153% у самцов и до 185% у самок) (рис. 1а).

Вместе с тем отмечают значительные половые отличия в характере возрастных изменений экспрессии генов CaM и белков Erac. Выявлено, что у старых самок в аорте уменьшается уровень мРНК для CaM и Erac1 (соответственно на 30 и 32%) и не меняется для Erac2 по сравнению с аналогичными показателями в сосудах молодых самок (рис. 1б). В отличие от самок в сосудах старых крыс самцов, напротив, возрастает экспрессия белков Erac1 и Erac2 и не меняется для CaM (рис. 1б).

Функция IP₃Rs в сосудах. IP₃Rs играют центральную роль в генерации и поддержании миогенного тонуса сосудов. Однако до сих пор точно неизвестно, в какой степени каждый из трех подтипов IP₃Rs вносит вклад в сложную передачу сигналов Ca²⁺ в клетке. Остается непонятной роль IP₃R сосудов в развитии гипертонии, а имеющиеся данные противоречивы. Полагают, что

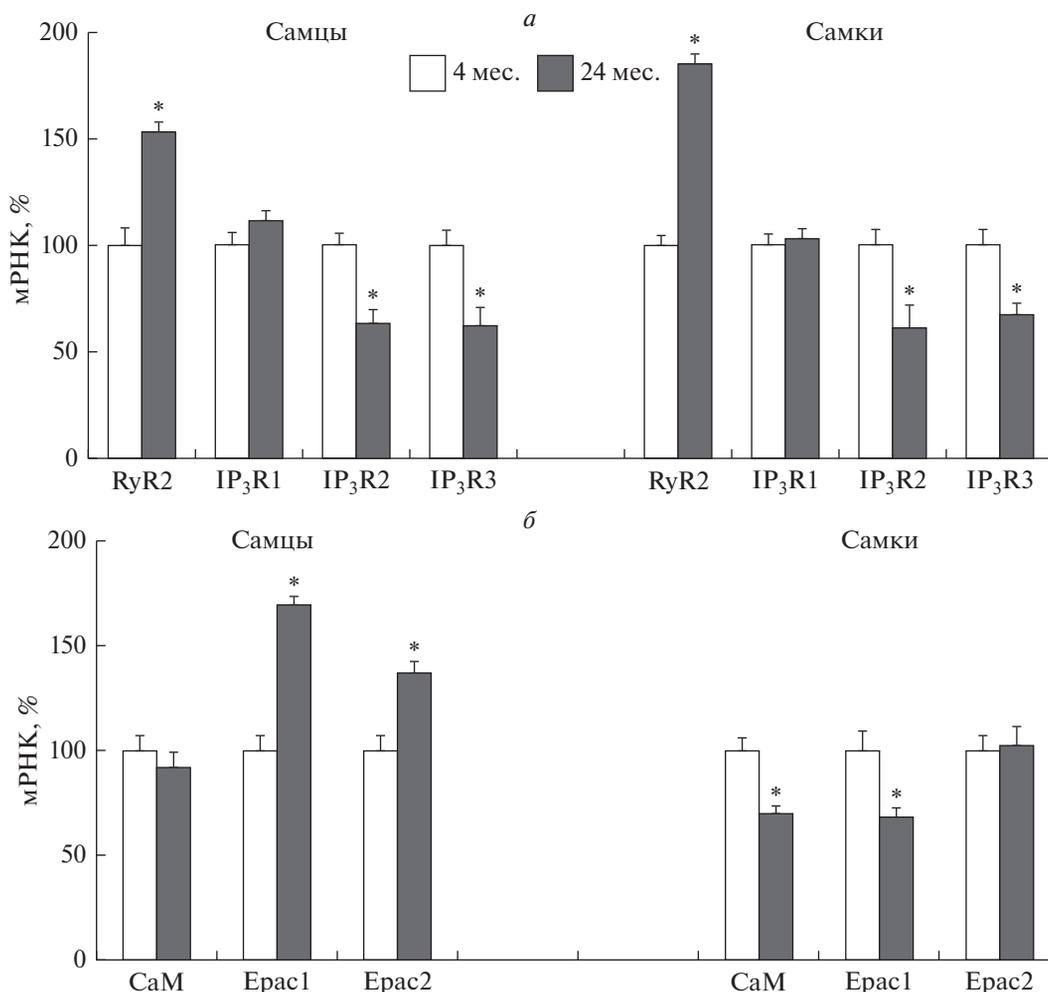


Рис. 1. Возрастные изменения уровня мРНК рианодиновых (RyR2), инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP₃R1, IP₃R2, IP₃R3) (а), кальмодулина (CaM) и белков Erac1, Erac2 (б) в аорте крыс самцов и самок. Значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии референсного гена – β-актина в том же образце ткани. Содержание мРНК каждого исследуемого белка выражено в процентах от среднего значения содержания того же белка в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. * – $p < 0.01$ по сравнению с крысами в возрасте 4 мес.

при гипертонии повышение чувствительности к фенилэфрину вызвано увеличением экспрессии IP₃R1 в ГМК сосудов в результате Ca²⁺-зависимой активации транскрипционного фактора CN-NFAT (calcineurin-Nuclear factor of activated T-cells) [34]. В то же время показано, что в мозговых артериях активация IP₃R1, расположенных в непосредственной близости к Ca²⁺-активируемым калиевым каналам большой проводимости (BK_{Ca}), повышает чувствительность этих каналов к Ca²⁺. По мнению авторов, с помощью этого механизма может ограничиваться IP₃-индуцированная вазоконстрикция в мозговых артериях [35].

В экспериментах на культуре клеток HeLa, которые экспрессируют сопоставимые количества IP₃R1 и IP₃R3, было показано, что подавление

экспрессии подтипа IP₃R1 методом РНК-интерференции приводит к значительному уменьшению суммарных Ca²⁺-сигналов и прекращению осцилляций Ca²⁺ [17]. И, напротив, подавление экспрессии IP₃R3 приводит к более устойчивым и продолжительным колебаниям внутриклеточной концентрации Ca²⁺, чем в контроле. Сходные эффекты нокаута IP₃R3 получены и на клетках COS-7, которые преимущественно экспрессируют IP₃R3 [17]. Эти результаты позволили авторам предположить, что в клетках IP₃R1 и IP₃R3 оказывают противоположные эффекты на генерацию внутриклеточных колебаний Ca²⁺.

В экспериментах на культуре ГМК аорты крысы показано, что пролиферирующие клетки экспрессируют преимущественно IP₃R2 и IP₃R3, но в

процессе их развития экспрессия этих типов рецепторов уменьшается, а IP_3R1 , напротив, увеличивается [36, 37]. Установлено, что IP_3R1 распределены по всей цитоплазме, IP_3R2 тесно связаны с ядром и с плазматической мембраной, IP_3R3 распределены преимущественно вокруг ядра. Показано, что каждая изоформа IP_3Rs может приводить к активации апоптоза [38]. Однако изоформа IP_3R3 играет особую роль в индукции апоптоза преимущественно путем передачи Ca^{2+} -сигналов в митохондрии, поскольку IP_3R3 имеет особую склонность к формированию субклеточных кластеров с митохондриями, что приводит к образованию ассоциированных сигнальных микродоменов. Интересно, что IP_3R3 могут не только активировать, но и ингибировать апоптоз, и этот процесс реализуется по Акт- IP_3R3 -зависимому механизму [39].

Нами было установлено, что одним из проявлений возрастных изменений сосудов является дисбаланс в экспрессии IP_3Rs : снижается экспрессия рецепторов 2 и 3 типов и не изменяется IP_3R1 . Эти изменения в экспрессии подтипов IP_3Rs в стареющих сосудах животных обоего пола, по-видимому, могут быть критичными для различных форм передачи Ca^{2+} -сигналов как в ГМК, так и в эндотелиальных клетках и влиять на сократительные свойства сосудов. Кроме того, можно предположить, что значительное снижение экспрессии IP_3R2 и IP_3R3 типов в аорте старых крыс обоего пола является проявлением возрастного снижения пролиферативной и апоптотической активности ГМК.

Функция *RyRs* в сосудах. Функция $RyRs$ в ГМК менее понятна. Хотя $RyRs$ в гладких мышцах генерируют локальные Ca^{2+} -спарки (sparks), которые аналогичны тем, которые наблюдаются в поперечно-полосатых мышцах, однако вклад этих изменений в вызванное деполяризацией глобальное повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) довольно ограничен. В отличие от сердечной или скелетной мышц, RyR -зависимый Ca^{2+} -индуцированный выброс кальция (calcium-induced calcium release, CICR) не является необходимым для вазоконстрикции, потому что в ГМК сосудов концентрация Ca^{2+} , вызывающая сокращение сосудов, ниже требуемой для RyR -опосредованной активации CICR [40]. В ГМК сосудов RyR -опосредованные Ca^{2+} -спарки сопровождаются активацией VK_{Ca} , что приводит к снижению миогенного тонуса и вазодилатации. Вместе с тем показано, что VK_{Ca} - и RyR -каналы играют разные роли в регуляции миогенного и нейрогенного тонуса: в то время как VK_{Ca} - и RyR -каналы действуют совместно, чтобы противодействовать миогенной вазоконстрикции, VK_{Ca} -каналы противо-

действуют нейрогенной вазоконстрикции, а RyR каналы, напротив, усиливают ее [41]. Авторы полагают, что на уровне нейрогенной вазоконстрикции резистивных артерий $RyRs$ действуют совместно с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами L-типа.

Нами установлено, что в сосудах старых самок и самцов возрастает уровень мРНК $RyR2$ соответственно в 1.9 и 1.5 раз по сравнению с аналогичными показателями у молодых крыс. Вызванное старением повышение экспрессии $RyR2$ и понижение IP_3R2 и IP_3R3 в аорте крыс обоего пола указывают на существенные изменения внутриклеточного обмена Ca^{2+} , но пока неясно, каким образом они влияют на регуляцию миогенного и нейрогенного тонуса сосудов в условиях целостного организма. Кроме того, в процессе старения сосудов изменяется экспрессия важнейших регуляторов активности канальных белков — CaM и $Eras$. Нами выявлено, что на фоне высокой экспрессии $RyR2$ в аорте старых самок наблюдается значительное снижение экспрессии CaM и $Eras1$, в то время как в сосудах самцов уровень мРНК для CaM остается неизменным, но возрастает экспрессия белков $Eras1$ и $Eras2$.

Для $RyRs$ кальций является основным физиологическим регулятором их активности [30, 42]. При умеренном повышении $[Ca^{2+}]_i$ возбуждение $RyRs$ опосредуется через активацию $CaMK$ -зависимого фосфорилирования каналов или путем взаимодействия Ca^{2+} с Ca^{2+} -связывающим белком $S100A$, который конкурирует с CaM за связывание с $RyRs$. Вазодилататоры, которые действуют на рецепторы, связанные с Gs -белком, активируют аденилатциклазу, что приводит к увеличению уровня $cAMP$ и последующей активации PKA - и $Eras$ -опосредованного фосфорилирования $RyRs$, что приводит к увеличению частоты RyR -зависимых локальных кальциевых сигналов, последующей активации VK_{Ca} -каналов и вазодилатации. При высоком уровне $[Ca^{2+}]_i$ активность RyR , напротив, ингибируется через механизмы, включающие Ca^{2+} -связывающие белки сорбин ($SORC$) или CaM [16].

Как и в случае с $RyRs$, высокие уровни внутриклеточного Ca^{2+} ингибируют активность IP_3Rs через CaM -зависимые механизмы. Основными стимулами активации IP_3R являются индуцированное вазоконстрикторами увеличение IP_3 и умеренное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Активация IP_3Rs ионами Ca^{2+} реализуется путем их прямого взаимодействия с каналами или опосредовано через активацию $CaMK$ и последующего фосфорилирования каналов. В отличие от $RyRs$ PKA - или $Eras$ -индуцированное фосфорилирование IP_3Rs приводит к снижению их активности [16].

Таким образом, в процессе старения в аорте крыс развиваются однонаправленные изменения экспрессии генов канальных белков IP_3Rs и $RyR2$, и различные в зависимости от пола крыс изменения экспрессии белков, модулирующих их активность – CaM и $Eras$, что свидетельствует о возрастных изменениях внутриклеточного кальциевого обмена. Можно предположить, что высокий уровень экспрессии $Eras1$ и $Eras2$ в сосудах старых крыс самцов негативно влияет на активность IP_3Rs и позитивно – на $RyRs$, поскольку $Eras$ -индуцированное фосфорилирование приводит к снижению активности первых и повышению вторых. Уменьшение экспрессии CaM в сосудах старых самок, возможно, приводит к снижению его ингибирующего влияния на IP_3Rs и $RyRs$, а $Eras1$ – к снижению активирующего влияния на $RyR2$ и ингибирующего на IP_3Rs . По-видимому, одним из признаков стареющих сосудов, является нарушение тонких механизмов модуляции важнейших ионных каналов, участвующих в регуляции $[Ca^{2+}]_i$, которые имеют определенную специфичность у самок и самцов крыс. Выявленные изменения могут вносить существенный вклад в возраст-иницированную патологию сосудов на уровне их сократительной, пролиферативной и апоптотической активности. Однако не исключено, что некоторые из них могут быть проявлением компенсаторных механизмов, направленных на сохранение Ca^{2+} -гомеостаза в стареющих сосудах.

Сердце. Установлено, что у старых крыс самцов в левом желудочке и обоих предсердиях возрастает уровень мРНК $RyR2$ (рис. 2). У старых самцов в левом желудочке увеличивается содержание мРНК для всех трех типов IP_3Rs , в левом предсердии только для IP_3R1 -типа, в правом предсердии – возрастает для IP_3R3 -типа, но снижается уровень мРНК для IP_3R2 -типа по сравнению с контрольными животными (рис. 2).

Иные возрастные изменения в экспрессии генов $RyR2$ и IP_3Rs выявлены в сердцах старых самок. Установлено, что у самок в процессе старения в левом желудочке в отличие от самцов снижается экспрессия $RyR2$, IP_3R1 и IP_3R3 , в то время как в левом предсердии возрастает уровень мРНК для IP_3R3 -типа, в правом – для рецепторов IP_3R1 - и IP_3R3 -типа (рис. 2). Уровень экспрессии мРНК IP_3R2 -типа в сердцах старых самок не отличается от показателей в сердцах молодых крыс.

В процессе старения в левом желудочке и предсердиях крыс обоего пола значительно возрастает экспрессия CaM и $Eras2$, о чем свидетельствует более высокий уровень их мРНК по сравнению с аналогичными показателями у молодых животных (рис. 3). У старых самцов в сердце остается неизменным уровень мРНК для

$Eras1$, в то время как у самок уровень мРНК данного белка понижается в левом желудочке и, напротив, повышается в левом предсердии (рис. 3).

