

СОДЕРЖАНИЕ

Том 39, номер 4, 2022

**Тематический выпуск “Патофизиология ионного транспорта
и внутриклеточной сигнализации”
к 100-летию со дня рождения профессора Бориса Израилевича Ходорова
(редакторы-составители С.В. Ревенко и А.М. Сурин)**

Долгожитель и рыцарь науки. К 100-летию юбилею Б. И. Ходорова

П. Д. Брежестовский

243

ОБЗОРЫ

Структурные основы функционирования глутаматных рецепторов

М. В. Елшанская, А. И. Соболевский

251

Na⁺, K⁺-АТФ-аза как полифункциональный белок

О. Д. Лопина, О. В. Букач, С. В. Сидоренко, Е. А. Климанова

271

Нарушение кальциевого гомеостаза и ответные изменения в кальциевой
сигнализации нейронов и глиальных клеток
при фотодинамическом воздействии

В. А. Дзряян, А. М. Хайтин, С. В. Демьяненко

283

Физиология перехватов Ранвье живых миелиновых волокон

О. С. Сотников, С. В. Ревенко

292

Изменения рН в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной
глутаматом дисрегуляции Са²⁺-гомеостаза в культивируемых
нейронах гиппокампа крысы

*А. М. Сурин, Л. Р. Горбачева, И. Г. Савинкова,
Р. Р. Шарипов, В. Г. Пинелис*

307

Contents

Vol. 39, No. 4, 2022

**Thematic issue “Pathophysiology of ion transport and intracellular signaling”
To the 100th anniversary of the birth of Professor B.I. Khodorov
Publication editors, S.V. Revenko and A.M. Surin**

A Long-liver and a Knight of Science. To the 100th Anniversary of B. I. Khodorov

P. D. Bregestovski

243

REVIEWS

Structural Insights into Function of Ionotropic Glutamate Receptors

M. V. Yelshanskaya, A. I. Sobolevsky

251

Na,K-ATPase As a Polyfunctional Protein

O. D. Lopina, O. V. Bukach, S. V. Sidorenko, E. A. Klimanova

271

Disruption of Calcium Homeostasis and Following Changes of Calcium Signaling
in Neurons and Glial Cells in Response to Photodynamic Treatment

V. A. Dzreyan, A. M. Khaitin, S. V. Demyanenko

283

Physiology of Ranvier Nodes in Living Myelinated Fibers

O. S. Sotnikov, S. V. Revenko

292

pH Changes in the Mitochondrial Matrix and Cytosol during Glutamate Deregulation
of Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Rat Hippocampal Neurons

A. M. Surin, L. R. Gorbacheva, I. G. Savinkova,

R. R. Sharipov, V. G. Pinelis

307

ДОЛГОЖИТЕЛЬ И РЫЦАРЬ НАУКИ. К 100-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ Б. И. ХОДОРОВА

© 2022 г. П. Д. Брежестовский^{a, b, *}

^aInstitut de Neurosciences des Systèmes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, 13005 France

^bИнститут нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420111 Россия

*e-mail: pbreges@gmail.com

DOI: 10.31857/S023347552204003X



17 января 2022 года исполнилось 100 лет со дня рождения выдающегося нейрофизиолога и педагога Бориса Израилевича Ходорова.

Из официального списка: заслуженный деятель науки РФ, почетный член Академии естественных наук, лауреат Государственной премии, доктор медицинских наук, профессор, один из создателей отечественной школы исследований в биофизике мембран и нейрофизиологии, автор более 200 статей, 4 монографий и учебника по физиологии. А также — ветеран Великой Отечественной войны, был дважды контужен, награжден орденами Красной звезды и Отечественной войны и медалями “За освобождение Варшавы”, “За взятие Берлина”, “За победу над Германией”.

А если неофициально — это удивительный человек, редчайший представитель рыцарей и долгожителей науки, в котором соединились воедино страсть разгадывать неизведанное, творческий талант экспериментатора и идеолога, умение решать сложнейшие задачи и излагать знания в статьях, обзорах и книгах. По его монографиям и учебникам училось несколько поколений биофизиков, физиологов и нейробиологов. Его экспериментальные и обзорные работы получили международное признание, вошли в мировую сокровищницу знаний. В книге Бертилла Хилле “Ионные каналы биологических мембран” [1], с самым фундаментальным изложением проблем в этой области, Б.И. Ходоров является одним из самых цитируемых авторов и самым цитируемым из российских ученых.

Биография Б.И. Ходорова — история прошедшего войну человека, которого судьба не баловала и в мирное время. Это история талантливого ученого, разностороннего, ищущего, сделавшего важный вклад в исследование возбудимых мембран, молекулярно-клеточных основ нейротоксичности, в биофизику и физиологию нервной системы.

Б.И. Ходоров родился в 1922 г. в Крыму, в городе Керчь. Его воспитанием первые годы много занималась бабушка. Она была предпоследним, 18-м ребенком в многодетной семье “крымчачей” — так звали тогда коренных жителей Крыма. Бабушка гуляла с маленьким Борей по паркам города, водила по музеям, на концерты, рассказывала о многих исторических событиях. Дома она развешивала картинки разных стран, и они вдвоем, переходя от картинки к картинке, путешествовали по всему земному шару. Борис рос озорным, сверхбыстро мыслящим мальчишкой, увлекающимся шахматами и интересующимся всем неизведанным.

В 1934 году семья переехала в Севастополь. Благодаря замечательным школьным преподава-

телям этот период детского образования был особенно интенсивным и увлекательным. Кроме уроков были кружки, интересные вечера. В письмах Борис Израилевич вспоминал: “На литературном кружке мы читали Софокла, Эмпедокла и другие литературные шедевры: трагедии и драмы Эсхила, Эврипида и других древнегреческих драматургов и писателей. По вечерам устраивали музыкальные концерты, где играли на рояле произведения Моцарта, Бетховена и рассказывали о жизни этих композиторов.”

Его воспоминания переплетаются веселыми историями из школьной жизни. “Математику нам преподавала Маргарита Михайловна Меньшилова. Это была женщина невысокого роста, с седыми волосами, отличалась строгим выражением лица и большой требовательностью. Мы ее звали “Маргоша”. На одном из уроков математики случилась смешная история. В этот день я был дежурным по классу. С моим товарищем, Сережей Джанджанияном, мы сидели в первом ряду, но далеко от доски, на которой Маргоша цветными мелками излагала тригонометрическую теорему. Мы же с Сережей были увлечены шахматами, играли “вслепую”, без шахматной доски, передавая друг другу ходы на листике бумаги. Маргоша заметила, что мы заняты чем-то далеким от ее теоремы, и громким голосом вызвала меня к доске. Услышав “Ходоров, к доске!” и вспомнив, что я дежурный по классу, я стремительно подбежал к доске, и мокрой тряпкой стер все! Класс застыл... Но тут раздался спасительный звонок – перемена.”