Известно, что стареющее сердце характеризуется сниженной реакцией на симпатическую стимуляцию, высоким риском развития аритмий и внезапной сердечной смерти [43–45]. Связанную с возрастом электрическую нестабильность и сократительную дисфункцию миокарда связывают прежде всего с нарушением гомеостаза Ca^{2+} . Однако специфические молекулярные механизмы, лежащие в основе измененной регуляции обмена Ca^{2+} в стареющем сердце, остаются недостаточно изученными. Показано, что у пожилых людей снижается функциональная активность синоатриального узла, что, как полагают, связано с возрастным снижением экспрессии основного Ca^{2+} -проводящего канала $SR - RyR2$, а также с изменением экспрессии других ионных каналов – увеличением $Na(v)1.5$, $Na(v)\beta1$ и $Ca(v)1.2$ и снижением $K(v)1.5$ и $HCN1$ [46].

Функция $RyRs$ в сердце. Известно, что $RyR2$ рецепторы являются ключевыми внутриклеточными структурами, реализующими воздействие симпатической нервной системы на миокард. Нами показано, что у старых самцов в левом желудочке и предсердиях значительно возрастает экспрессия $RyR2$, в то время как у самок, напротив, снижается в левом желудочке и не изменяется в предсердиях. Одновременно с изменением экспрессии $RyR2$ в стареющих сердцах крыс обоего пола выявлен высокий уровень экспрессии мРНК белков CaM и $Eras2$. Изменения на уровне транскрипции данных генов могут приводить к чрезмерной активации $RyR2$ и к серьезным нарушениям кальциевого обмена в кардиомиоцитах [25, 47]. Установлено, что чрезмерное повышение активности $RyR2$ в результате их окисления, нитрозилирования или гиперфосфорилирования способствует развитию сердечной недостаточности и возникновению желудочковых аритмий [48, 49]. Известно, что активация β -адренорецепторов (β -AR) может спровоцировать сердечные аритмии через cAMP-зависимые механизмы путем увеличения утечки Ca^{2+} из SR в диастолу. cAMP может активировать как PKA, так и белки $Eras$. В исследованиях с использованием генетических модификаций $Eras1$, $Eras2$, $RyR2$ и $CaMKII$ было показано, что активация $Eras$ и PKA может в равной степени способствовать возникновению β -AR-индуцированных аритмий и утечки Ca^{2+} из SR. Показано, что вызванное β_1 -AR усиление аритмогенных выбросов Ca^{2+} опосредуется $Eras2$ [50]. Аритмогенное действие $Eras2$ было продемонстрировано в многочисленных исследованиях последних лет [47, 51]. Установлено, что β -AR-cAMP- $Eras2$ -PI3K-Akt-NOS1- $CaMKII$ сигнальный каскад опосредует повышенную

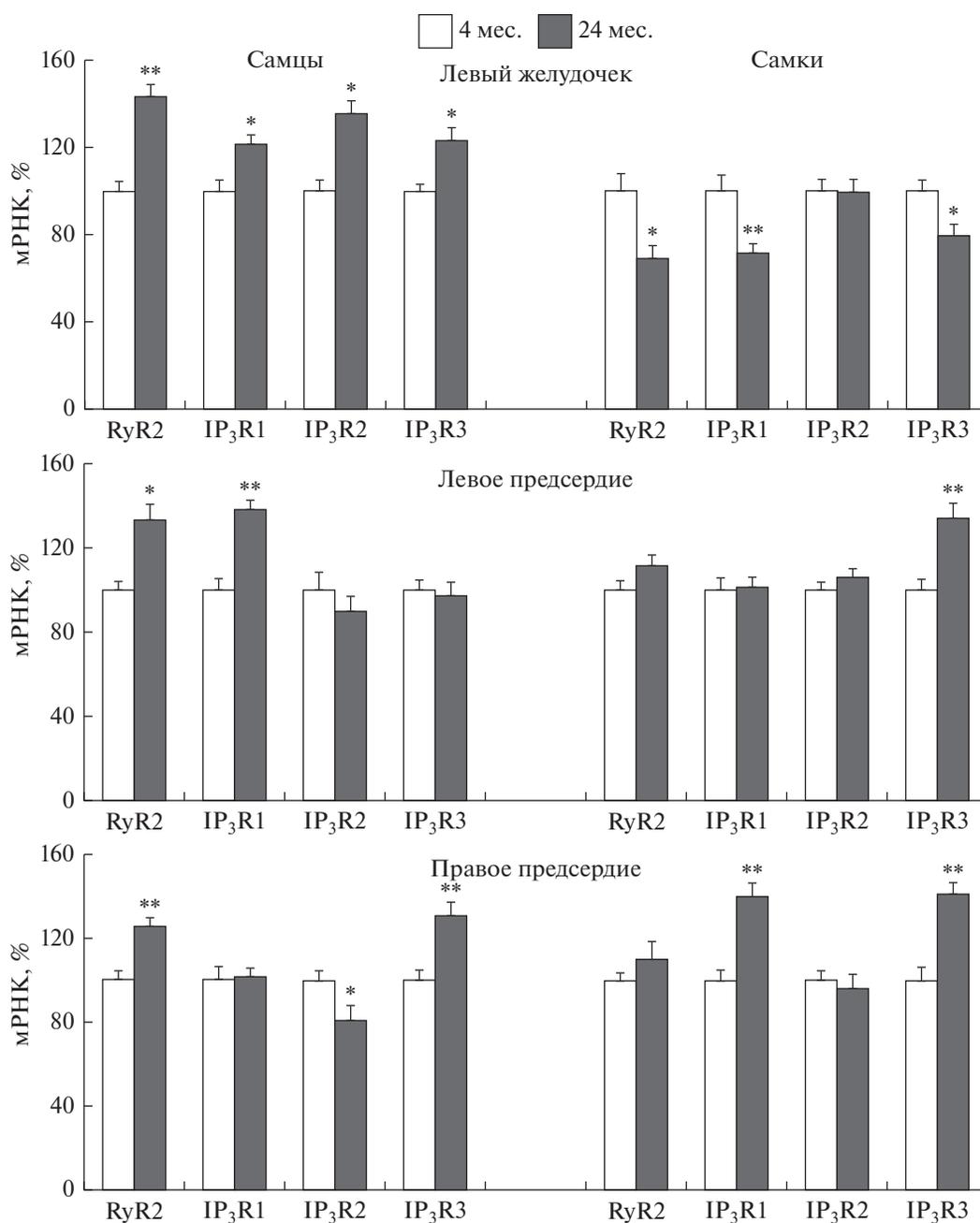


Рис. 2. Возрастные изменения уровня мРНК рианодиновых (RyR2) и инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP₃R1, IP₃R2, IP₃R3) в левом желудочке, левом и правом предсердиях сердца крыс самцов и самок. Значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии референсного гена – β -актина в том же образце ткани. Содержание мРНК каждого исследуемого белка выражено в процентах от среднего значения содержания того же белка в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению с крысами в возрасте 4 мес.

(патологическую) утечку Ca^{2+} из SR в диастолу, в то время как с помощью сАМР-РКА-пути реализуются главным образом инотропный и люситропный эффекты β -AR [52].

В кардиомиоцитах СаМ регулирует активность RyR2 путем прямого взаимодействия с ними, а также через СаМКП, которые фосфорилиру-

ют как RyR2, так и IP₃Rs [53]. СаМ снижает вероятность открытия RyR2 при субмикромольной (диастолической) и микромольной (систолической) концентрациях Ca^{2+} . В последние годы получены данные о ключевой роли СаМ в механизмах развития гипертрофии сердца. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что подавление

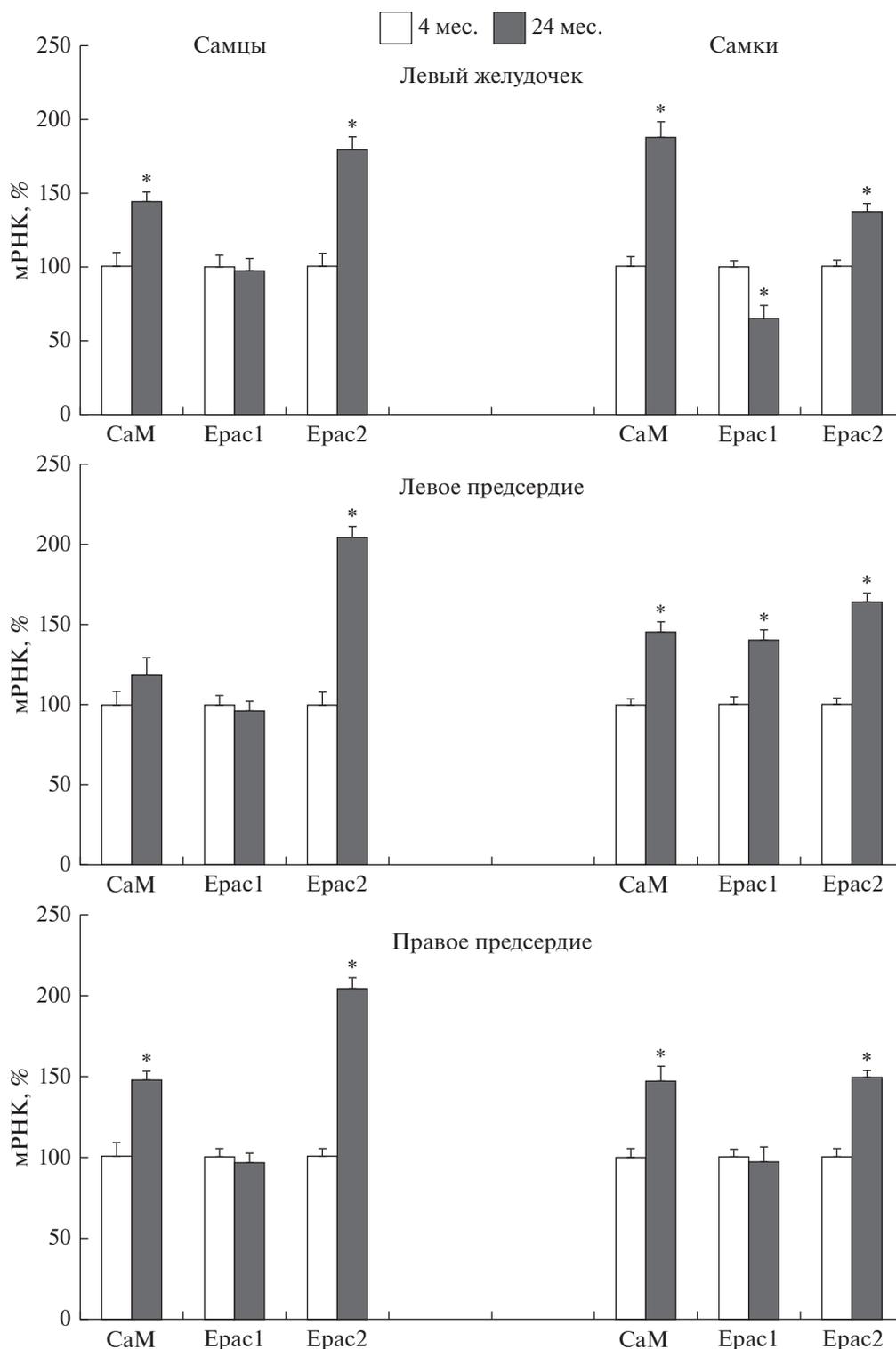


Рис. 3. Возрастные изменения уровня мРНК кальмодулина (CaM) и белков Ерас1, Ерас2 в левом желудочке, левом и правом предсердиях сердца крыс самцов и самок. Значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии референсного гена – β -актина в том же образце ткани. Содержание мРНК каждого исследуемого белка выражено в процентах от среднего значения того же белка в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. * – $p < 0.01$ по сравнению с крысами в возрасте 4 мес.

экспрессии гена CaM с помощью микроРНК оказывает выраженное антигипертрофическое действие [54]. Установлено, что точечные мутации в CaM-связывающем домене RyR2 (W3587A/L3591D/F3603A) у мышей приводят к тяжелой гипертрофии сердца, резкому снижению инотропной функции левого желудочка и ранней смерти животных [55, 56]. Полученные нами данные о высоком уровне экспрессии RyR2, CaM и Eras2 в сердцах старых животных, позволяют предположить, что у самцов вероятность развития гипертрофии миокарда и возникновения желудочковых аритмий значительно выше, чем у самок (рис. 2, 3).

Функция IP_3Rs в сердце. Если роль RyR2 как рецептора, регулирующего высвобождение Ca^{2+} из SR, необходимого для реализации электромеханического сопряжения кардиомиоцитов, очевидна, то до настоящего времени нет четкого представления о вкладе IP_3Rs в этот процесс. В физиологических условиях в кардиомиоцитах, в отличие от невозбудимых клеток, низкий уровень Gq-индуцированной генерации IP_3 и слабый ответ на него IP_3R [18]. Роль IP_3Rs в патофизиологии, особенно в аритмогенезе и гипертрофии миокарда, более очевидна. В настоящее время доказано, что в глобальном увеличении $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах доля IP_3R -индуцированного высвобождения Ca^{2+} из SR незначительна, что делает их вклад в регуляцию процесса электромеханического сопряжения кардиомиоцитов минимальным. Полагают, что важным условием активации IP_3Rs является их локализация в субсарколеммальной зоне, т.е. в непосредственной близости от места генерации IP_3 [18].

В настоящем исследовании нами были выявлены половые различия возрастных изменений уровня экспрессии рецепторов IP_3R1 – IP_3R3 типов в левом желудочке сердец старых крыс. Так, у старых самцов в левом желудочке экспрессия IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 была значительно выше, а у самок, напротив, ниже (IP_3R1 и IP_3R3), чем в сердцах молодых крыс.

В сердце IP_3R1 локализуется преимущественно в проводящих, а IP_3R2 в сократительных кардиомиоцитах, причем в кардиомиоцитах желудочков IP_3R2 находятся преимущественно в области перинуклеарной мембраны [57, 58]. Клетки предсердий экспрессируют большее количество IP_3Rs по сравнению с кардиомиоцитами желудочков. В них в основном преобладают IP_3Rs 1 и 2 типа [59]. В предсердиях количество IP_3R2 в 6–10 раз больше, чем в желудочках, и в SR они находятся в непосредственной близости от сарколеммы в тесной близости с RyRs [57, 58]. Было показано, что агонист-индуцированная активация фосфолипазы C (PLC) в кардиомиоцитах предсердий вызы-

вает возникновение локальных Ca^{2+} -спарков, которые могут передаваться на расположенные рядом RyR2 и усиливать ответ CICR, и, таким образом, IP_3Rs могут влиять на процесс электромеханического сопряжения в предсердиях [60]. Полагают, что IP_3R -вызванная активация RyR2, других ионных каналов и обменников, в частности Ca^{2+} -каналов L-типа и Na^+/Ca^{2+} -обменника, может приводить к фибрилляции предсердий [59].