В школьные годы, особенно после переезда в Севастополь, Борис страстно увлекался шахматами. Дома у него было три комплекта шахматных фигур, и в свободное от школьных занятий время Борис занимался изучением теории шахматной игры, решал шахматные задачи, а также разыгрывал партии великих шахматистов, особенно блестящие партии Алёхина из его книги “Мои 100 лучших партий”. В результате в одном из турниров он стал чемпионом г. Севастополя. Щуплый мальчишка любил играть в севастопольском парке, где в сеансах одновременной игры на 20–30 досках обыгрывал многих “взрослых дядей”. Страсть к шахматам осталась на всю жизнь. Он рассказывал, что в “копилке” его шахматных достижений есть ничья с чемпионом мира по шахматам Михаилом Талем.

В школьный период Борис изучал также иностранные языки (немецкий, французский). Но самое большое влияние оказал преподаватель физики, благодаря которому у юноши проявился интерес к электрическим процессам в клетках биологических организмов. Борис вспоминал: “В один прекрасный день преподаватель пришел на урок и предложил нам написать сочинение по физике на одну из самостоятельно выбранных

тем – например, о Фарадее, Вольта или Гальвани, открывшем животное электричество. Это предложение меня очень заинтересовало – тем более, что он сказал, что в последних журналах “Пионер” опубликованы статьи о спорах Гальвани и Вольта о том, существуют ли у животных электрические явления. Как известно, этот спор в течение многих лет велся в письмах, посылаемых друг другу Гальвани и Вольта (тогда не было научных журналов). В итоге этот спор завершился двумя открытиями. Гальвани обнаружил, что в нервах и мышцах при их возбуждении действительно возникают электрические токи, а Вольта доказал, что при опускании разнородных металлов в соляной раствор возникает разность потенциалов между ними. Таким образом, он изобрел первую электрическую батарейку.

Популярных статей, описывающих работы Гальвани и Вольта, я так и не прочитал, но в книжных магазинах Севастополя нашел книгу о переписке Гальвани и Вольта с блестящей статьей Лебединского, посвященной истории открытий, связанных с проблемами электрофизиологии. В 9-м и 10-м классе я усиленно занимался чтением различных статей, посвященных проблеме “животного электричества”, и даже написал многостраничный очерк по истории основных открытий в этой области, рассчитанный на такого читателя, как школьник старших классов. Это сочинение определило основное направление моих дальнейших исследований в области физиологии нервной клетки.”

Окончив с отличием среднюю школу в 1939 г., Борис Ходоров поступил в Харьковский Мединститут, где с первого курса начал заниматься экспериментами на кафедре нормальной физиологии под руководством доцента Виктора Михайловича Василевского. Когда началась война, их курс был эвакуирован в Среднюю Азию, где Борис продолжал учебу и занятия физиологией в Ташкентском медицинском институте. Здесь он вел “Ташкентский дневник”, в котором излагал в виде небольших очерков мысли, наблюдения, гипотезы. Этот дневник сохранился. Борис Израилевич показывал его нам. Поражает качество и строгость изложения мыслей молодого студента: очень мало исправлений и помарок, словно записывались выученные наизусть стихи или фразы.

Первой изложена работа “Гипотеза действия и взаимодействия нервных медиаторов в скелетной мышце и на сердце”, которая предваряется посвящением Виктору Михайловичу Василевскому, в благодарность за руководство и наставления в проведении первых студенческих опытов. Эти ранние записи “Ташкентского дневника” стали фундаментом его будущих экспериментальных исследований, статей, обзоров и книг.

В августе 1944 г. Борис Ходоров окончил с отличием Мединститут и был мобилизован в ряды

Красной Армии. После трехмесячных курсов военных врачей военкомат направил Б.И. Ходорова под Минск, на должность старшего врача в гаубичный артиллерийский полк 1-го Белорусского фронта. На плечи малоопытного эскулапа свалилась забота о 1000 солдат и офицеров, которым нужно было обеспечить здоровье и благополучие. В составе этого полка молодой военный врач прошел до реки Эльбы, где и встретил день Победы. Вот как он вспоминал это событие: “Находясь на берегу Эльбы, отделявшей нас от американских соединений, мы только утром 9 мая узнали о том, что закончилась война. Дело было так: обычно утром, в 8 утра полк выходил на построение, на котором командование сообщало о плане действий на этот день и о происшествиях за ночь. Но 9 мая команды на построение ни в 8, ни в 9 утра не было, и мы недоумевали, что это значит. Мы понимали, что конец войны близок, но рядом с нами были американцы, и в разгоряченные головы некоторых наших офицеров приходили мысли о том, что нужно теперь открыть огонь по американцам, чтобы не уступить им завоеванную немецкую землю. Но вот, наконец, около 11 часов утра нас всех собрали, и командир полка Ашихмин сообщил нам, что война закончена, немцы подписали безоговорочную капитуляцию.

Удивительное дело, все мы, так долго ждавшие этой минуты, не могли почувствовать торжественность происшедшего. Несколько офицеров открыли коньяк, выпили и не знали, что им говорить, открывалась новая жизнь, которая казалась совершенно неожиданной для каждого из нас...”



Б.И. Ходоров, 1945 год, Германия

После окончания войны полк, в котором служил Б.И. Ходоров, был еще на год оставлен в Германии, в составе Советских оккупационных войск. Только в 1946 году части были возвращены на Родину, и молодой военный врач оказался в Москве. Однако мечты о том, что сразу после возвращения его демобилизуют и он получит долгожданную возможность продолжения начатой в студенческие годы научной работы, оказались напрасными: к этому времени по всей армии был издан приказ о том, что всеобщая демобилизация закончена.

По воспоминаниям Б.И. Ходорова, освобождение пришло совершенно неожиданным образом: “В то время у меня было достаточно времени чтобы посещать центральную медицинскую библиотеку, расположенную поблизости от нашего местоживания, — в районе площади Восстания. Там мне разрешили пользоваться залами иностранной литературы, где я наслаждался возможностью просматривать новейшие международные журналы, которые в те времена рекой лились в нашу страну из Америки и Европы. В одном из журналов я наткнулся на статью, основным автором которой был профессор Е.Б. Бабский. В этой статье мне что-то не понравилось и мне очень хотелось высказать ему свои возражения. Но где его искать?”

И тут неожиданно я узнал, что в соседнем с нашим общежитием доме расположен институт курортологии, в котором профессор Бабский руководит большой физиологической лабораторией. На следующий же день я направился на поиски указанной лаборатории, разыскал ее и обратился к одному из работников лаборатории с просьбой выяснить: не сможет ли Бабский меня принять. По-видимому, я был первым военным гостем этой лаборатории, поэтому меня любезно препроводили в кабинет профессора Бабского. Меня встретил энергичный, сравнительно молодой мужчина, с интересом разглядывающий первого в истории лаборатории военного врача. На вопрос, чем он может быть мне полезен, я сказал, что в медицинской библиотеке прочитал его статью и хотел бы рассказать ему, почему не согласен со сделанным там основным выводом (речь шла о роли ацетилхолина в механизме нервного проведения). Он страшно удивился тому, что только что вернувшийся с войны молодой человек мог вступать с ним в спор, а еще больше удивился, когда выяснил, что я изучал основы физиологии, читая его учебник “Физиология человека” и руководство Гайтона, которое, как оказалось, послужило основой для создания этого русского учебника. Он мне сказал, что он убежден в том, что ни один русский физиолог это руководство Гайтона не только не читал, но и даже не видел!”

В результате молодой военный врач настолько заинтересовал Е.Б. Бабского, что он написал министру высшего образования ходатайство об освобождении Б.И. Ходорова от военной службы, которое поддержал академик Я.О. Парин. Ходатайство было удовлетворено. Началась новая жизнь: Б.И. Ходоров стал сотрудником лаборатории физиологии и начал эксперименты, которые предложил ему Е.Б. Бабский. Вдохновенная экспериментальная работа привела к неожиданному результату: Б.И. Ходоров получил данные, противоположные тем, которые предполагал Бабский и опровергающие концепцию шефа. После многочасовых разговоров и споров Бабский предложил страстному и непокорному исследователю вести работу без его непосредственного руководства. В результате Б.И. Ходоров самостоятельно завершил этот цикл исследований и блестяще защитил в 1949 году кандидатскую диссертацию. Его первые работы по электротону и аккомодации, а также изучению внутреннего торможения условных рефлексов были опубликованы без соавторов [2–5]. Это редчайший случай для начинающего ученого-экспериментатора.

Однако начавшаяся хорошо складываться послевоенная жизнь не баловала талантливого исследователя и преподносила ему неожиданные сюрпризы. В марте 1953 г. во многих научных учреждениях страны внезапно была произведена “реорганизация кадров”, связанная с так называемым “делом врачей”. В результате, в компании двух десятков других научных сотрудников еврейской национальности Б.И. Ходоров был уволен из Института биологической химии и долго не мог в Москве устроиться на работу по специальности.

В связи с этим увольнением Б.И. Ходоров вспоминал смешной эпизод. Освобождая комнату от оборудования, озорной исследователь нарисовал большую рамку на стене, возле которой стояла его экспериментальная установка. Внутри рамки он написал: “Для мемориальной доски Б.И. Ходорова”. Когда через несколько месяцев, после ремонта пришли принимать комнату, то обнаружили, что мастера аккуратно покрасили все стены, оставив нетронутой рамку с Ходоровской надписью...

Несколько лет Б.И. Ходоров проработал в НИИ протезирования и протезостроения, а также Институте курортологии, и только в 1957 г. он был избран на должность старшего научного сотрудника в НИИ хирургии им А.В. Вишневского АМН СССР, где создал лабораторию биофизических исследований — пионерского направления той эпохи.

НИИ хирургии им А.В. Вишневского в шутку называли “Институт Отца, Сына и Новокаина”, поскольку его основал А.В. Вишневский (1874–

1948), а директором в то время был его сын А.А. Вишневский (1906–1975); они разработали учение о лечебном действии новокаина при ряде патологических процессов. Новокаин в те годы применяли не только при малых локальных, но и при полостных операциях и даже операциях на сердце.

Вишневский-сын отличался смелым отношением к новым начинаниям и удивительным для хирурга благожелательным отношением к фундаментальной науке. Благодаря его поддержке Б.И. Ходоров получил возможность организовать лабораторию, в которой начались интенсивные исследования по выяснению механизма действия новокаина на клеточном уровне. В 1959 г. в соавторстве с А.А. Вишневым выходит его работа “О физиологическом механизме прямого действия новокаина на нерв” [6]. Эта работа положила начало ряду пионерских работ, получивших мировое признание. Здесь проявились таланты Б.И. Ходорова как организатора, идеолога и научного стратега. Вместе с учениками и коллегами он создал высококачественные электрофизиологические установки для регистрации электрических сигналов в перехватах Ранвье изолированных нервных волокон. На этом объекте изучали влияние различных анестетиков и других веществ на генерацию потенциалов действия. Параллельно использовались математические модели, прежде всего модель Ходжкина–Хаксли, для выяснения того, путем какой вариации параметров активации и инактивации можно симулировать наблюдаемые в экспериментах изменения локальных токов и мембранных потенциалов действия.

Были разработаны другие оригинальные экспериментальные модели, позволившие сделать ряд открытий по расшифровке механизмов действия нейротоксинов и местных анестетиков на возбудимость ионных каналов [7, 8]. Эти работы являлись важными кирпичиками знаний о механизмах функционирования ионных каналов. Они вошли в учебники, книги и руководства по биофизике и физиологии нервной системы. Б.И. Ходоров их суммировал в монографиях “Проблема возбудимости” (1969) и “Общая физиология возбудимых мембран” (1975), а также в ряде обзоров на английском языке [9–12].

Многие идеи и результаты исследований были далеко впереди эпохи. Например, еще в 1969 году, когда представления об аминокислотной и структурной организации ионных каналов были неизвестны, Б.И. Ходоров и соавторы предложили молекулярный механизм действия местных анестетиков на натриевые каналы, правильность которого была напрямую подтверждена американскими учеными только почти через 50 лет, после получения в 2011 г. кристаллической структуры натриевого канала.

На этом необходимо остановиться подробнее. В 2011 и 2012 годах из лаборатории Б. Каттерала (США) вышли работы, описывающие кристаллическую структуру потенциал-управляемого натриевого канала из бактерии *Arcobacter butzleri*. Структура, полученная с разрешением 2.7 Å, позволила выяснить многие свойства в архитектуре натриевого канала. Были получены размеры фильтра селективности, определены структуры, обеспечивающие конформационные изменения, приводящие к открыванию ионной поры [13, 14].

Кроме того, в кристаллической структуре канала были обнаружены отверстия (фенестрации) в боковых стенках пор. Эти фенестрации образуются в участках соединения субъединиц, формирующих функциональный бактериальный канал, и обеспечивают гидрофобный путь лекарственных препаратов от липидной фазы мембраны к участку ион-проводящей поры [13–15].

Аналогичные фенестрации обнаружены недавно в натриевом канале $Na_v1.5$, который обеспечивает генерацию потенциалов действия сердечных мышц млекопитающих [16–18]. Эти отверстия в боковых стенках пор наблюдаются в структурах натриевых каналов других типов эукариотических клеток и обеспечивают гидрофобный путь от липидной фазы мембраны к поре ионного канала [19–21]. Отверстия достаточно велики, чтобы пропускать лидокаин, другие местные анестетики и антиаритмические препараты.

Таким образом, предположения, высказанные в ранних работах Б.И. Ходорова, получили убедительные подтверждения и доказательства спустя полвека.

В эпоху, когда представления об организации ионных каналов были гипотетическими, в монографии “Проблема возбудимости” (1969) [22] Б.И. Ходоров не только ставил важные вопросы о том, каким образом осуществляется ионная избирательность в каналах и как потенциал активирует канал, но и предлагал ответы, требующие экспериментальных проверок. Эта книга имела большой резонанс в Советском Союзе, стимулировала многих ученых на исследование модели Ходжкина–Хаксли и проблем, связанных с генерацией потенциалов действия и передачи электрических сигналов в нервной системе.