С учетом данных литературы о преимущественной локализации IP_3R1 типа в проводящих кардиомиоцитах, можно предположить, что увеличение экспрессии данной изоформы рецепторов в левом желудочке и левом предсердии старых крыс самцов является фактором риска развития у них аритмий. Кроме того, высокий уровень экспрессии IP_3R2 в левом предсердии также может провоцировать фибрилляцию предсердий, поскольку их роль в аритмогенезе доказана [61, 62].

Показано, что ось GPCR/ IP_3R модулирует не только нарушения сердечного ритма, но и развитие гипертрофии. Имеются убедительные данные о причастности IP_3R2 к развитию гипертрофии миокарда в условиях повышенной экспрессии этих рецепторов и/или их чрезмерной активации в результате агонист-индуцированного сигналинга от GPCR [63], и эти механизмы реализуются на уровне ядерных мембран.

В последние годы все больше внимания уделяется изучению особенностей передачи Ca^{2+} -сигналов в ядрах кардиомиоцитов и их роли в регуляции транскрипции генов [64, 65]. На транскрипцию генов и рост клеток оказывают влияние ядерные сигналы Ca^{2+} , которые отличаются от сигналов цитозольного Ca^{2+} . Регуляция внутриядерной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{nuc}$) осуществляется главным образом посредством пассивной диффузии ионов из цитоплазмы. Однако в ядре имеется дополнительный источник Ca^{2+} , полностью независимый от цитозольного, – это ядерная мембрана (nuclear envelope, NE), которая представляет собой клеточный компартмент с собственным перинуклеарным хранилищем Ca^{2+} [66]. В NE экспрессируются белки, регулирующие трафик Ca^{2+} , включая IP_3R , обращенные как к нуклеоплазме, так и цитоплазме [67]. Специфические стимулы GPCR могут через IP_3R -опосредованное высвобождение Ca^{2+} из NE увеличивать $[Ca^{2+}]_{nuc}$ независимо от концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле клетки ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) [68]. В отличие от глобального увеличения $[Ca^{2+}]_{cyt}$, в настоящее время считается, что центральную роль в регуляции экспрессии генов в кардиомиоцитах играет локальный прирост $[Ca^{2+}]_{nuc}$.

Структурная организация передачи Ca^{2+} -сигналов в ядре может включать в себя как рецепто-

ры и генерацию IP_3 на мембранах Т-каналцев кардиомиоцитов желудочков, находящихся в непосредственной близости от ядра, так и GPCR-комплексы, локализованные на NE [64, 65]. Известно, что в кардиомиоцитах желудочков IP_3R2 -типа сконцентрированы в NE [69]. Специфические стимулы GPCR, такие как эндотелин 1, ангиотензин II и др., могут через IP_3R2 -опосредованное высвобождение Ca^{2+} из NE увеличивать $[Ca^{2+}]_{nuc}$ независимо от $[Ca^{2+}]_{cyt}$ [68]. Локализованные на NE IP_3R2 ассоциированы с CaM, CaMKII. Активация CaMKII-зависимой ядерной сигнализации запускает фосфорилирование гистоновых деацетилаз класса II (HDAC) и экспорт ядерных HDAC, что приводит к активации MEF2-зависимой транскрипции различных генов (myocyte enhancer factor-2) [70]. Также активируется и CaN-NFAT транскрипционный путь. Наличие локальных Ca^{2+} -зависимых механизмов IP_3R2 -опосредованной регуляции проницаемости ядерных пор для трафика транскрипционных факторов в кардиомиоцитах взрослых крыс предполагает вовлеченность IP_3R2 в развитие у старых самцов патологической гипертрофии левого желудочка. В пользу данного предположения свидетельствует высокий уровень экспрессии IP_3R2 , а также CaM в кардиомиоцитах левого желудочка крыс в возрасте 24 мес. по сравнению с аналогичными показателями у молодых крыс.

В отличие от самцов у старых самок высока вероятность развития мерцательной аритмии, поскольку в процессе старения в правом предсердии сердца самок значительно возрастает уровень экспрессии IP_3R1 . Повышение уровня IP_3Rs наблюдается и в кардиомиоцитах предсердий у пациентов с хронической фибрилляцией предсердий [71, 72]. В отличие от самцов у старых самок риск развития желудочковых аритмий, как и их гипертрофии минимален, поскольку у них в левом желудочке выявлен низкий уровень экспрессии RyR2, IP_3R1 и IP_3R3 и неизменный – для IP_3R2 -типа.

Установлено, что IP_3R3 -изоформа рецепторов причастна к развитию различных заболеваний человека [73]. Однако менее изучена роль IP_3R3 в регуляции сердечной деятельности в норме и при патологии. Известно, что IP_3R3 -зависимый Ca^{2+} -сигналинг необходим для NO-индуцированной дифференцировки кардиомиоцитов, полученных из эмбриональных стволовых клеток [74]. С учетом вышеизложенных данных о важном вкладе IP_3R3 в модуляцию генерации Ca^{2+} -осцилляций [17] можно предположить, что значительное увеличение экспрессии данных рецепторов в кардиомиоцитах крыс обоего пола в сочетании с измененной экспрессией RyR2, IP_3R1 и IP_3R2 свидетельствует о переходе на новый уровень

регуляции внутриклеточного кальциевого обмена в сердцах старых крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение является естественным процессом увядания функциональной активности организма на уровне всех систем и органов, что приводит к перепрограммированию профиля экспрессии генов, которые направлены в первую очередь на поддержание жизнедеятельности в условиях меняющихся потребностей организма, т.е. носят адаптивный характер. Важнейшую роль в этих процессах играет цитозольный и ядерный Ca^{2+} -сигналинг. Вместе с тем, с учетом полученных данных есть все основания полагать, что в процессе старения организма в ГМК и кардиомиоцитах происходят значительные изменения на уровне регуляции внутриклеточного кальциевого обмена, которые могут вносить существенный вклад в развитие ассоциированных с возрастным сердечно-сосудистых заболеваний. Выявленные гендерные возрастные различия в транскрипционной активности генов, участвующих в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} -сигналинга на уровне IP_3Rs - и RyR2-опосредованных механизмов позволяют предположить, что с увеличением продолжительности жизни у самцов вероятность развития гипертрофии миокарда и нарушения сердечного ритма значительно выше, чем у самок. Возрастные изменения в уровне экспрессии генов RyR2 и IP_3Rs и модуляторов их активности – CaM и Epac в аорте также могут негативно отразиться на сократительной активности сосудов в старости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lakatta E.G. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? 2015. *J. Mol. Cell Cardiol.* **83**, 1–13.
2. de Almeida A.J.P.O., Ribeiro T.P., de Medeiros I.A. 2017. Aging: Molecular pathways and implications on the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 7941563.
3. Sheydina A., Riordon D.R., Boheler K.R. 2011. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin. Sci. (Lond)*. **121** (8), 315–329.
4. Thijssen D.H., Carter S.E., Green D.J. 2016. Arterial structure and function in vascular ageing: Are you as old as your arteries? *J. Physiol.* **594** (8), 2275–2284.
5. Saeed Y., Temple I.P., Borbas Z., Atkinson A., Yanni J., Maczewski M., Mackiewicz U., Aly M., Logantha S.J.R.J., Garratt C.J., Dobrzynski H. 2018. Structural and functional remodeling of the atrioventricular node with aging in rats: The role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated and ryanodine 2 channels. *Heart Rhythm.* **15** (5), 752–760.
6. Wirth A., Wang S., Takefuji M., Tang C., Althoff T.F., Schweda F., Wettschreck N., Offermanns S. 2016. Age-dependent blood pressure elevation is due to in-

- creased vascular smooth muscle tone mediated by G-protein signaling. *Cardiovascular Research*. **109**, 131–140.
7. Lin Y.K., Chen Y.A., Lee T.I., Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J. 2018. Aging modulates the substrate and triggers remodeling in atrial fibrillation. *Circ. J.* **82** (5), 1237–1244.
 8. Olivetti G., Giordano G., Corradi D., Melissari M., Lagrasta C., Gambert S.R., Anversa P. 1995. Gender differences and aging: Effects on the human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26** (4), 1068–1079.
 9. Magnani J.W., Moser C.B., Murabito J.M., Nelson K.P., Fontes J.D., Lubitz S.A., Sullivan L.M., Ellinor P.T., Benjamin E.J. 2012. Age of natural menopause and atrial fibrillation: The framingham heart study. *Am. Heart J.* **163** (4), 729–734.
 10. Magnani J.W., Moser C.B., Murabito J.M., Sullivan L.M., Wang N., Ellinor P.T., Vasan R.S., Benjamin E.J., Coviello A.D. 2014. Association of sex hormones, aging, and atrial fibrillation in men: The framingham heart study. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **7** (2), 307–712.
 11. Kavousi M. 2020. Differences in epidemiology and risk factors for atrial fibrillation between women and men. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 3.
 12. Al-Gburi S., Deussen A.J., Galli R., Muders M.H., Zatschler B., Neisser A., Müller B., Kopalani I. 2017. Sex-specific differences in age-dependent progression of aortic dysfunction and related cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **312** (5), R835–R849.
 13. Tsuneda T., Yamashita T., Kato T., Sekiguchi A., Sagara K., Sawada H., Aizawa T., Fu L.T., Fujiki A., Inoue H. 2009. Deficiency of testosterone associates with the substrate of atrial fibrillation in the rat model. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **20** (9), 1055–1060.
 14. Ghosh D., Syed A.U., Prada M.P., Nystoriak M.A., Santana L.F., Nieves-Cintrón M., Navedo M.F. 2017. Calcium channels in vascular smooth muscle. *Adv. Pharmacol.* **78**, 49–87.
 15. Sun M.Y., Geyer M., Komarova Y.A. 2017. IP₃ Receptor signaling and endothelial barrier function. *Cell Mol. Life Sci.* **74** (22), 4189–4207.
 16. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. 2017. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr. Physiol.* **7** (2), 485–581.
 17. Hattori M., Suzuki A.Z., Higo T., Miyauchi H., Michikawa T., Nakamura T., Inoue T., Mikoshiba K. 2004. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *Biol. Chem.* **279** (12), 11967–11975.
 18. Woodcock E.A., Matkovich S.J. 2005. Ins(1,4, 5)P₃ receptors and inositol phosphates in the heart—evolutionary artefacts or active signal transducers? *Pharmacol. Ther.* **107**(2), 240–251.
 19. Greiser M. 2017. Calcium signalling silencing in atrial fibrillation. *J. Physiol.* **595** (12), 4009–4017.
 20. Foskett J.K., White C., Cheung K.H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
 21. Lanner J.T., Georgiou D.K., Joshi A.D., Hamilton S.L. 2010. Ryanodine receptors: Structure, expression, molecular details and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (11), a003996.
 22. Mak D.O., Foskett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium.* **58**, 67–78.
 23. Grayson T.H., Haddock R.E., Murray T.P., Wojcikiewicz R.J., Hill C.E. 2004. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries. *Cell Calcium.* **36**, 447–458.
 24. Narayanan D., Adebisi A., Jaggar J.H. 2012. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **302** (11), H2190–H2210.
 25. Meissner G. 2017. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J. Gen. Physiol.* **149** (12), 1065–1089.
 26. Zhao G., Adebisi A., Blaskova E., Xi Q., Jaggar J.H. 2008. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate UTP-induced cation currents, Ca²⁺ signals, and vasoconstriction in cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C1376–C1384.
 27. Serysheva I.I. 2014. Toward a high-resolution structure of IP₃R channel. *Cell Calcium.* **56** (3), 125–132.
 28. Rossi A.M., Taylor C.W. 2004. Ca²⁺ regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: Can Ca²⁺ function without calmodulin? *Mol. Pharmacol.* **66** (2), 199–203.
 29. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
 30. Seo M.D., Enomoto M., Ishiyama N., Stathopoulos P.B., Ikura M. 2015. Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (9), 1980–1991.
 31. Amador F.J., Stathopoulos P.B., Enomoto M., Ikura M. 2013. Ryanodine receptor calcium release channels: Lessons from structure-function studies. *FEBS J.* **280** (21), 5456–5470.
 32. Van Petegem F. 2015. Ryanodine receptors: Allosteric ion channel giants. *J. Mol. Biol.* **427**, 31–53.
 33. Dobrev D., Wehrens X.H. 2014. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ. Res.* **114** (8), 1311–1319.
 34. Abou-Saleh H., Pathan A.R., Daalis A., Hubrack S., Abou-Jassoum H., Al-Naeimi H., Rusch N.J., Machaca K. 2013. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca²⁺ release and vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* **288** (46), 32941–32951.
 35. Zhao G., Neeb Z.P., Leo M.D., Pachau J., Adebisi A., Ouyang K., Chen J., Jaggar J.H. 2010. Type 1 IP₃ receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* **136**, 283–291.
 36. Tasker P.N., Michelangeli F., Nixon G.F. 1999. Expression and distribution of the type 1 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in developing vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **84**, 536–542.
 37. Tasker P.N., Taylor C.W., Nixon G.F. 2000. Expression and distribution of InsP(3) receptor subtypes in proliferating

- erating vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 907–912.
38. Mendes C.C., Gomes D.A., Thompson M., Souto N.C., Goes T.S., Goes A.M., Rodrigues M.A., Gomez M.V., Nathanson M.H., Leite M.F. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca^{2+} signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280** (49), 40892–40900.
 39. Marchi S., Marinello M., Bononi A., Bonora M., Giorgi C., Rimessi A., Pinton P. 2012. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca^{2+} release and apoptosis. *Cell Death. Dis.* **3** (5), e304.
 40. Guerrero-Hernández A., Gómez-Viquez L., Guerrero-Serna G., Rueda A. 2002. Ryanodine receptors in smooth muscle. *Front. Biosci.* **7**, d1676–1688.
 41. Krishnamoorthy G., Sonkusare S.K., Heppner T.J., Nelson M.T. 2014. Opposing roles of smooth muscle BK channels and ryanodine receptors in the regulation of nerve-evoked constriction of mesenteric resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **306** (7), H981–H988.
 42. Van Petegem F. 2012. Ryanodine receptors: Structure and function. *J. Biol. Chem.* **287** (38), 31624–31632.
 43. de Lucia C., Eguchi A., Koch W.J. 2018. New insights in cardiac β -adrenergic signaling during heart failure and aging. *Front. Pharmacol.* **9**, 904.
 44. Hamilton S., Terentyev D. 2019. Altered intracellular calcium homeostasis and arrhythmogenesis in the aged heart. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (10), E2386.
 45. Federico M., Valverde C.A., Mattiazzi A., Palomeque J. 2020. Unbalance between sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake and release: A first step toward Ca^{2+} triggered arrhythmias and cardiac damage. *Front. Physiol.* **10**, 1630.
 46. Tellez J.O., Mczewski M., Yanni J., Sutyagin P., Mackiewicz U., Atkinson A., Inada S., Beresewicz A., Billeter R., Dobrzynski H., Boyett M.R. 2011. Ageing-dependent remodelling of ion channel and Ca^{2+} clock genes underlying sino-atrial node pacemaking. *Exp. Physiol.* **96** (11), 1163–1178.
 47. Ruiz-Hurtado G., Morel E., Domínguez-Rodríguez A., Llach A., Lezoualc'h F., Benitah J.P., Gomez A.M. 2013. Epac in cardiac calcium signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **58**, 162–171.
 48. Marx S.O., Marks A.R. 2013. Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: New insights into complex cardiovascular diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **58**, 225–231.
 49. Houser S.R. 2014. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* **114** (8), 1320–1327.
 50. Pereira L., Cheng H., Lao D.H., Na L., van Oort R.J., Brown J.H., Wehrens X.H., Chen J., Bers D.M. 2013. Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and arrhythmia. *Circulation.* **127** (8), 913–922.
 51. Schmidt M., Dekker F.J., Maarsingh H. 2013. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): A multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol. Rev.* **65** (2), 670–709.
 52. Pereira L., Bare D.J., Galice S., Shannon T.R., Bers D.M. 2017. β -Adrenergic induced SR Ca^{2+} leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **108**, 8–16.
 53. Urrutia J., Aguado A., Muguza-Montero A., Núñez E., Malo C., Casis O., Villarroel A. 2019. The crossroad of ion channels and calmodulin in disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2), E400.
 54. Zhou X., Sun F., Luo S., Zhao W., Yang T., Zhang G., Gao M., Lu R., Shu Y., Mu W., Zhuang Y., Ding F., Xu C., Lu Y. 2017. Let-7a is an antihypertrophic regulator in the heart via targeting calmodulin. *Int. J. Biol. Sci.* **13** (1), 22–31.
 55. Arnáiz-Cot J.J., Damon B.J., Zhang X.H., Cleemann L., Yamaguchi N., Meissner G., Morad M. 2013. Cardiac calcium signalling pathologies associated with defective calmodulin regulation of type 2 ryanodine receptor. *J. Physiol.* **591** (17), 4287–4299.
 56. Yamaguchi N., Chakraborty A., Huang T-Q., Xu L., Gomez A.C., Pasek D.A., Meissner G. 2013. Cardiac hypertrophy associated with impaired regulation of cardiac ryanodine receptor by calmodulin and S100A1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **305** (1), H86–H94.
 57. Lipp P., Laine M., Tovey S.C., Burrell K.M., Berridge M.J., Li W., Bootman M.D. 2000. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr. Biol.* **10** (15), 939–942.
 58. Kockskämper J., Zima A.V., Roderick H.L., Pieske B., Blatter L.A., Bootman M.D. 2008. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45** (2), 128–147.
 59. Kim J.C., Son M.J., Subedi K.P., Li Y., Ahn J.R., Woo S.H. 2010. Atrial local Ca^{2+} signaling and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **103** (1), 59–70.
 60. Zima A.V., Blatter L.A. 2004. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *J. Physiol.* **555** (3), 607–615.
 61. Ju Y.K., Woodcock E.A., Allen D.G., Cannell M.B. 2012. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and pacemaker rhythms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53** (3), 375–381.
 62. Kapoor N., Tran A., Kang J., Zhang R., Philipson K.D., Goldhaber J.I. 2015. Regulation of calcium clock-mediated pacemaking by inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial nodal cells. *J. Physiol.* **593** (12), 2649–2663.
 63. Nakayama H., Bodi I., Maillet M., De Santiago J., Domeier T.L., Mikoshiba K., Lorenz J.N., Blatter L.A., Bers D.M., Molkentin J.D. 2010. The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ. Res.* **107** (5), 659–666.
 64. Wu X., Zhang T., Bossuyt J., Li X., McKinsey T.A., Dedman J.R., Olson E.N., Chen J., Brown J.H., Bers D.M. 2006. Local InsP3-dependent perinuclear Ca^{2+} signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J. Clin. Invest.* **116** (3), 675–682.
 65. Kockskämper J., Seidlmayer L., Walther S., Hellenkamp K., Maier L.S., Pieske B. 2008. Endothelin-1 enhances nuclear Ca^{2+} transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P3-dependent Ca^{2+} release from perinuclear Ca^{2+} stores. *J. Cell. Sci.* **121** (2), 186–195.

66. Ljubojevic S., Radulovic S., Leitinger G., Sedej S., Sacherer M., Holzer M., Winkler C., Pritz E., Mittler T., Schmidt A., Sereinigg M., Wakula P., Zissimopoulos S., Bisping E., Post H., Marsche G., Bossuyt J., Bers D.M., Kockskämper J., Pieske B. 2014. Early remodeling of perinuclear Ca²⁺ stores and nucleoplasmic Ca²⁺ signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation*. **130** (3), 244–255.
67. Echevarría W., Leite M.F., Guerra M.T., Zipfel W.R., Nathanson M.H. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **5** (5), 440–446.
68. Ljubojevic S., Bers D.M. 2015. Nuclear calcium in cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **65** (3), 211–217.
69. Zima A.V., Bare D.J., Mignery G.A., Blatter L.A. 2007. IP3-dependent nuclear Ca²⁺ signalling in the mammalian heart. *J. Physiol.* **584** (2), 601–611.
70. Bossuyt J., Helmstadter K., Wu X., Clements-Jewery H., Haworth R.S., Avkiran M., Martin J.L., Pogwizd S.M., Bers D.M. 2008. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circ. Res.* **102** (6), 695–702.
71. Liang X., Xie H., Zhu P.H., Hu J., Zhao Q., Wang C.S., Yang C. 2009. Enhanced activity of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in atrial myocytes of atrial fibrillation patients. *Cardiology*. **114** (3), 180–191.
72. Yamada J., Ohkusa T., Nao T., Ueyama T., Yano M., Kobayashi S., Hamano K., Esato K., Matsuzaki M. 2002. Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation. *J. Cardiol.* **39**, 57–58.
73. Mangla A., Guerra M.T., Nathanson M.H. 2020. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A calcium channel for all seasons. *Cell Calcium*. **85**, 102132.
74. Wei W., Huang W., Yue J. 2016. Requirement of IP3 receptor 3 (IP3R3) in nitric oxide induced cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Exp. Cell Res. Actions*. **346** (1), 9–16.

Sex Differences in Age-Related Changes in the Expression of Ryanodine Receptors RyR2 and Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptors IP₃R1,2,3 and of Their Modulators CaM and Epac in Rat Aorta and Myocardium

L. M. Kozhevnikova¹, *, I. F. Sukhanova¹, N. P. Semenova¹, and S. A. Kryzhanovskii²

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

²Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315 Russia

*e-mail: lubovmih@yandex.ru

The study was aimed at the assessment of age-related changes in the transcriptional activity of genes involved in the regulation of Ca²⁺ signaling, specifically of the genes of IP₃R and RyR and of their activity modulators CaM and Epac, in the vessels and myocardium of rats of both sexes. Expression was evaluated by the content of the mRNA of the studied protein related to the content of β -actin mRNA. It was shown that upon aging, unidirectional changes in the expression of genes encoding IP₃Rs and RyR2 develop in the aorta of rats of both sexes, as well as various, sex-specific changes in the expression of genes of proteins CaM and Epac that modulate the activity of IP₃R and RyR. In the vessels of old rats (24 months) of both sexes, relative levels of mRNA for IP₃R of types 2 and 3 were reduced but remained unchanged for IP₃R1 and significantly increased for RyR2 as compared with these indicators in young rats (4 months). In the aorta of old females, the relative mRNA content was reduced for CaM and Epac1 but remained unchanged for Epac2; in males, on the contrary, the expression of Epac1 and Epac2 was increased by 67% and 50%, respectively, as compared with corresponding parameters in young rats (4 months), but was not changed for CaM, which indicates gender differences in the violation of the subtle mechanisms of modulation of RyR2 and IP₃Rs activity in blood vessels. Significant changes were revealed in the myocardium of old rats. In older males, an elevated expression was demonstrated for RyR2, IP₃R1,2,3 in the left ventricle, for RyR2 and IP₃R1 in the left atrium, and for RyR2 and IP₃R3 in the right atrium. In contrast to males, in the left ventricle of females the mRNA content for RyR2 and IP₃R1,2,3 was significantly lower than in young animals. In old females, the right atrium exhibited high expression levels of IP₃R1 and IP₃R3, and in the left atrium the expression level of IP₃R3 was increased. In all parts of the heart of females, the expression of IP₃R2 was unchanged. In the myocardium of old rats of both sexes, the expression of proteins CaM and Epac2 increased significantly. The revealed age-related differences in the transcriptional activity of genes involved in the regulation of intracellular Ca²⁺ signaling at the level of IP₃Rs and RyR2-mediated mechanisms suggest that with increasing life expectancy in males, the likelihood of developing myocardial hypertrophy and heart rhythm disturbance is significantly higher than in females.

Keywords: aorta, heart, age, ryanodine receptors, RyR2, inositol-1,4,5-trisphosphate receptors, IP₃R, CaM, Epac1,2, Ca²⁺ signaling

УДК 577.352.333

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

© 2020 г. Ю. Н. Валитова^а, *, В. Р. Хабибрахманова^б, А. В. Белкина^б,
А. Г. Ренкова^а, Ф. В. Минибаева^а

^аКазанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, 420111 Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Казанский национальный исследовательский технологический университет”,
Казань, 420015 Россия

*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 01.08.2020 г.

Большинство сельскохозяйственных культур испытывают серьезные угрозы от воздействия различных абиотических стрессоров. Биологическая мембрана является первичным защитным барьером при действии стрессовых факторов и выступает в роли своеобразной мишени, принимающей удар на себя. Мембранные липиды являются важным компонентом, от которого зависит состояние растительной мембраны, степень ее проницаемости для ионов, микровязкость, а также работа мембраносвязанных ферментных комплексов. Целью настоящего исследования явилось изучение липидного профиля в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при направленном изменении состояния мембран специфическими агентами: CaCl₂ (1 мМ) и β-ситостерином (0.5 мМ), уплотняющими мембрану, а также каналоформером нистатином (0.1 мМ) и детергентом тритоном X-100 (16 мкМ), увеличивающими ее проницаемость. Установлено, что стабилизация мембран CaCl₂ не приводила к изменениям в липидном составе клеток корней пшеницы, при этом индекс стабильности и степень упорядоченности мембран увеличивались. Насыщение мембран β-ситостерином также вызывало увеличение мембранной стабильности и упорядоченности липидного бислоя, что сопровождалось увеличением содержания стерина и моногалактозилдиацилглицерида и снижением уровня фосфатидилхолина и гликоцерамидов. Действие нистатина на интактные проростки не влияло на стабильность и упорядоченность мембран, несмотря на снижение общего уровня стерина в клетках корней пшеницы. Повреждение мембран клеток корней тритоном X-100, проявлявшееся в значительном увеличении выхода электролитов и снижении упорядоченности бислоя, сопровождалось увеличением в липидном профиле доли терпеноидов.

Ключевые слова: пшеница, стерин, фосфолипиды, мембранотропные вещества, проницаемость, микровязкость

DOI: 10.31857/S0233475520060080

ВВЕДЕНИЕ

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений является предметом пристального внимания исследователей в течение многих лет. Актуальная задача – выявление эндогенных механизмов защиты растений, в том числе опосредованных изменением состояния клеточных мембран. При воздействии абиотических стрессовых факторов окружающей среды на растение клеточная мембрана выступает в роли своеобразной мишени, принимая удар на себя, что зачастую может привести к ее повреждению, нарушению деятельности растительной клетки и

гибели организма в целом [1]. В естественных условиях растения постоянно подвергаются различным стрессовым воздействиям: колебания температуры (перегрев и охлаждение), засуха, засоление, окислительный стресс. При действии стрессовых факторов биологические мембраны претерпевают изменения биофизических параметров – текучести и проницаемости. Несмотря на возможные различия в механизмах действия, естественные абиотические стрессоры могут приводить к последствиям, схожим с действием мембранотропных агентов тритона и нистатина (увеличение проницаемости мембран) или кальция и ситостерина (увеличение микровязкости и

уменьшение проницаемости). Так, в литературе имеется достаточно информации о стресс-индуцированных изменениях мембранных характеристик. В частности, показано увеличение проницаемости мембран клеток кукурузы в условиях засухи [2], при солевом стрессе в корнях гидропонной культуры *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* [3, 4].

Колебания температуры приводят к изменению мембранной текучести [5, 6]. Тепловой стресс вызывает повреждение мембран, нарушение стабильности и увеличение проницаемости мембран для электролитов в пшенице [7]. В наших исследованиях было показано увеличение проницаемости для электролитов мембран клеток корней проростков пшеницы, подвергнутых действию низких положительных температур [8]. Адаптивные возможности растений в значительной степени зависят от того, насколько они способны сохранять текучесть мембран и предотвращать фазовый переход липидов при действии стрессоров [9, 10]. Нарушение целостности клеточной мембраны и последующая утечка внутриклеточного содержимого могут иметь драматические последствия для клетки и организма в целом. В связи с этим анализ стабильности клеточных мембран используется в качестве одного из маркеров устойчивости растений при различных абиотических стрессах [11]. Состояние мембран во многом определяется составом мембранных липидов – фосфолипидов, гликолипидов и стероидов [12]. Важным показателем физико-химического состояния биологических мембран является микровязкость мембран, которая определяется природой мембранных липидов [13]. Степень микровязкости мембран зависит от многих факторов, например содержания стероидов, состава жирных кислот, состояния и количества белков в мембране, pH, ионной силы и т.д. Все эти факторы влияют на характер упаковки бислоя и подвижность его компонентов. Физико-химическое состояние бислоя может влиять на эластичность мембран и их проницаемость, подвижность и активность мембранных белков и липидов [14]. Эти изменения определяют работу многочисленных мембраносвязанных ферментных комплексов, в том числе компонентов сигнальных систем, запускающих стрессовые реакции и адаптационные процессы. Выявление взаимосвязи биофизического состояния мембран и их липидного состава может способствовать пониманию фундаментальных механизмов стрессовой устойчивости растений. Целью настоящего исследования явилось изучение липидного профиля в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при направленном изменении состояния мембран агентами, стабилизирующими мембраны – CaCl_2 и β -ситостерином, а также агентами, увеличивающими мембранную проницаемость, –

каналоформером нистатином и детергентом тритоном X-100.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: CaCl_2 (Fluka Chemie AG, Швейцария), сахароза (ТатХимПродукт, Россия), Sigma-Aldrich, США: тритон X-100, нистатин, β -ситостерин, триолеин, олеиновая кислота, сквален, фосфатидилхолин, смесь гликоцерамидов, HEPES, EDTA, поливинилпирролидон, дитиотреитол, фенолметансульфонилфторид, лаурдан.