Однако через 30 лет успешной работы в НИИ хирургии им А.В. Вишневого АМН СССР Б.И. Ходорова ждало новое испытание. В разгар перестройки, в 1988 г. пришло новое руководство, которое успешно разваливало фундаментальную науку. Было принято решение закрыть лабораторию биофизических исследований как не соответствующую профилю работы Института. Вклад Б.И. Ходорова в фундаментальную науку был забыт (или, вероятнее всего, даже не осознан). Большинство сотрудников перевели в

другие отделы, часть оборудования забрали. Б.И. Ходоров с несколькими ближайшими учениками (Ю. Зильбертер, С. Соколова, Л. Мотин, А. Папин) и остатками оборудования перешел в НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН.

Начался очень трудный этап научной деятельности, когда в уже солидном (пенсионном) возрасте организацию новой лаборатории нужно было начинать почти с нуля. Время было очень тяжелое для всей страны и особенно для науки. Сергей Ревенко, один из учеников Б.И. Ходорова, вспоминает: “В моей памяти остался такой эпизод. Примерно в 1992 году мы вдвоем с БИ (Борисом Израилевичем) шли зимой по Москве на семинар в Институт мозга. Была омерзительная погода с мокрым снегом и ветром. БИ плохо переносил холод, он был одет в тяжелое зимнее пальто. Ему было физически нелегко идти. Мы молчали. Ветер дул в лицо, настроение у меня было мрачное — я мучился проблемой, как одеть и накормить своих детей. И в тот момент у меня сверкнула мысль — вот идет человек, который в свои 70 лет готов с нуля и в условиях разрухи начать новое направление в науке. Эта задача тяжелее, чем организация его лаборатории биофизики в 60-е годы, но он за нее берется! Откуда такая сила духа? До меня дошло — это идет фронтовик-победитель, у него иные масштабы понимания проблем и трудностей.”

Для работы в новом Институте необходимо было кардинально сменить экспериментальные модели и задачи исследований. Директор Института патофизиологии Г.Н. Крыжановский с большим уважением относился к Б.И. Ходорову и его вкладу в науку. Он предоставил новому сотруднику свободу в выборе тематики. У Б.И. Ходорова зародился интерес к проблеме гибели нейронов. Окончательно идея нового направления — патофизиология нейронов головного мозга — сформировалась в ходе поездки в США с Г.Н. Крыжановским.

Были созданы установки для регистрации ионных токов с помощью метода пэтч-кламп. Основным экспериментальным материалом стали нейроны мозга, в частности гиппокампа. Официально коллектив работал несколько лет как группа, а в 2001 году новым директором Института академиком А.А. Кубатиным была создана лаборатория “Патологии ионного транспорта и внутриклеточной сигнализации”.

В результате Б.И. Ходоров с сотрудниками создал новое для науки в России направление по исследованию молекулярно-клеточных основ нейротоксичности. Пионерские работы по изучению нарушения кальциевого гомеостаза нейронов мозга при гиперстимуляции глутаматных рецепторов, а также выяснению роли митохондрий в

нейротоксичности клеток мозга [23–26] получили широкое международное признание.



85-летний юбилей Б.И. Ходорова, 2007 год.
Слева направо: А.А. Болдырев, Б.И. Ходоров,
Г.Н. Крыжановский и А.А. Кубатиев

Страсть к неизведанному Б.И. Ходоров умел распространять и на окружающих, привлекая активно и плодотворно работающих ученых. Таким образом установилось долготлетнее сотрудничество с профессором В.Г. Пинелисом, который вспоминает: “Я встретился с Борисом Израилевичем в 1988 году, когда он еще работал в Институте хирургии. Он сразу меня сиюминутным предложением заниматься внутриклеточной сигнализацией в нейронах мозга, опираясь на первые данные, полученные в лаборатории проф. И.В. Викторова в НИИ мозга АМН. Эта встреча кардинально изменила программу исследований нашей лаборатории мембранологии Научного центра здоровья детей АМН. И вот уже более 20 лет вместе с Борисом Израилевичем мы занимаемся механизмами глутаматной нейротоксичности. За это время во многом впервые получен ряд основополагающих результатов, которые широко цитируют ученые ведущих лабораторий мира. В частности, была установлена важная роль натрий-кальциевого обмена в нарушениях кальциевого гомеостаза при токсическом действии глутамата, показано, что в фазе высокого внутриклеточного кальция происходит разобщение окислительного фосфорилирования вследствие

увеличения проводимости митохондриальной мембраны и др.”

Получение этих знаний давалось непросто и Борису Израилевичу, и особенно его сотрудникам. Вряд ли найдется хоть один соавтор Б.И. Ходорова, с которым бы не произошел спор относительно интерпретации экспериментальных результатов. И самое удивительное, что в подавляющем большинстве случаев он был прав. Вот как пишет об этом многолетний сотрудник Б.И. Ходорова, д.б.н. А. Сурин: “Часто возникало чувство досады от того, что БИ всегда лучше меня помнил полученные мною же результаты. И это несмотря на то, что обсуждали план эксперимента мы всегда вместе, но я, сверх того, выполнял эксперимент, обсчитывал, делал графики, писал черновой текст. Депрессия от собственной неполноценности частично компенсировалась восхищением интеллектуальной мощностью мозга БИ. Только через много лет совместной работы я понял, что БИ всегда готовился к нашим встречам и обсуждениям результатов и предварительно просматривал материал. Я и теперь восхищаюсь тем, что БИ не загубил, как многие, а в полной мере развил Божий дар – свой мозг. Огромное уважение вызывает и его отношение к работе: тщательная подготовка к беседе с любым из сотрудников. Даже если подводило здоровье и плохо работающие органы отвлекали мозг от самого интересного – от думанья. Порой мне казалось, что для БИ обсуждение проблемы и проверка рабочей гипотезы – это решение красивой шахматной задачи.”

В своих критических суждениях он мог быть жестким, саркастичным, а также снисходительным, но в этой снисходительности была беспощадность. Бывшая студентка Б.И. Ходорова Уна Дрифф вспоминает: “В один из зимних вечеров я должна была прийти к БИ с отчетом о проделанных опытах. Как обычно, он проводил меня на кухню. В моем распоряжении было сразу два холодильника. Он налил мне чая, посидел со мной и сказал: “Хатуночка, ты тут не торопись, поешь, а я пойду, прочитаю, что ты принесла”. Я сидела на кухне и наслаждалась бутербродом с икрой, когда услышала часто употребляемые, но непечатаемые слова. Такие эмоции вызвали у него ошибки в моем тексте. Бросив свой бутерброд, прибежала к нему в кабинет и с удивлением спросила: “Борис Израилевич, вы можете и так изъясняться?” В ответ услышала: “Деточка, а ты думаешь, что в Академии наук говорят только языком Пушкина?!”

Благодаря редкому таланту общения и умения привлекать к себе интересных, творческих людей, Б.И. Ходоров сформировал целую плеяду ученых, плодотворно работающих в ведущих научных центрах России и разных стран мира. Он автор четырех монографий, а также учебника

“Физиология человека” (в соавторстве с Е.Б. Бабским и Г.И. Косицким).

По инициативе Э. Хаксли книга Б.И. Ходорова “Проблема возбудимости” была переведена на английский язык. Кроме того, опубликованы десятки обзоров и сотни статей. Последняя глава в книгу “Horizons in Neuroscience Research” написана в конце 2013 года, на 92-м году жизни. Работа поражает ясностью изложения, обилием обсуждаемого экспериментального материала и четкостью заключений [27].