Объект исследования. В работе использовали яровую пшеницу (*T. aestivum* L.) сорта “Казанская юбилейная”. Семена пшеницы, предварительно замоченные в дистиллированной воде в течение суток, помещали на различные среды для проращивания: 0.25 мМ CaCl_2 – контроль; 1 мМ CaCl_2 ; 0.5 мМ β -ситостерин; 0.1 мМ нистатин; 16 мкМ тритон X-100. Проростки пшеницы выращивали в течение 4 сут при температуре +22°C и освещенности 100 Вт/м² с 12-часовым фотопериодом.

Проростки пшеницы выращивали на средах с добавлением исследуемых мембранотропных веществ в течение 4 сут. При исследовании влияния на клеточные мембраны детергента, октилфенолполиэтиленгликольного эфира, тритона X-100, 4-дневные проростки пшеницы, выращенные на дистиллированной воде, помещали в раствор детергента на 3 ч, после чего их отмывали и анализировали.

Определение выхода электролитов и индекса мембранной стабильности (ИМС). Навеску корней проростков пшеницы (0.1 г) несколько раз промывали в бидистиллированной воде, затем погружали в бюксы с бидистиллированной водой (10 мл) и выдерживали в термостате при температуре 40°C в течение 30 мин. Электропроводность раствора после инкубации (C_1) измеряли с помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия). Полный выход электролитов (C_2) определяли по электропроводности той же вытяжки после разрушения растительной ткани кипячением в течение 10 мин [15]. Выход электролитов (C) рассчитывали в процентах от полного выхода по формуле:

$$C = (C_1/C_2) \times 100\%$$

ИМС рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМС} = (1 - C_1/C_2) \times 100\%.$$

Определение величины генерализационной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана в микросомальных мембранах растительных клеток. Навеску корней (10 г) гомогенизировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES (pH 7.5), 1 мМ EDTA (pH 8.0), 0.6% поливинилпирролидон, 5 мМ ди-

Таблица 1. Калибровочные уравнения для количественного определения липидов

Вещества-стандарты	Количество вещества, мкг	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	r; sdv
Фосфатидилхолин	4; 6; 8	$y = 1629 + 864.6x$	0.97; 9.47
Гликоцерамид 1	2.4; 3.6; 4.8	$y = 4703 + 2020x$	0.99; 1.44
Гликоцерамид 2	1.6; 2.4; 3.2	$y = 2336 + 2365x$	0.99; 0.53
β -Ситостерол	2; 4; 6; 8; 10	$y = 4812.461 + 668.782x$	0.96; 6.88
Циклоартенол	0.2; 0.3; 0.4	$y = 1344 + 5.852x$	0.99; 2.57
Сквален	4; 6; 8	$y = 4081 + 651x$	0.99; 3.07

тиотреитол, 1 мМ фенолметансульфонилфторида. Микросомальные мембраны осаждали центрифугированием гомогената в течение 30 мин при 100000 g. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES (рН 7.0), и использовали для исследования. Степень микровязкости мембран микросомальной фракции клеток корней пшеницы анализировали с помощью флуоресцентного липофильного зонда лаурдана. Флуоресценция лаурдана в разных частях спектра позволяет выявить изменения в упорядоченности фосфолипидов в мембране, которая зависит от физического состояния липидного бислоя [16]. К микросомальным мембранам добавляли 1 мМ раствор лаурдана и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте. Измерение интенсивности флуоресценции лаурдана проводили на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (Россия). По изменению интенсивности излучения флуоресценции лаурдана проводили расчет значения ГП, по которому оценивали микровязкость мембран. Обобщенная поляризация возбуждения была получена из уравнения:

$$\text{ГП} = (I_{430} - I_{490}) / (I_{430} + I_{490}),$$

где I_{430} и I_{490} – интенсивность излучения при 430 и 490 нм.

По данным литературы, значение ГП колеблется в пределах от -1 до $+1$. -1 означает неупорядоченную фазу, тогда как значение ГП $+1$ означает полностью упорядоченную фазу. Экспериментально эти значения зависят от липидного состава мембран, температуры окружающей среды и прочих факторов [17].

Экстракция липидов из корней пшеницы и анализ их состава методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Экстракцию липидов из корней пшеницы осуществляли изопропанолом, затем смесью изопропанол/хлороформ (1:1) по методу Николса [18] с модификациями [19]. Выход липидов определяли гравиметрическим методом. Анализ состава липидов, экстрагированных из корней пшеницы, проводили с помощью высокоэффективной тонкослой-

ной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием оборудования фирмы SAMAG (Швейцария). Для хроматографии использовали классические ТСХ-пластины на стекле, силикагель 60, размером 10×20 см (Merck KGaA, Германия), которые перед анализом элюировали этанолом и активировали нагреванием $+120^\circ\text{C}$ 20 мин. Нанесение растворов объектов исследования и стандартов на ТСХ-пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 в виде треков шириной 8 мм. Разделение липидов проводили в автоматической камере для элюирования ADC 2, линия фронта подвижной фазы – 80 мм. Для анализа нейтральных липидов в качестве подвижной фазы использовали смесь петролейный эфир : этиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1), полярных липидов – хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4). Для дериватизации использовали реагент – 5%-раствор H_2SO_4 в этаноле. Пластину опрыскивали реагентом с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия), высушивали, переносили в сушильный шкаф и нагревали 20 мин при температуре $+150^\circ\text{C}$. Денситометрическое сканирование ТСХ-пластин после дериватизации проводили на приборе TLS Scanner 4 с использованием компьютерной программы winCATS 1.4.9. Параметры сканирования: режим – отражательная абсорбция, длина волны – 490 нм, щель – 8.00×0.40 мм, скорость сканирования 20 мм/с, разрешение – 100 мкм/шаг, математический фильтр Savitsky–Golay 7. Количество липидов в исследуемых экстрактах из корней проростков пшеницы осуществляли с помощью калибровочных уравнений зависимости площади пиков (y) от количества чистых липидов – стандартов (x) (табл. 1).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась путем расчета стандартного отклонения с использованием t -критерия Стьюдента с помощью программы Microsoft Excel и U -критерия Манна–Уитни с использованием автоматической программы для онлайн расчета U -критерия Манна–Уитни (<https://statpsy.ru/mana-uitni/onlajn-raschet-kriteriya-u-manna-uitni/>). Результа-

Таблица 2. Выход электролитов, ИМС и ГП в корнях проростков пшеницы при действии мембранотропных веществ ($n = 9$)

Вариант	Выход электролитов, %	ИМС, %	ГП
Контроль	26.4 ± 0.3	73.6	0.16 ± 0.01
CaCl ₂ (1 мМ)	19.5 ± 5.1	80.5	0.19 ± 0.01
β-Ситостерин (0.5 мМ)	22.3 ± 1.3	77.7	0.21 ± 0.03
Нистатин (0.1 мМ)	24.8 ± 2.1	75.2	0.14 ± 0.05
Тритон X-100 (16 мкМ)	54.5 ± 10.7	45.5	0.11 ± 0.01

ты денситометрии обрабатывались автоматически с помощью специализированной программы win-CATS, версия 1.4.9 с использованием фильтра Savitsky–Golay 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с помощью мембранотропных агентов были смоделированы различные состояния растительных мембран: стабилизация, уплотнение и нарушение проницаемости, которые могут наблюдаться в клетках растений в естественных стрессовых условиях. При действии мембранотропных агентов нами обнаружены изменения таких важных мембранных характеристик, как проницаемость мембран, микровязкость и индекс мембранной стабильности.

Исследование влияния мембранотропных соединений на проницаемость и микровязкость мембран клеток корней пшеницы

В формировании ответной реакции растений на внешние воздействия значительную роль играет клеточная поверхность, от состояния которой зависят как ранние реакции, так и более длительные, связанные с адаптацией процессы. Одним из элементов защитной реакции клеток на воздействие является снижение проницаемости мембран для ионов [20]. Особое значение в интеграции клеточных функций у растений принадлежит Ca²⁺, который является универсальным триггером многих клеточных процессов [21]. Известно, что экзогенный кальций выполняет роль стабилизатора интегральной фосфолипидной и белковой фазы мембран [22]. Ионы кальция, связываясь с мембранами, образуют мостики между отрицательно заряженными группами двух соседних молекул белков (а также липидов) мембран. На тенях эритроцитов показано, что 80% Ca²⁺ связывается с карбоксильными группами белков, а 15–20% – с фосфатными группами кислотных фосфолипидов [23]. Кроме того, связанный отрицательно заряженной группой ион Ca²⁺ способен вызывать дегидратацию. Частичная дегидратация и снижение отрицательного заряда мембраны, по мнению Левина [24], являются факто-

рами, стабилизирующими структуру мембран. В наших экспериментах выращивание проростков пшеницы на 1 мМ CaCl₂ приводило к снижению выхода электролитов из корневых клеток, увеличению ИМС на 7% и возрастанию ГП на 4%, что свидетельствует об увеличении микровязкости мембран (табл. 2).

Стабилизирующий эффект на мембраны клеток корней пшеницы также наблюдался при добавлении в среду выращивания проростков β-ситостерина (0.5 мМ), в частности, наблюдалось уменьшение выхода электролитов из клеток, увеличение ИМС на 4.7% и возрастание ГП на 5% (табл. 2). Известно, что β-ситостерин является одним из основных стероидов, содержащихся в плазматической мембране растительных клеток, который увеличивает упорядоченность мембран [25].

Другим агентом, модифицирующим мембраны, является полиеновый антибиотик, каналоформер нистатин. Действие нистатина достаточно подробно изучено на модельных мембранах [26]. Было показано, что нистатин нарушает структурную организацию мембран путем связывания со стеринами, входящими в их состав, и образования пор. В результате этого взаимодействия увеличивается ионная проницаемость мембран, происходит потеря клеткой воды, аминокислот и других компонентов [27, 28]. Ранее на модельной системе, отсеченных корнях проростков пшеницы, нами было показано, что уже с первых минут действия нистатина на корни происходит значительное увеличение проницаемости мембран для электролитов и деполяризация плазматической мембраны [28], наблюдается нарушение важнейших физиологических процессов и значительное снижение жизнеспособности клеток [29]. Возможно, что токсические действия нистатина на клетки усугублялись раневым стрессом, сопровождающим отсечение корней от проростков [30]. В настоящем исследовании действию нистатина подвергались интактные проростки пшеницы, которые выращивались на растворе антибиотика в течение 4 сут. В отличие от предыдущих экспериментов, нистатин не оказывал дестабилизирующего действия на мембраны клеток корней пшеницы: выход электролитов, индекс мембран-

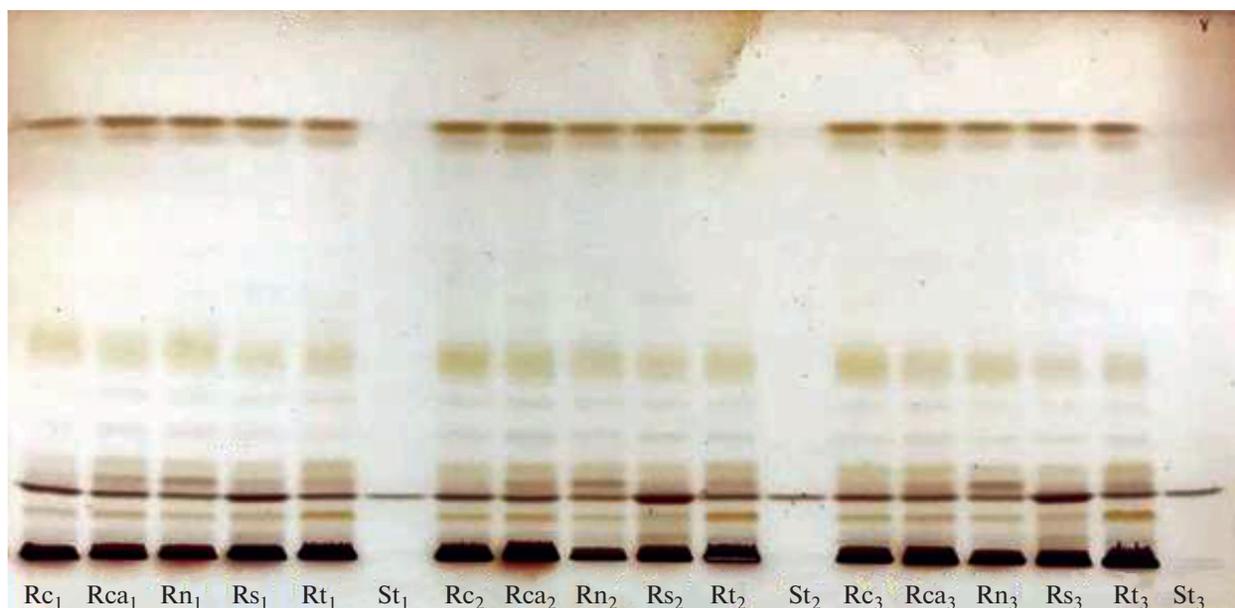


Рис. 1. Хроматограмма нейтральных липидов в экстрактах корней пшеницы, содержащих липофильные соединения, в видимом свете после дериватизации пластин 5% раствором H_2SO_4 в этаноле: Rc1,2,3 – контроль; Rca1,2,3 – $CaCl_2$; Rn1,2,3 – нистатин; Rs1,2,3 – β -ситостерин; Rt1,2,3 – тритон X-100; St1,2,3 – стандарт (β -ситостерин).

ной стабильности и микровязкость были близки к контрольным значениям (табл. 1). Можно предположить, что для интактных корней использование нистатина в данной концентрации не было токсичным и не вызвало изменений в проницаемости клеточных мембран и ИМС.

В нашей работе было изучено действие на корни пшеницы еще одного мембранотропного агента, резко меняющего физико-химические параметры мембран, тритона X-100. Тритон X-100 – это неионный детергент, механизм действия которого основан на извлечении мембранных фосфолипидов и разрушении их комплексов с белками [31]. Показано, что обработка проростков пшеницы тритоном X-100 приводила к двукратному увеличению выхода электролитов, снижению ИМС на 28% и заметному снижению микровязкости мембран (табл. 2).

Таким образом, изучение мембранных характеристик клеток корней пшеницы при действии мембранотропных веществ подтвердило специфичность их действия на мембраны клеток.

Анализ липидного состава корней пшеницы при действии мембранотропных веществ

На рис. 1 и рис. 2 приведены пластины ТСХ анализа нейтральных и полярных липидов в исследуемых экстрактах корней пшеницы. Результаты их денситометрии приведены в табл. 3.

В ходе проведенного ВЭТСХ анализа было показано, что экстракты из корней пшеницы в кон-

трольном и опытных вариантах имеют одинаковый качественный состав липидов, но отличаются по их количественному содержанию. Нейтральные липиды корней пшеницы представлены как омыляемыми (ацилглицериды, эфиры стерина), так и неомыляемыми липидами (стерины, терпеноиды, ЖК и др.). Во всех исследуемых экстрактах стерины и углеводороды, в том числе сквален, занимают наибольшую долю в сумме липидных веществ (табл. 3). Содержание ацилглицеридов (триацилглицеридов (ТАГ) и диацилглицеридов (ДАГ)), являющихся основными запасными липидами, составляет в сумме около 10–16%, тогда как на долю ЖК приходится не более 1%.