Невозможно обойти вниманием еще одно качество Б.И. Ходорова: его видение окружающего мира и событий через призму юмора. Он рассказывал невероятно интересные истории, анекдоты, байки. Известно много его острых эпиграмм на коллег и знакомых и веселых розыгрышей.

Чувство юмора никогда не покидало Бориса Израильевича. В честь его 85-летнего юбилея была конференция, создали фильм и был, конечно, тематический номер “Биологических мембран”. Один из юбилейных выпусков Б.И. Ходоров подарил автору этих строк с надписью: “Петя, как можно дольше вспоминайте меня здесь, а я уж позабочусь о доброй встрече в хорошей компании там! Ваш Б.И. 14.06.07”.

Дорогой Борис Израилевич! Мы помним, вспоминаем, преклоняемся.

Поддержано грантом РФФ, 18-15-00313. В статье использованы материалы, опубликованные ранее в газете “Троицкий вариант” 26.08.2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hille B. 1984. *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, Mass.: Sinauer. 427 p.
- Ходоров Б.И. 1950. Электротон и аккомодация. *Усп. соврем. биол.* **29** (3), 329–359.
- Ходоров Б.И. 1954. Влияние условного рефлекса на размеры безусловных оборонительных рефлексов у собак. *Журн. высшей нервной деятельности им. Павлова.* **4** (6), 52–61.
- Ходоров Б.И. Влияние условного раздражителя во время его применения на основе безусловного рефлекса. *Журн. высшей нервной деятельности им. Павлова.* **4** (6), 61–69.
- Ходоров Б.И. 1955. Модификация условного рефлекса следуя сходству с безусловным рефлексом. *Журн. высшей нервной деятельности им. Павлова.* **5** (2), 262–270.
- Вишневецкий А.А., Ходоров Б.И. 1959. О физиологическом механизме прямого действия новокаина на нерв. *Эксп. хирургия.* **4**, 3–10.
- Ходоров Б.И., Беляев В.И. 1965. Изучение механизма действия новокаина на электрическую активность перехвата Ранвье. *Биофизика.* **10**, 625–633.
- Khodorov B.I., Belyaev V.I. 1966. Effect of Novocain on electrical activity of single nodes of Ranvier. *Federation proceedings. Translation supplement; selected translations from medical-related science.* **25** (3), 447–451.
- Khodorov B.I., Timin E.N. 1975. Nerve impulse propagation along nonuniform fibres. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **30** (2–3), 145–184.
- Khodorov B.I. 1981. Sodium inactivation and drug-induced immobilization of the gating charge in nerve membrane. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **37** (2), 49–89.
- Khodorov B.I. 1985. Batrachotoxin as a tool to study voltage-sensitive sodium channels of excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **45** (2), 57–148.
- Khodorov B.I. 1991. Role of inactivation in local anesthetic action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **625**, 224–248.
- Payandeh J., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, **475** (7356), 353–358.
- Payandeh J., Gamal El-Din T.M., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature.* **486** (7401) 135–139.
- Catterall W.A., Wisedchaisri G., Zheng N. 2020. The conformational cycle of a prototypical voltage-gated sodium channel. *Nature Chem. Biol.* **16** (12), 1314–1320.
- Jiang D., Shi H., Tonggu L., Gamal El-Din T.M., Lenaeus M.J., Zhao Y., Yoshioka C., Zheng N., Catterall W.A. 2020. Structure of the cardiac sodium channel. *Cell.* **180** (1), 122–134.
- Jiang D., Banh R., Gamal El-Din T.M., Tonggu L., Lenaeus M.J., Pomès R., Zheng N., Catterall W.A. 2021. Open-state structure and pore gating mechanism of the cardiac sodium channel. *Cell.* **184** (20), 5151–5162.
- Catterall W.A., Lenaeus M.J., Gamal El-Din T.M. 2020. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 133–154.
- Shen H., Zhou Q., Pan X., Li Z., Wu J., Yan N. 2017. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science.* **335** (6328), eaal4326.
- Yan Z., Zhou Q., Wang L., Wu J., Zhao Y., Huang G., Peng W., Shen H., Lei J., Yan N. 2017. Structure of the Nav1.4-β1 complex from electric Eel. *Cell.* **170**, 470–482.e11
- Pan X., Li Z., Zhou Q., Shen H., Wu K., Huang X., Chen J., Zhang J., Zhu X., Lei J., Xiong W., Gong H., Xiao B., Yan N. 2018. Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with β1. *Science.* **362** (6412), eaau2486.
- Ходоров Б.И. 1969. *Проблема возбудимости*. М.: Наука.
- Vergun O., Keelan J., Khodorov B., Duchon M. 1999. Glutamate-induced mitochondrial depolarization and perturbations of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **519** (Pt 2), 451–466.

24. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 279–351.
25. Khodorov B.I., Storozhevykh T.P., Surin A.M., Yuryavichyus A.I., Sorokina E.G., Borodin A.V., Vinskaya N.P., Khaspekov L.G., Pinelis V.G. 2002. The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca^{2+} homeostasis. *Neurosci. Behav. Physiol.* **32** (5), 541–547.
26. Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Shari-pov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. 2014. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry (Mosc.)* **79** (2), 146–157.
27. Khodorov B.I. 2014. Fundamental mechanisms of glutamate neurotoxicity: Role of mitochondrial pores. In: *Horizons in Neuroscience Research*. **14**, chapter 4, p. 113–133.

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2022 г. М. В. Елшанская^а, А. И. Соболевский^{а, *}

^а*Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University,
New York, NY 10032, USA*

**e-mail: as4005@cumc.columbia.edu*

Поступила в редакцию 14.01.2022 г.

После доработки 24.01.2022 г.

Принята к публикации 25.01.2022 г.

Ионотропные глутаматные рецепторы (iGluRs) опосредуют основную часть быстрой возбуждающей нейротрансмиссии. Они участвуют в развитии и функционировании нервной системы, причем нарушение их функции связано с неврологическими и психиатрическими заболеваниями. В этом обзоре представлены последние достижения структурных исследований iGluRs. Данные, полученные с помощью методов кристаллографии и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), помогают определить архитектурные принципы сборки и компоновки глутаматных рецепторов, а также механизмы их активации, десенситизации и регуляции с помощью вспомогательных субъединиц, положительных и отрицательных аллостерических модуляторов и блокаторов ионных каналов. Исследования молекулярной структуры глутаматных рецепторов способствуют лучшему пониманию их физиологической и патофизиологической роли в работе ЦНС, а также предоставляют ценную информацию для создания новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: iGluR, AMPA-рецептор, NMDA-рецептор, каинатный рецептор, дельта-рецептор, GLR, вспомогательная субъединица, воротный механизм, десенситизация, канальный блокатор, ингибитор, криоэлектронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ, кристаллография