Качественный анализ фосфолипидного состава показал, что среди спектра разнообразных фосфолипидов, обнаруженных во всех исследуемых экстрактах, наибольшее количество (около 19 и 13% соответственно) приходится на фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) (табл. 3). Эти соединения являются главными липидными компонентами мембран в клетках высших растений и метаболически связаны друг с другом [33]. Предшественником их синтеза является фосфатидилсерин, содержание которого в исследуемых экстрактах почти в 13–16 раз ниже по сравнению с ФХ и ФЭ. Исследование липидного профиля корней *Arabidopsis* при недостатке Ca^{2+} показало повышение уровня ФХ, лизо-ФХ, ФЭ, лизо-ФЭ, фосфатидилинозитола (ФИ) и ТАГ, биосинтеза фосфатидной кислоты и биосинтеза ДАГ [34]. Повышение содержания ТАГ и молярного соотношения ФХ/ФЭ в этих корнях

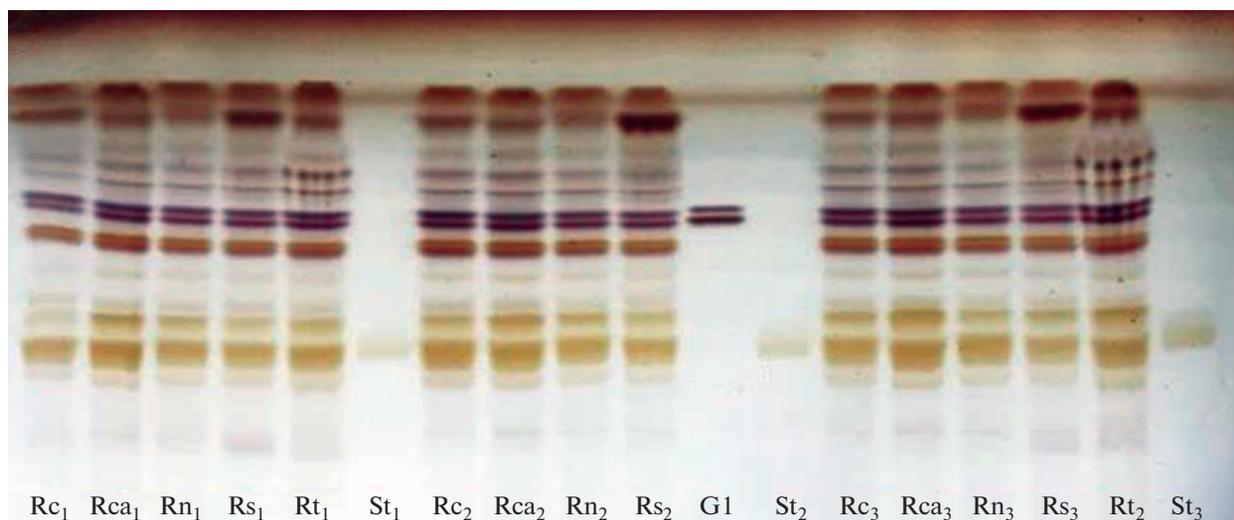


Рис. 2. Хроматограмма полярных липидов в экстрактах корней пшеницы, содержащих липофильные соединения, в видимом свете, после дериватизации пластин 5% раствором H_2SO_4 в этаноле: Rc1,2,3 – контроль; Rca1,2,3 – $CaCl_2$; Rn1,2,3 – нистатин; Rs1,2,3 – β -ситостерин; Rt1,2 – тритон X-100; St1,2,3 – стандарт (фосфатидилхолин); G1 – стандарт (гликоцерамиды).

может быть направлено на поддержание стабильности мембраны и баланса между мембранными и запасными липидами. Это исследование демонстрирует важную роль Ca^{2+} в поддержании стабильности плазматической мембраны [34]. В наших экспериментах выращивание проростков пшеницы на 1 мМ $CaCl_2$ не вызвало изменений в содержании основных фосфолипидов – ФХ и ФЭ (табл. 3), стабильность и упорядоченность мембран при этом возрастали (табл. 2). Ранее было показано, что увеличение уровня экзогенного Ca^{2+} приводило к увеличению содержания стерина, ФЛ, СЖК в отсеченных корнях пшеницы, что, по мнению авторов, приводило к стабилизации мембран, характерной для клеток корня при переходе в состояние “относительного покоя” [21]. В наших экспериментах в присутствии $CaCl_2$ наблюдалось увеличение содержания ФГ и ФИ. Учитывая то, что ФИ является основным компонентом митохондриальных мембран [35], можно предположить, что возрастание количества этого фосфолипида необходимо для поддержания Ca^{2+} -депонирующей функции митохондрий.

В составе гликолипидов, идентифицированных в исследуемых экстрактах, показано наличие гликоцерамидов двух типов: моногалактозилдиацилглицерида (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерида (ДГДГ) (табл. 3). Известно, что эти соединения являются важными мембранными липидными компонентами в растениях. Несмотря на то, что гликолипиды не считаются основными компонентами непластидных мембран, изменения в их содержании часто наблюдаются в условиях стресса, что свидетельствует об их важной

роли в приобретении стрессовой устойчивости растений [36]. Было показано, что действие β -ситостерина на корни пшеницы приводило к существенным изменениям в содержании МГДГ и ДГДГ в липидном профиле. По сравнению с контролем содержание МГДГ увеличивается в 1.6 раза, а ДГДГ – наоборот снижается в 1.3 раза (табл. 3). В литературе имеются данные о том, что в условиях дефицита фосфора может наблюдаться увеличение содержания галактолипидов как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих тканях [36]. По мнению Киселевой с соавтором, недостаток фосфора может стимулировать синтез ФХ по так называемому альтернативному механизму, путем последовательного трехступенчатого метилирования ФЭ [37]. При этом на фоне редукции предшественников, в том числе ФК и ФЭ, происходит аккумуляция ФХ, которые в дальнейшем, при участии фосфолипазы С подвергаются гидролизу до диацилглицеридов. Образующиеся диацилглицериды расходуются на синтез гликолипидов, главным образом ДГДГ и/или МГДГ [37]. В настоящее время точно установлено, что дефицит фосфата вызывает замену мембранных фосфолипидов нефосфатсодержащими галактолипидами МГДГ и ДГДГ [38]. Замена фосфолипида на ДГДГ происходит в листьях и корнях *Arabidopsis* [39], побегах и корнях овса [40], культуры кленовых клеток сикамора [41], соевых бобах [42]. В нашем случае, вероятно, происходит вытеснение молекул ФХ β -ситостерином, которое вызывает увеличение содержания МГДГ.

В табл. 4 обобщены данные определения суммарного количества липидных веществ, извлекаемых из контрольного и опытных вариантов

Таблица 3. Состав и содержание липидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, обработанных мембранотропными веществами ($n = 3$)

R_f	Содержание, %*					Отнесение
	контроль	CaCl ₂ (1 мМ)	β -Ситостерин (0.5 мМ)	Нистатин (0.1 мМ)	Тритон X-100 (16 мкМ)	
Нейтральные липиды						
0.04	42.2 ± 2.5	41.8 ± 1.1	40.9 ± 2.1	39.8 ± 2.4	39.2 ± 2.3	Не идентифицировано
0.14	3.7 ± 0.5	3.9 ± 0.2	4.7 ± 0.6	3.5 ± 0.6	7.5 ± 0.5	1,2-Диглицериды***
0.18	14.0 ± 1.0	12.5 ± 0.4	21.4 ± 1.9	11.5 ± 0.3	12.7 ± 0.4	Стерины**
0.21	2.4 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.9	7.4 ± 1.1	4.2 ± 0.6	Высшие спирты***
0.25	3.3 ± 0.9	3.7 ± 0.6	3.0 ± 0.2	3.4 ± 0.8	5.0 ± 0.3	Терпеноиды**
0.33	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	Жирные кислоты**
0.41	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	Не идентифицировано
0.51	10.3 ± 0.5	7.5 ± 0.4	6.3 ± 0.5	9.7 ± 1.4	8.7 ± 0.4	Триглицериды**
0.65	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	Не идентифицировано
0.92	3.3 ± 1.2	3.2 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.5	3.5 ± 1.0	Не идентифицировано
0.98	4.7 ± 0.7	6.0 ± 0.4	3.9 ± 0.7	5.2 ± 0.7	4.7 ± 0.6	Эфиры стеринов***
1.00	13.6 ± 1.9	14.0 ± 0.7	11.6 ± 1.1	14.3 ± 1.1	12.1 ± 1.1	Углеводороды, сквален**
Полярные липиды						
0.15	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.4 ± 1.0	1.0 ± 0.7	1.5 ± 0.4	Фосфатидилсерин***
0.17	0.6 ± 0.5	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.8	Фосфатидилинозитол***
0.31	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.4	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.4	4.0 ± 0.9	Не идентифицировано
0.38	19.3 ± 1.5	18.1 ± 2.5	15.1 ± 1.7	18.6 ± 1.3	15.9 ± 1.1	Фосфатидилхолин**
0.45	7.6 ± 1.0	10.6 ± 0.3	7.1 ± 0.3	8.4 ± 1.0	9.4 ± 1.5	Фосфатидилглицерин***
0.49	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.5	Дифосфатидилглицерин***
0.57	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.7	Дигалактозилдиацилглицерид***
0.66	13.4 ± 1.0	12.7 ± 0.1	11.7 ± 0.4	13.6 ± 0.3	13.2 ± 0.1	Фосфатидилэтанолламин***
0.72	6.0 ± 0.5	6.2 ± 0.5	5.7 ± 0.2	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.1	Гликоцерамид 1**
0.74	6.6 ± 1.0	6.4 ± 0.9	4.7 ± 0.2	5.5 ± 0.7	5.4 ± 0.3	Гликоцерамид 2**
0.80	3.4 ± 0.5	3.2 ± 0.5	4.0 ± 0.4	3.2 ± 0.7	5.2 ± 0.5	Не идентифицировано
0.83	4.8 ± 0.8	4.7 ± 1.0	6.2 ± 1.0	4.1 ± 0.6	6.2 ± 0.3	Не идентифицировано
0.87	3.2 ± 0.6	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.8	3.5 ± 0.7	2.6 ± 0.1	Не идентифицировано
0.93	12.0 ± 1.1	9.8 ± 0.9	19.9 ± 2.8	11.8 ± 1.2	9.9 ± 1.1	Моногалактозилдиацилглицерид***
0.99	14.9 ± 2.2	13.6 ± 0.7	13.1 ± 1.2	14.3 ± 1.5	14.9 ± 2.9	Не идентифицировано

* Рассчитано по площади пиков на денситограмме.

** Отнесение путем сопоставления R_f -пятна с R_f -вещества-стандарта.

*** Отнесение в сопоставлении с литературными данными [32].

корней пшеницы, и количественного анализа отдельных липидов в полученных экстрактах.

Установлено, что количество липидных веществ в корнях пшеницы при действии CaCl₂, β -ситостерина и нистатина практически не изменяется. Наибольшее количество липидов было получено при экстракции корней пшеницы, обработанных тритоном X-100 (табл. 4). Это почти в 3 раза выше, чем в контроле и других опытных образцах. Наблюдаемый эффект резкого увеличения количества липидов, полученных из корней

пшеницы на фоне тритона X-100, может быть обусловлен повышением доступности липидов к извлечению за счет их высвобождения из мембранных клеточных структур в присутствии детергента.

Анализ действия других мембранотропных веществ выявил существенные изменения липидного профиля в корнях пшеницы (табл. 4). Так, показано, что при выращивании проростков на среде с β -ситостерином в 3.4 раза увеличивается содержание стеринов в корнях по сравнению с

Таблица 4. Количество липидов в корнях пшеницы при действии мембранотропных веществ ($n = 3$)

Количество, мкг/г сырого веса корней	Вариант				
	контроль	CaCl ₂ (1 мМ)	β-Ситостерин (0.5 мМ)	Нистатин (0.1 мМ)	Тритон X-100 (16 мкМ)
Сумма липидов	1350 ± 212	1600 ± 141	1600 ± 141	1550 ± 71	4400 ± 282
Стерины	36.8 ± 3.3	32.2 ± 2.8	125.4 ± 5.6	11.1 ± 0.7	35.6 ± 1.5
Терпеноиды	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5
Фосфатидилхолин	180.4 ± 15.5	191.4 ± 1.2	131.6 ± 8.5	156.4 ± 11.3	162.8 ± 12.8
Гликоцерамид 1	7.2 ± 0.7	8.1 ± 1.0	4.7 ± 2.0	9.8 ± 0.8	9.9 ± 2.5
Гликоцерамид 2	19.7 ± 0.3	21.1 ± 0.1	8.5 ± 0.4	11.1 ± 0.5	14.4 ± 2.3
Углеводы, в том числе сквален	61.2 ± 8.5	51.5 ± 1.7	37.5 ± 6.8	44 ± 8.0	42.6 ± 5.4

контролем (табл. 4). Это указывает на то, что растительные клетки способны использовать экзогенный β-ситостерин, что приводит к увеличению стабильности мембран (табл. 2). Из данных литературы известны структурные особенности стеринов, необходимые для их встраивания в мембраны и выполнения ими структурной функции: это наличие свободной β-гидроксильной группы при С-3, плоский тетрациклический скелет и алифатическая боковая цепь с 8–10 атомами углерода [43]. Основные растительные стерины обладают этими характеристиками. Эксперименты на модельных мембранах из ФХ и стеринов сои показали, что все растительные стерины могут регулировать жидкость и проницаемость фосфолипидных бислоев, но с разной эффективностью [44–46]. Функциональный анализ физических свойств моделей растительных мембран показал, что среди различных стеринов β-ситостерин является основным стеринном, увеличивающим упорядоченность жидкой фазы растительных мембран [46, 47].

Стерины и другие изопреноидные производные могут влиять на свойства мембран посредством изменения состояния мембран в результате взаимодействия с другими липидами бислоя [46]. В мембранах стерины взаимодействуют с гликоцерамидами и фосфолипидами. Важной особенностью гликоцерамидов является их высокое сродство к стеринам, обусловленное Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями боковых цепей стериннов с насыщенными алкильными цепями сфинголипидов. Это способствует более плотной упаковке и облегчает образование липидных микродоменов (“рафтов”). В литературе эти два класса липидов часто называют рафтообразующими липидами [48]. Эти микродомены могут играть важную роль в передаче сигнала в клетку и служить платформами для ферментных сигнальных комплексов.

Ранее в наших исследованиях была обнаружена интересная закономерность: изменение уровня

стериннов при действии низких положительных температур [8] и стерин-связывающих агентов [29, 49] сопровождается обратноподобным изменением уровня гликоцерамидов. В настоящей работе также наблюдались подобные взаимосвязанные изменения: увеличение уровня стериннов под действием β-ситостерина сопровождалось снижением содержания гликоцерамидов (ГлЦер) (табл. 4), что свидетельствует о наличии функциональной взаимосвязи между этими двумя классами липидов. Кроме того, исследования на клетках дрожжей и животных показали, что пути биосинтеза стериннов и сфинголипидов взаимосвязаны [50], это также может иметь место и у растений. Например, нарушение пути биосинтеза стериннов у проростков лука-порей нарушает синтез сложных сфинголипидов, таких как глюкозилцерамиды [29, 51]. Можно полагать, что существует взаимосвязь между метаболизмом стериннов и сфинголипидов, что может иметь значение для поддержания соотношений и функционального взаимодействия этих классов липидов [29, 52].

Выращивание проростков на среде со стеринсвязывающим агентом нистатином ожидаемо приводило к резкому (в 3.3 раза) снижению количества детектируемых стериннов (табл. 4). Наряду с этим при действии нистатина наблюдалось снижение уровня ФХ.

Влияние на мембраны неионного детергента тритона X-100, как известно, обусловлено взаимодействием его липофильных цепей с гидрофобными поверхностями молекул белков и вытеснением их из мембран. Тритон X-100 действует на мембраны достаточно агрессивно, солибилизируя до 80% белков и 90% фосфолипидов [53]. В работе Гордона с соавторами [28] показано, что добавление тритона X-100 в среду инкубации отсеченных корней вызывает резкое усиление проницаемости плазмалеммы для ионов и значительную стимуляцию потребления кислорода корнями пшеницы. Исследования, проведенные на

пшенице и сахарной свекле, показали эффективность тритона X-100 как эпимутагена [54]. Воздействие тритона X-100 на растения сахарной свеклы приводило к изменению морфологии корня и листьев, признака “стерильность—фертильность” пыльцы, динамики прорастания семян [55]. Таким образом, можно заключить, что тритон X-100 оказывает мощное стрессовое воздействие на мембраны клеток. В настоящей работе мы наблюдали его значительное повреждающее действие на клеточные мембраны корней пшеницы, которое выражалось в двукратном увеличении выхода электролитов, снижении ИМС на 28% и заметном снижении микровязкости мембран (табл. 2). Эти изменения мембранных характеристик сопровождались увеличением количества терпеноидов в 1.6 раза относительно контроля, незначительным снижением количества ГлЦер 2, снижением содержания ФХ, уровень стерина оставался неизменным (табл. 4). Кроме того, при действии тритона X-100 наблюдалось многократное увеличение общей массы выделенных липидных веществ. Можно полагать, что увеличение количества терпеноидов может быть результатом большей доступности липидных компонентов для детергента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе корни проростков пшеницы подвергались действию мембранотропных агентов (CaCl_2 , β -ситостерин, нистатин, тритон X-100) с целью моделирования стресс-индуцированных состояний мембран растительных клеток. Обработка корней CaCl_2 и β -ситостерином приводила к увеличению мембранной стабильности и упорядоченности липидного бислоя. Парадоксальным представляется факт, что, несмотря на значительное снижение количества детектируемых стерина при действии каналоформера нистатина на интактные корни, уменьшения стабильности и упорядоченности мембран не наблюдалось. Значительное повреждение клеточных мембран детергентом тритоном X-100 сопровождалось увеличением в липидном профиле корней доли терпеноидов, возможно, обусловленным большей доступностью липидных компонентов к извлечению. Наиболее выраженным среди всех обнаруженных эффектов оказалось действие экзогенного β -ситостерина. Увеличение стабильности и упорядоченности мембран в присутствии этого стерина сопровождалось увеличением общего содержания стерина и МГДГ, а также снижением количества ФХ и ГлЦер. На наш взгляд, эти изменения в липидном профиле могут быть взаимосвязаны. Так, встраивание β -ситостерина может приводить к вытеснению из мембран молекул ФХ, уменьшение доли которых, в свою очередь, вызывает увеличение содержания галакто-

липидов, в частности МГДГ. Обратнаправленные изменения в содержании стерина и ГлЦер, показанные в присутствии экзогенного β -ситостерина, наблюдались нами ранее и при других воздействиях. Это может свидетельствовать о наличии функциональной взаимосвязи между этими двумя классами липидов.

Таким образом, воздействие на клетки проростков пшеницы мембранотропных агентов индуцирует изменения не только физико-химического состояния мембран, но и их липидного состава. Комплекс этих изменений может быть одним из механизмов, которые запускаются в клетках растений в стрессовых условиях.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00988 (для Ю.Н. Валитовой) и гранта Президента РФ МК-264.2020.4 (для А.Г. Ренковой).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shi H., Jiang C., Ye T., Tan D.X., Reiter R.J., Zhang H., Liu R., Chen Z. 2015. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *J. Exp. Bot.* **66**, 681–694.
2. Li-Ping B., Fang-Gong S., Ti-Da G., Zhao-Hui S., Yin-Yan L., Guang-Sheng Z. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize1. *Pe-dosphere*. **16**, 326–332.
3. Nedjimi B., Daoud Y. 2009. Ameliorative effect of CaCl_2 on growth, membrane permeability and nutrient uptake in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* grown at high (NaCl) salinity. *Desalination*. **249**, 163–166.
4. Guo Q., Liu L., Barkla B.J. 2019. Membrane lipid remodeling in response to salinity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4264.
5. Singer S. D., Zou J., Weselake R.J. 2016. Abiotic factors influence plant storage lipid accumulation and composition. *Plant. Sci.* **243**, 1–9.
6. Niu Y., Xiang Y. 2018. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Front. Plant. Sci.* **9**, 915.
7. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M.M., Roychowdhury R., Fujita M.H. 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 9643–9684.
8. Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Minibayeva F. 2019. Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress. *Plant. Physiol. Biochem.* **142**, 452–459.
9. Лось Д.А. 2005. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений *Вестн. РАН.* **75**, 338–345.
10. Narayanan S., Tamura P.J., Roth M.R., Prasad P.V., Welti R. 2016. Wheat leaf lipids during heat stress:

- I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant. Cell. Environ.* **39**, 787–803.
11. Senthil-Kumar M., Ali K., Dahuja A., Tyagi A. 2015. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant. Physiol. Biochem.* **96**, 83–89.
 12. Mazur P. 1969. Freezing injury in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **20**, 419–448.
 13. Gerbeau-Pissot P., Der C., Dominique T., Anca I., Grosjean K., Roche Y., Perrier-Cornet J., Mongrand S., Plas F. 2014. Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant. Physiol.* **164**, 273–286.
 14. Болдырев А.А. 1985. *Биологические мембраны и транспорт ионов*. М.: Изд-во МГУ. 208 с.
 15. Sairam R.K., Saxena D.C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agron. Crop. Sci.* **184**, 55–61.
 16. Bagatolli L., Gratton E., Fidelio G. 1998. Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys. J.* **75**, 331–341.
 17. Sanchez S.A., Triccerri M.A., Gunther G., Gratton E. 2007. Laurdan generalized polarization: From cuvette to microscope. *Formatex*. 1007–1014.
 18. Nichols B.W. 1963. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* **70**, 417–422.
 19. Котлова Е.Р., Сеник С.В., Кюхер Т., Шаварда А.Л., Кияшко А.А., Псурцева Н.В., Зубарев Р.А. 2009. Изменения в составе мембранных глицеро- и сфинголипидов в ходе развития поверхностной культуры *Flammulina velutipes* II. *Микробиология.* **78**, 226–235.
 20. Александров В.Я., Кислюк И.М. 1994. Реакция клетки на тепловой шок: физиологический аспект. *Цитология.* **36**, 5–59.
 21. Алексеева В.Я., Лыгин А.В., Гордон Л.Х., Николаев Б.А. 1999. Изменение липидного состава корней пшеницы при модификации кальцием клеточной поверхности. *Физиология и биохимия культурных растений.* **31**, 440–446.
 22. Nepler P.K., Wayne R.O. Calcium and plant development. 1985. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **36**, 397–439.
 23. Forstner J., Manery J. 1970. Calcium binding sites in human erythrocyte ghosts. *Fed. Proc.* **29**, 664.
 24. Левин С.В. 1976. *Структурные изменения клеточных мембран*. Л.: Наука ЛО. 224 с.
 25. Marsan M., Muller I., Milon A. 1996. Ability of clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics. *Chem. Phys. Lipids.* **84**, 117–121.
 26. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.А. 1982. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. *Итоги науки и техники. Биофизика мембран.* М., **2**, 82–160.
 27. Coutinho A., Silva L., Fedorov A., Prieto M. 2004. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys. J.* **87**, 3264–3276.
 28. Гордон Л.Х., Валитова Ю.Н., Огородникова Т.И., Рахматуллина Д.Ф., Алябьев А.Ю., Лосева Н.Л., Ценцевицкий А.Н., Рубан Н.Ф. 2005. Энергетический обмен клеток корней пшеницы при модификации ионной проницаемости плазмалеммы каналоформером нистатином. *Цитология.* **7**, 1088–1094.
 29. Valitova J., Sulkarnayeva A., Kotlova E., Ponomareva A., Mukhitova F., Murtazina L., Ryzhkina I., Beckett R., Minibayeva F. 2014. Sterol binding by methyl- β -cyclodextrin and nystatin - comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants. *FEBS J.* **281**, 2051–206.
 30. Renkova A., Valitova J., Schaller H., Minibayeva F. 2019. The homoeologous genes encoding C24-sterol methyltransferase 1 in *Triticum aestivum*: Structural characteristics and effects of cold stress. *Biol. Plantarum.* **63**, 59–69.
 31. Xu H., Zhou S., Jiang D., Chen H.Y. 2018. Cholesterol oxidase/triton x-100 parked microelectrodes for the detection of cholesterol in plasma membrane at single cells. *Anal. Chem.* **90**, 1054–1058.
 32. Кейтс М. 1975. *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов*. М.: Мир. 322 с.
 33. Ленинджер А. 1974. *Биохимия*. М.: Мир. 957 с.
 34. Zhang T., Yang J., Sun Y., Kang Y., Yang J., Qi Z.J. 2018. Calcium deprivation enhances non-selective fluid-phase endocytosis and modifies membrane lipid profiles in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **226**, 22–30.
 35. Horvath S. E., Daum G. 2013. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid. Res.* **52**, 590-614.
 36. Zhang M., Deng X., Yin L., Qi L., Wang X., Wang S., Li H. 2016. Regulation of galactolipid biosynthesis by over expression of the rice mgd gene contributes to enhanced aluminum tolerance in tobacco. *Front. Plant. Sci.* **7**, 337.
 37. Киселева М.А., Котлова Е.Р. Влияние длительного фосфорного голодания на мембранные липиды свободноживущей и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* II. 2008. *Бот. журн.* **93**, 88–96.
 38. Tjellström H., Andersson M.X., Larsson K.E., Sandelius A.S. 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: The dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant. Cell. Environ.* **31**, 1388–1398.
 39. Härtel H., Dormann P., Benning C. 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10649–10654.
 40. Andersson M.X., Larsson K.E., Tjellström H., Liljeborg C., Sandelius A.S. 2005. Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **280**, 27578–27586.
 41. Jouhet J., Maréchal E., Baldan B., Bligny R., Joyard J., Maryse A., Block J. 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Cell. Biol.* **167**, 863–874.
 42. Gaude N., Tippmann H., Flemetakis E., Katinakis P., Udvardi M., Dörmann P. 2004. The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid

- membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus. *J. Biol. Chem.* **279**, 34624–34630.
43. Bloch, K.E. 1983. Sterol structure and membrane function. *Crit. Rev. Biochem.* **14**, 47–82.
 44. Shuler I., Durtail G., Glasser N., Benveniste P., Hartmann M.A. 1990. Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1028**, 82–88.
 45. Schaller H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid. Res.* **42**, 163–175.
 46. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия.* **81**, 1050–1068.
 47. Schuler I., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G., Albrecht A.M., Benveniste P., Hartman M.A. 1991. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6926–6930.
 48. Furt F., Simon-Plas F., Mongrand S. Murphy A.S., Schulz B., Peer W. 2011. Lipids of the plant plasma membrane. *Plant. Cell. Monographs.* Heidelberg: Springer. **19**, 3–30.
 49. Valitova J.N., Minibayeva F.V., Kotlova E.R., Novikov A.V., Shavarda A.L., Murtazina L.I., Ryzhkina I.S. 2011. Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycosceramides. *Phytochemistry.* **72**, 1751–1759.
 50. Swain E., Baudry K., Stuke J., McDonough V., Germann M., Nickels J.T. 2002. Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 26177–26184.
 51. Hartmann M.A., Perret A.M., Carde J.P., Cassagne C., Moreau P. 2002. Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1583**, 285–296.
 52. Nieto B., Fores O., Arry M., Ferrer A. 2009. Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry.* **70**, 53–59.
 53. Скоупс Р. 1985. Методы очистки белков. М.: Мир. 358 с.
 54. Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В. 2009. Индукция тритоном X-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. *Генетика.* **45**, 564–568.
 55. Кирикович С.С., Левитес Е.В. 2010. Морфологические и физиологические изменения у *Beta vulgaris* L. под действием Тритона X-100. *Экологическое равновесие и устойчивое развитие территории*: Сб. науч. тр. СПб: ЛГУ им. А.С. Пушкина. 268–272.

The Lipid Profile of Wheat Roots Treated with Membranotropic Agents

J. N. Valitova^{1,*}, V. R. Khabibrakhmanova², A. V. Belkina², A. G. Renkova¹, F. V. Minibayeva¹

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, 420111 Russia

²Kazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia

*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Most crops are seriously threatened by various abiotic stressors. Biological membrane is a primary barrier protecting from stress factors and acting as a target that takes a hit on itself. An important component of membranes, on which the state of a plant membrane depends, its permeability to ions, microviscosity, and the activity of membrane-bound enzyme complexes, are lipids. The aim of this study was to study the lipid profile in the roots of wheat seedlings of *Triticum aestivum* L. with a directed alteration of the membrane state by specific agents: CaCl₂ (1 mM) and β-sitosterol (0.5 mM) that increase the membrane rigidity, as well as the channel former nystatin (0.1 mM) and detergent Triton X-100 (16 μM) that increase the membrane permeability. It was found that stabilization of membranes by CaCl₂ did not lead to changes in the lipid composition of wheat root cells, while the stability index and degree of membrane ordering increased. Saturation of membranes with β-sitosterol also caused an increase in membrane stability and ordering of the lipid bilayer, which was accompanied by an increase in the content of sterols and monogalactosyl diacylglyceride and a decrease in the level of phosphatidylcholine and glycosceramides. The action of the channel former nystatin on intact seedlings did not affect the stability and orderliness of the membranes, despite a decrease in the total level of sterols in the cells of the roots of wheat. Damage of the root membranes by Triton X-100, which manifested itself in a significant increase in the electrolyte leakage and a decrease in the ordering of the bilayer, was accompanied by an increase in the proportion of terpenoids.