DOI: 10.31857/S0233475522040053

ВВЕДЕНИЕ

Ионотропные глутаматные рецепторы (iGluRs) являются лиганд-управляемыми ионными каналами, опосредующими самую значительную часть возбуждающей нейротрансмиссии в ЦНС [1]. Поскольку глутаматные рецепторы вовлечены практически во все процессы получения и обработки информации в мозге, нарушения их функции связаны с хроническими нейродегенеративными заболеваниями и психиатрическими расстройствами [1–4]. Существует четыре подвида iGluRs, включая AMPA-, каинатные, NMDA- и дельта-рецепторы, которые различаются своими аминокислотными последовательностями, а также активацией специфическими молекулами агонистов. Представителей семейства глутаматных рецепторов можно встретить в различных живых организмах от бактерий до насекомых и от растений до человека [5]. Во многих случаях функциональные роли представителей такого многообразия глутаматных рецепторов неизвестны, однако они не ограничиваются нейротрансфером, поскольку нервная система отсутствует как у бактерий, так и у растений. Представители глутаматных рецепто-

ров могут принимать участие в других видах передачи информации, реализованными, например, кальциевыми сигналами в растениях, передающихся с помощью специальных растительных глутаматных рецепторов (GLRs), которые, в свою очередь, вовлечены в процессы реагирования растений на порезы, регуляции раскрытия устьица, прорастания семени, развития корневой системы и морфогенеза [6–12]. Свойства ионных каналов значительно различаются среди представителей глутаматных рецепторов, поскольку в это семейство входят как рецепторы, которые образуют комплексы со вспомогательными субъединицами, структурирующими или регуляторными белками, влияющими на амплитуду и кинетику ионных токов, так и рецепторы, которые активируются с разной степенью специфичности аминокислотами и небольшими молекулами, сходными по размеру с аминокислотами [13–17]. В данной работе мы анализируем основные подвиды глутаматных рецепторов и обсуждаем общие принципы влияния структурной организации рецепторов на их функцию.

ФУНКЦИЯ iGluR

Функция глутаматных рецепторов описана в многочисленных публикациях, ссылки на которые даны в трех подробных обзорах, обобщающих результаты исследований iGluRs трех последних десятилетий [1, 18, 19]. Существуют три основных подвида глутаматных рецепторов: AMPA-, каинатные и NMDA-рецепторы, которые активируются агонистом глутаматом, что приводит к открыванию катион-селективного ионного канала (рис. 1). В ответ на короткую (~1 мс) аппликацию глутамата AMPA-подвид глутаматных рецепторов проводит ток, который быстро (<1 мс) возрастает до максимальной величины (I_{peak}) в результате активации, а затем также быстро (1–2 мс) снижается до нуля в ходе деактивации (рис. 1а). В ответ на длительное применение глутамата ток через глутаматные рецепторы начинает снижаться, несмотря на постоянное присутствие агониста (рис. 1б). Это относительно медленное (> 5 мс) снижение тока отражает процесс десенситизации, который необходим нейронам для защиты от токсического действия избыточного количества ионов кальция, входящего в клетку через кальций-проницаемые каналы глутаматных рецепторов. В процессе десенситизации ток достигает стационарной величины (I_{SS}). Сравнительно небольшая величина I_{SS} , характерная для AMPA- и каинатных рецепторов, является признаком выраженной десенситизации и означает, что в условиях равновесия большинство (95–99%) рецепторов оказываются в непроницаемом десенситизированном состоянии. Скорость и степень десенситизации различаются в зависимости от подвида iGluRs, будучи самой медленной и наименее выраженной у NMDA-рецепторов. Десенситизация может быть заблокирована фармакологически. Например, положительные аллостерические модуляторы, такие как циклотиазид (CTZ), блокируют десенситизацию AMPA-рецепторов и препятствуют снижению тока во время продолжительной аппликации глутамата (рис. 1в). С другой стороны, можно добиться уменьшения токов через каналы глутаматных рецепторов в результате действия 1) конкурентных антагонистов, которые связываются с теми же участками на рецепторе, что и агонисты, 2) блокаторов, закупоривающих пору ионного канала, или 3) отрицательных аллостерических модуляторов (или неконкурентных ингибиторов), связывающихся с другими участками на поверхности iGluR (рис. 1г).

СТРУКТУРА iGluR

Несмотря на то, что разные представители iGluRs различаются по своим кинетическим и

фармакологическим свойствам, структурный дизайн у них общий (рис. 2). Каждая субъединица состоит из нескольких частей (доменов) и включает в себя 1) аминоконцевой домен (АКД), вовлеченный в процессы транспортировки, регуляции и сборки рецепторов; 2) лиганд-связывающий домен (ЛСД), состоящий из двух полипептидных участков S1 и S2, которые формируют двустороннюю структуру с верхней D1- и нижней D2-долями, и включающий связывающие участки для агонистов, конкурентных антагонистов и положительных аллостерических модуляторов (рис. 2а); 3) трансмембранный домен (ТМД), состоящий из элементов M1–M4 и образующий ионопроводящий канал, а также 4) внутриклеточный карбокси-концевой домен (СТД), вовлеченный в процессы доставки и распределения рецепторов в постсинаптической мембране, структура которого пока еще не была определена (рис. 2а, 2б). Четыре субъединицы (А–D) вместе формируют один тетрамерный рецептор, где две диагональные субъединицы находятся в прямых (А и С), а две другие (В и D) – в изогнутых конформациях (рис. 2в). В гомотетрамерных iGluRs эти две отличные друг от друга конформации химически идентичных субъединиц возникают вследствие различного расположения доменов относительно друг друга. Несмотря на то, что каждый из доменов принимает одинаковую конформацию в прямых и изогнутых субъединицах, домены связаны друг с другом посредством гибких линкеров, принимающих различные конформации.

В структуре iGluR домены организованы слоями (рис. 2г). AMPA-рецептор напоминает по форме букву Y, и ее самый верхний внеклеточный слой состоит из доменов АКД. Домены ТМД формируют ионный канал внутри мембраны. Слой ЛСД, зажатый между слоями АКД и ТМД, соединен с АКД-слоем четырьмя линкерами (АКД–ЛСД), а со слоем ТМД тремя группами ЛСД–ТМД линкеров, включая S1–M1, M3–S2 и S2–M4. Поскольку относительные расположения доменов в двух парах конформационно идентичных субъединиц отличаются друг от друга (рис. 2в), рецептор в целом обладает вращательной симметрией второго порядка (рис. 2г, 2д). Слои АКД и ЛСД представляют собой димеры димеров, причем все димеры обладают локальной вращательной симметрией второго порядка с осями, ориентированными в пространстве отличным образом от центральной оси симметрии рецептора. Такое относительное расположение доменов приводит к трансформации симметрии между слоями АКД и ЛСД и, более того, между ЛСД и ТМД, последний из которых обладает приближенной вращательной симметрией четвертого порядка. Кроме этого, такое расположение доме-