Keywords: wheat, sterols, phospholipids, membranotropic substances, permeability, microviscosity

ЮЛИАН ГЕОРГИЕВИЧ МОЛОТКОВСКИЙ

(к 85-летию со дня рождения)

7 апреля 2020 года исполнилось 85 лет профессору Юлиану Георгиевичу Молотковскому — крупнейшему специалисту в области химии липидов и мембранологии. Его труды хорошо известны в России и за рубежом. Вся творческая деятельность Ю.Г. Молотковского связана с Институтом биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Он стоял у истоков Института, созданного академиком М.М. Шемякиным в 1959 г. Юлиан Георгиевич входит в ту когорту исследователей-энтузиастов, таланту которых Институт обязан своей лидирующей позицией в области физико-химической биологии. После окончания аспирантуры и защиты кандидатской диссертации он стал сотрудником созданной в 1963 г. лаборатории химии липидов, которую возглавил будущий член-корреспондент РАН Л.Д. Бергельсон. Наука о липидах в то время была в стадии становления, и развитие этого направления биорганической химии стало предметом многолетней плодотворной деятельности Ю.Г. Молотковского. В области его интересов находились синтез минорных фосфолипидов клеточных мембран, что сделало их доступными для исследования, разработка методов разделения рацемических спиртов на антиподы, а также создание оригинальных методов синтеза ненасыщенных липидов. С середины 70-х годов главным направлением научной работы Ю.Г. Молотковского становится создание липидов с флуоресцентными и фотоаффинными метками — липидных зондов, эффективных инструментов для исследования свойств искусственных и биологических мембран. С помощью зондов им были обнаружены новые закономерности в структуре липопротеинов крови, мем-

бран эритроцитов и оболочек вирусов гриппа. Результаты этих исследований послужили основой докторской диссертации, которую Юлиан Георгиевич защитил в 1985 г. В том же году он был удостоен Государственной премии СССР.

С начала 90-х годов и на протяжении более 15 лет Ю.Г. Молотковский возглавлял лабораторию химии липидов ИБХ РАН. Благодаря его активной деятельности было установлено плодотворное сотрудничество по применению флуоресцентных липидных зондов для исследования мембранных систем с целым рядом отечественных научных коллективов и с учеными из Швеции, США, Украины. С середины 90-х годов в лаборатории под его руководством получило развитие новое направление исследований — создание систем для направленной доставки противоопухолевых препаратов на основе липосом. Сегодня это направление относится к области новой бурно развивающейся области науки — наномедицины.

Профессора Ю.Г. Молотковского по праву можно назвать атлантом настоящей Науки. Им написано более 240 научных работ. Часть из них опубликована в журнале “Биологические мембраны”, что несомненно способствовало повышению его рейтинга.

Редколлегия журнала “Биологические мембраны”, друзья и коллеги сердечно поздравляют Юлиана Георгиевича с юбилеем, благодарят его за многолетнее и плодотворное сотрудничество и неоценимый вклад в деятельность Редколлегии и желают ему здоровья и творческого долголетия.

Е.Л. Водовозова

С.С. Колесников

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0233475519020087

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Журнал *Биологические мембраны* публикует статьи, обзоры и краткие сообщения, освещающие различные, прежде всего физико-химические и молекулярные аспекты функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы в области клеточной и молекулярной мембранологии и биофизики, а также работы, в которых представлены клеточные и молекулярные аспекты физиологии, фармакологии, иммунологии и медицины. Журнал принимает как экспериментальные, так и теоретические работы в указанных направлениях.

Приветствуются экспериментальные работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты и др.) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз, Ca²⁺-сигнализация и др.).

Предпочтение отдается теоретическим работам, в которых рассматриваются физико-химические свойства мембранных систем в рамках моделей различного уровня детализации, моделируются структура и динамика молекулярных систем, функционирующих в биологических мембранах и в клетке в целом, предлагаются математические модели сигнальных и регуляторных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и клеточных систем.

Английская версия журнала называется “Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology” и распространяется издательством Springer (<http://www.springer.com>).

Типы публикаций. Основным типом публикаций является исследовательская статья, в которой представлены результаты оригинальных экспериментальных и теоретических работ. Рукопись должна преимущественно содержать новые, ранее не опубликованные данные. Допускается использование собственных, уже представленных материалов, если таковые были опубликованы в виде краткого сообщения или тезисов доклада. Ссылка на предварительное сообщение обязательна.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в кратком виде в разделе *Краткие сообщения*. Целесообразность такой внеочередной публикации долж-

на быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

Журнал публикует *обзоры* и *мини-обзоры*, отражающие существующие представления и важнейшие достижения в области мембранологии, биофизики и биологии клетки, молекулярной и клеточной физиологии, иммунологии и медицины.

Не допускается направление в *Биологические мембраны* статей, которые уже были представлены в другой журнал, книгу или для электронной публикации, а также направление в другой журнал статей, представленных в *Биологические мембраны*.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Формат статей. Рукопись должна быть написана либо на русском, либо на английском языке. Текст печатается шрифтом Times New Roman (12 pt), через 1.5 интервала, с полями 3 см слева и 2.5 см сверху, справа и снизу. Объем исследовательской статьи (включая аннотацию, основной текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) не должен превышать 8000 слов и 8 рисунков, обзора – 12000 слов и 8 рисунков, мини-обзора – 4000 слов и 3 рисунка, краткого сообщения – 2000 слов и 1 рисунок. Правила оформления рукописи размещены на сайте <http://www.pleiades.online>.

Рукопись надлежит представлять в электронном виде. Следует присылать единый прикрепленный файл, не превышающий 15 Мб, в формате MS Word (*.doc), содержащий текст, таблицы и рисунки (обычно черно-белые) в последовательности, изложенной ниже. Если объем рисунка превышает 1 Мб, он должен быть прислан в виде отдельного файла. При необходимости файлы рекомендуются сжимать в стандарте *WinZip* или *WinRAR*. Цветные иллюстрации принимаются лишь по согласованию с редакцией, и их публикация оплачивается авторами.

Рукопись должна сопровождаться кратким письмом к Главному редактору от автора для корреспонденции, в котором констатируется, что данная работа (название, авторы) направляется для опубликования в журнале *Биологические мембраны* и что все авторы согласны с направлением статьи в журнал.

Сопроводительные документы. Рукопись статьи должна сопровождаться: (а) письмом-направлением и актом экспертизы от учреждения, в котором выполнена работа; (б) заполненными бланками договоров о передаче авторского права на использование

материалов для русской и английской версий журнала. В случае отклонения статьи договор в силу не вступает.

Сопроводительные документы принимаются в электронном виде. Письмо-направление от учреждения с подписью руководителя и печатью, заполненные и подписанные бланки договоров и титульная страница статьи (см. ниже) с подписями всех авторов сканируются и посылаются (biomembranes2010@gmail.com) в формате jpeg или pdf.

При наличии в авторском коллективе зарубежных соавторов их согласие индивидуально подтверждается письмом, посылаемым в редакцию по электронной почте (biomembranes2010@gmail.com) на имя Главного редактора.

Порядок представления материалов. При оформлении статьи необходимо придерживаться следующего порядка.

Титульная страница:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков без пробелов);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый адрес(а);
- инициалы и фамилия автора для корреспонденции с указанием почтового адреса, контактного телефона, факса, электронного адреса;
- ключевые слова (3–6);
- количество слов в основном тексте;
- количество таблиц;
- количество рисунков;
- подписи всех авторов.

Основной текст:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков, не считая интервалы);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый адрес(а);
- аннотация (до 300 слов)
- ключевые слова (3–6);
- введение
- материалы и методы;
- результаты;
- обсуждение (или результаты и обсуждение)
- благодарности (отдельный абзац без заголовка)
- таблицы (каждая на отдельной странице);
- подписи к рисункам (на отдельной странице);
- список цитированной литературы (на отдельной странице);
- резюме на английском языке или на русском, если основной текст представлен на английском (до 300 слов, на отдельной странице);

- рисунки (пронумерованные, каждый на отдельной странице).

Расположение основных материалов теоретической работы произвольно, хотя следует в целом придерживаться последовательности, изложенной выше. Уравнения должны быть напечатаны предпочтительно с помощью Microsoft Equation Editor. Не рекомендуется использование символов корней, вместо них должны использоваться дробные показатели степени. Двоеточие не должно использоваться как знак деления. Уравнения должны нумероваться с правой стороны в скобках. Символы должны быть определены при первом упоминании в тексте. Если количество символов более 10, они должны быть представлены и определены на отдельной странице.

Математические модели должны быть представлены таким образом, чтобы для широкого круга читателей было понятно, какая система (молекулярная, клеточная и др.) или процесс моделируется, каковы исходные постулаты модели и целесообразность ее использования для описания процесса или системы, а также ограничения модели. Методы решения уравнений модели должны быть описаны в деталях, достаточных для их воспроизведения. Коммерческие программы и используемые в них алгоритмы должны быть упомянуты. основополагающие детали вывода уравнений и/или их решения могут быть представлены в Приложении, помещаемом в конце работы.

Аннотация (не более 300 слов) обязательна для статьи (обзора) и должна давать ясное представление о сути работы, объектах и методах исследования, основных результатах и сделанных выводах.

Раздел **Материалы и методы** должен содержать информацию о методах исследования, достаточную для их ясного понимания и воспроизведения. Методы, описанные ранее, могут быть представлены в краткой форме и должны сопровождаться адекватными ссылками. Необходимо указывать квалификацию и источник основных реактивов; название (в оригинальной транскрипции) фирмы-изготовителя реактивов/оборудования и страна приводятся в скобках (Serva, Германия). Используемые статистические методы обработки данных, графические программы и т.п. также должны быть указаны.

Таблицы (и рисунки) нумеруются в порядке упоминания их в тексте. Каждая таблица должна иметь заголовок и, если необходимо, краткие пояснения к представленным данным (условия эксперимента, число экспериментов и т.п.).

Рисунки должны быть выполнены с разрешением не менее 300 dpi и в масштабе, допускающем их двукратное уменьшение без потери качества. В сложных рисунках со множественными панелями каждую следует пометить курсивной буквой (*a, б, в* ...). На графиках следует использовать стандартные символы (▲ ▼ ● ○ ◆ □ ■). В нижней части рисунка необходимо указать его порядковый номер и фамилию первого автора.

Электронные версии штриховых рисунков и полутонных фотографий должны представляться в формате JPEG или TIFF.

Цитирование литературы. Ссылка на цитируемую работу дается в тексте цифрой в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Если ссылка на работу есть в таблице или в подписи к рисунку, ей присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Авторы несут полную ответственность за правильность цитирования работ. Последние должны быть либо опубликованными, либо принятыми в печать. Ссылки на тезисы докладов, диссертации, авторские свидетельства следует приводить только, если они являются единственным источником. Цитирования типа “неопубликованные данные” или “персональное сообщение” не должны включаться в список литературы, но допускаются в тексте (например, Прутков К.Ф., персональное сообщение). При этом предполагается, что авторы получили разрешение на цитирование в какой-либо форме.

Список цитированной литературы должен оформляться следующим образом:

Статья в журнале

Карпушев А.В., Павлов Т.С., Старушенко А.В. 2009. Регуляция эпителиальных натриевых каналов (ENaC) малыми G-белками и фосфатидилинозитидами. *Биол. мембраны*. **26** (4), 265–279.

Takeuchi H., Imanaka Y., Hirano H., Kurahashi T. 2003. Cross-adaptation between olfactory responses induced by two-subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**, 255–264.

Книга

Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с.

Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.

Статья в книге

Леднев В.В. 1977. Исследование структуры актинсодержащих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: *Молекулярная и клеточная биофизика*. Ред. Франк Г.М. М.: Наука, с. 164–172.

Keating M.T. 1995. Molecular genetics of the long QT syndrome. In: *Ion channels and genetic diseases*. Eds Dawson D.C., Frizzell R.A. New York: The Rockefeller University Press, p. 53–60.

Статья, принятая в печать

Додонова С.О., Крупенина Н.А., Булычев А.А. 2010. Подавление H^+ -проводимости плазмалеммы на фоне высокой активности H^+ -насоса в клетках *Chara* под действием дитиотреитола. *Биол. мембраны* (в печати).

Во многих международных журналах статьи, принятые в печать, публикуются в электронном виде до выхода бумажной версии. При этом статьи идентифицируются с использованием DOI (digital

object identifier), и их следует цитировать в оригинальном формате:

Komaki S., Abe T., Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T. 2010. Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *J. Cell Sci.* doi: 10.1242/jcs.062703.

Если работы, которые цитировались как **в печати**, были опубликованы на момент получения корректуры, авторы должны внести необходимые исправления в список литературы.

Сокращения и аббревиатуры. Стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (*Eur. J. Biochem.* 1977, 74(1), 1–6), могут быть использованы непосредственно. Нестандартные сокращения химических соединений, сокращения общего характера разрешается вводить лишь в случае многократного употребления. Их следует ввести (в скобках) при первом же использовании сложного словосочетания в основном тексте статьи, например: активные формы кислорода (АФК).

Аббревиатуры или формулы химических соединений, употребляемые как прилагательные, пишутся через дефис: ИК-спектроскопия, ЖК-состояние, Na^+ -форма, ОН-группа, но группа ОН.

Размерности отделяются от цифры пробелом (100 кПА, 77 К), кроме градусов, процентов и промилле: 90°, 20°C (для градусов Цельсия 20°C, а не 20°), 45%, 10‰. Дробные размерности: 58 Дж/моль, 10 моль/л. Для более сложных размерностей допускается использование степеней, в том числе отрицательных; символы различных размерностей должны быть отделены пробелом: 9.8 м/с² или 9.8 м с⁻², 37 Дж моль⁻¹ град⁻¹. Единообразие написания размерностей в рукописи является обязательным.

При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (10–30 Дж/моль, 22–25°C), за исключением угловых градусов (5°–10°, а не 5–10°). Размерности переменных пишутся через запятую (*E*, кДж/моль), подлогарифмических величин – в круглых скобках без запятой: $\ln t$ (мин).

Специальные символы и цифры. Для печати специальных символов (греческие буквы, математические символы, графические символы и т.п.) следует использовать функцию *Insert Symbol* в редакторе *Microsoft Word*. Десятичные доли в числах отделяются точкой (3.14, а не 3,14).

Репринты. После выхода журнала издательство высылает авторам бесплатно PDF-файлы русской и английской версии статьи.

Адрес редакции: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, корп. 32, комн. 411, редакция журнала *Биологические мембраны*. Телефон редакции: 8(499)724-80-89. E-mail: biomembranes2010@gmail.com.