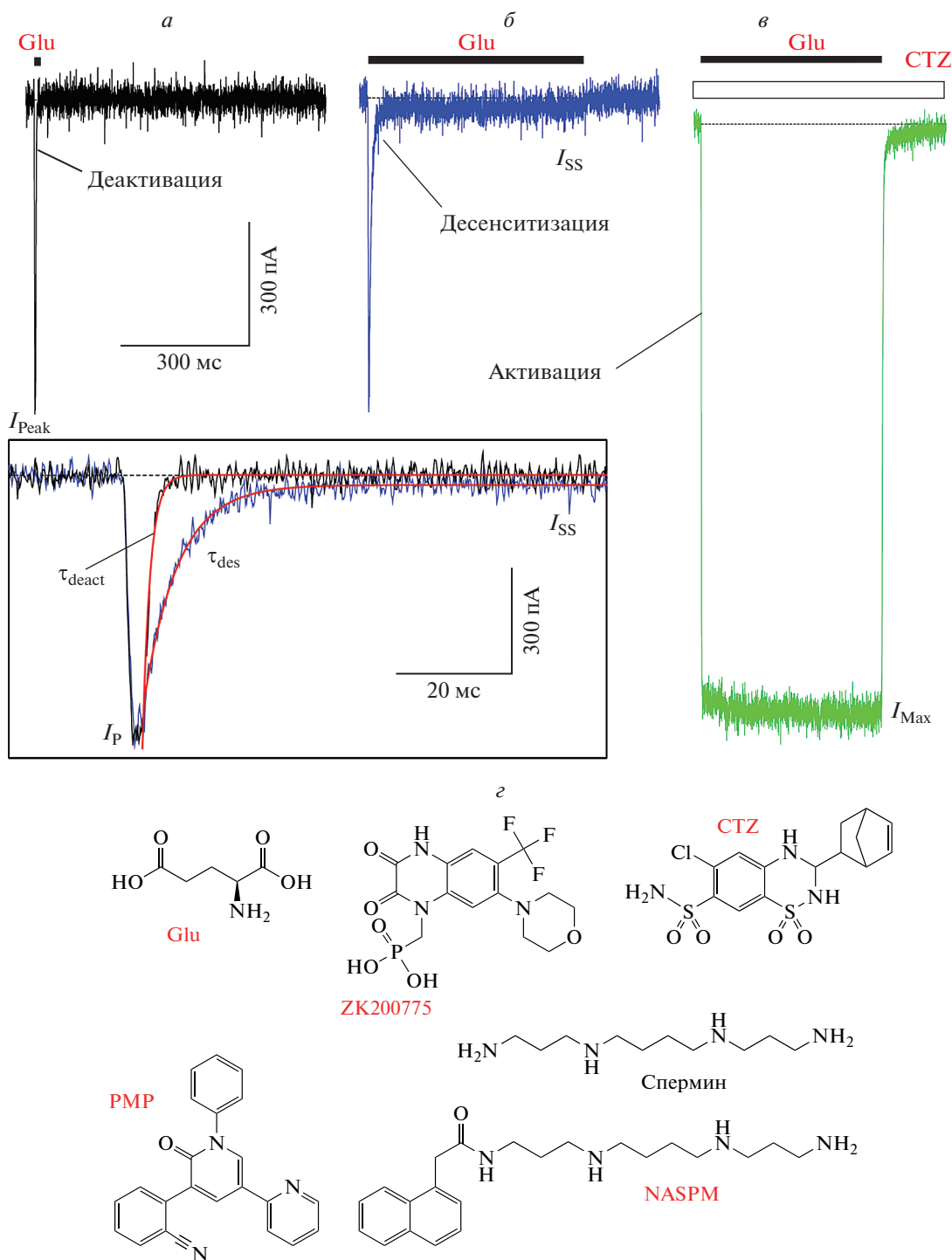


Рис. 1. Функция и лиганды глутаматного рецептора. *a–в* – Примеры записей тока при мембранном потенциале -60 мВ от клетки НЕК 293, экспрессирующей GluA2-рецепторы AMPA-подвида, в ответ на 2 мс (черная кривая, *a*) или 1 с (синяя кривая, *б*) аппликацию 3 мМ глутамата (Glu) или его аппликацию при непрерывном присутствии 30 мкМ циклотиазида (CTZ, зеленая кривая, *в*). На вставке показаны нормализованные токи в ответ на 2 мс и 1 с применения Glu, нисходящая фаза которых аппроксимирована экспоненциальными функциями (красные кривые) с постоянными времени деактивации $\tau_{deact} = 1.2$ мс и десенситизации $\tau_{des} = 5.7$ мс. Записи были сделаны методом пэтч-кламп [132]. *z* – Химические структуры агониста глутамата (Glu), конкурентного антагониста ZK200775, положительного аллостерического модулятора циклотиазида (CTZ), неконкурентного ингибитора перампана (PMP) и блокаторов ионных каналов полиамина, спермина и синтетического аналога токсина паука Joro (1-нафтилацетилспермин, NASPM).

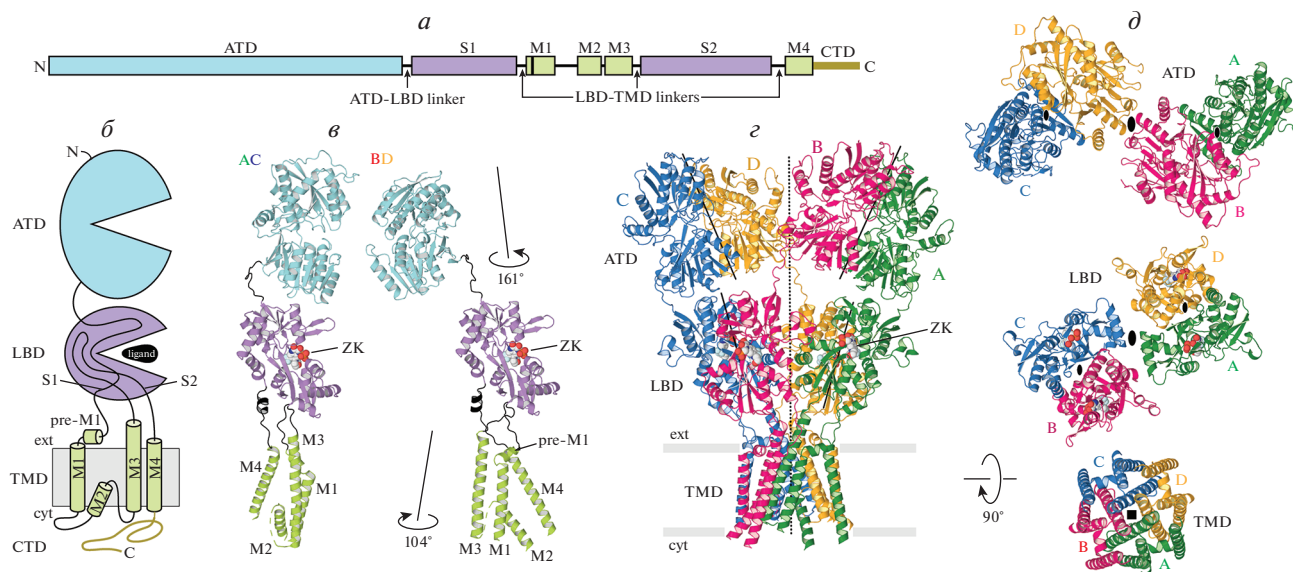


Рис. 2. Структура и симметрия глутаматного рецептора. *а* – Линейная структура субъединицы iGluR с доменами, обозначенными различным цветом и подписанными стандартными аббревиатурами. *б* – Мембранная топология субъединицы iGluR. *в* – Структуры субъединиц А и С (слева), а также В и D (справа) AMPA-рецептора с доменами, окрашенными так же, как в *а* и *б*: аминоконцевой домен (АКД, ATD) – голубым, лиганд-связывающий домен (ЛСД, LBD) – фиолетовым, трансмембранный домен (ТМД, TMD) – зеленым, линкеры, связывающие АКД с ЛСД, а также ЛСД с ТМД, – черным. Молекулы ZK (ZK200775) показаны в виде объемных моделей. Различные конформации химически идентичных субъединиц А (С) и В (D) подчеркнуты одинаковой ориентацией ЛСД-доменов и отличающимися ориентациями доменов АКД и ТМД, для совмещения которых требуются повороты на 161° и 104° соответственно. *г* – Структура тетрамера AMPA-рецептора (PDB ID: 3KG2) с четырьмя субъединицами, окрашенными в разные цвета. Центральная и локальные оси симметрии второго порядка обозначены пунктирной и сплошными черными линиями соответственно. *д* – Слои структуры (вид сверху) параллельно центральной оси симметрии. Центральная и локальные оси симметрии второго порядка обозначены большими и маленькими овалами, в то время как ось симметрии ТМД четвертого порядка обозначена черным квадратом.

нов обуславливает перехлест аминокислотных цепей между слоями АКД и ЛСД, который приводит к различной компоновке индивидуальных доменов в димеры (рис. 2*д*). Действительно, в то время как димеры АКД образованы субъединицами А и В, а также С и D, димеры ЛСД составлены из субъединиц А и D, а также В и С. Перехлест аминокислотных цепей также приводит к разному расположению доменов в слоях АКД и ЛСД относительно центральной оси симметрии рецептора, согласно которому АКД домены в субъединицах В и D располагаются близко к оси, а в субъединицах А и С находятся на периферии, в то время как ЛСД домены в субъединицах А и С находятся близко к оси, а в субъединицах В и D они располагаются на периферии (рис. 2*д*).

Несмотря на то, что структура AMPA-рецепторов (в особенности в слое АКД) похожа на структуры других глутаматных рецепторов, между ними существуют различия, которые определяют взаимодействия доменов и субъединиц, которые, в свою очередь, наделяют представителей iGluR уникальными функциональными свойствами (рис. 3). Например, ЛСД-слой в десенситизированных каинатных рецепторах обладает вращательной

симметрией, которая близка к симметрии четвертого порядка, что свидетельствует о диссоциации ЛСД-димеров на мономеры (рис. 3*б*) [20]. Интересно отметить, что существуют структуры, соответствующие закрытому состоянию каинатных рецепторов, в которых доменная организация очень похожа на структуры AMPA-рецепторов и в которых ЛСД-слой представляет собой димер димеров [20, 21]. Предстоит выяснить, существует ли в физиологических условиях отмечаемая в структуре каинатных рецепторов разница в симметрии и насколько она может быть важна для процессов активации и десенситизации рецептора. NMDA-рецепторы принимают особо компактную и округлую форму, что является результатом более плотного взаимодействия между слоями АКД и ЛСД (рис. 3*в*) [22, 23]. Именно плотная упаковка доменов делает возможной аллостерическую регуляцию NMDA-рецепторов молекулами, которые связываются с АКД [24–27]. В то же время в большинстве других глутаматных рецепторов слой АКД относительно слабо крепится к слою ЛСД и в основном участвует в процессах сборки рецептора, а не в регуляции его функции. Исключением являются GluD2 дельта-

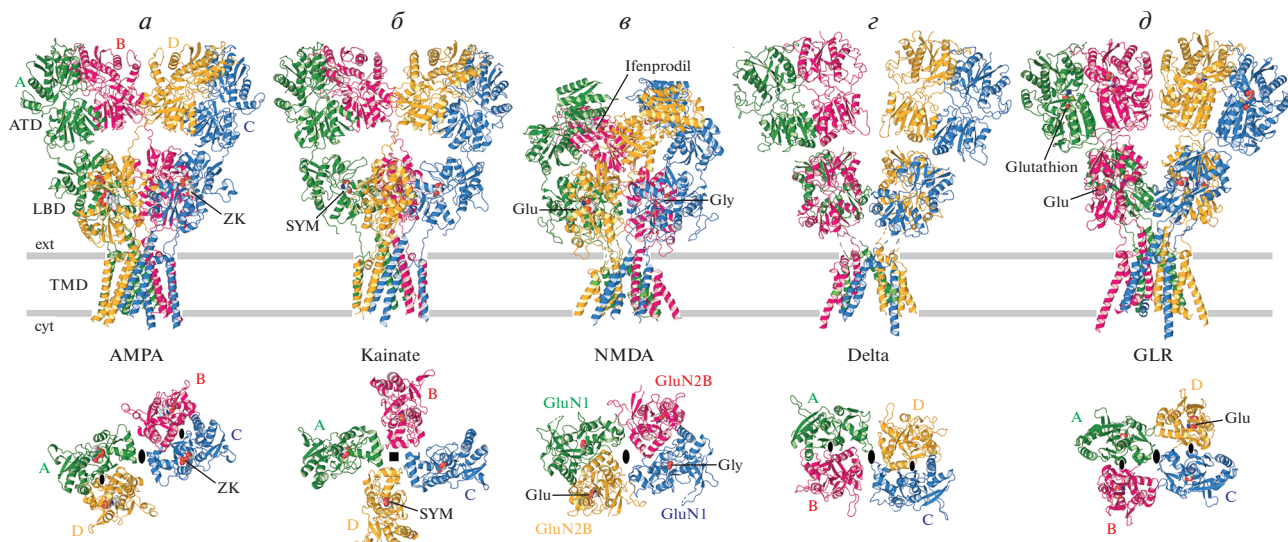


Рис. 3. Структуры представителей различных подвидов глутаматных рецепторов. В верхнем ряду изображены структуры AMPA- (*a*, PDB ID: 3KQ2), каинатного (*б*, PDB ID: 5KUJ), NMDA- (*в*, PDB ID: 4PE5), дельта (*г*, PDB ID: 6KSS) и GLR (*д*, PDB ID: 7LZH) рецепторов (вид сбоку параллельно мембране). Нижний ряд показывает ЛСД-слой в тех же структурах (вид сверху параллельно центральной оси симметрии рецептора). Центральная и локальные оси симметрии второго порядка обозначены большими и маленькими овалами, в то время как ось симметрии четвертого порядка в каинатном рецепторе обозначена черным квадратом. Молекулы ZK (ZK200775), SYM (SYM2081), глутамата (Glu), глицина (Gly), ифенпродила и глутатиона показаны в виде объемных моделей. Важно отметить перехлест субъединиц, участвующих в формировании АКД- и ЛСД-димеров AMPA- и NMDA-рецепторов, отсутствие такого перехлеста в дельта-рецепторах и GLR, а также полное отсутствие ЛСД-димеров в каинатных рецепторах.

рецепторы, в которых перекрестное связывание АКД-доменов или связывание их с внеклеточным структурирующим белком церебелином-1 и пресинаптическим трансмембранным белком нейрексином-1 β переводит этот “молчаливый” рецептор в рецептор, активируемый глицином или *D*-серином [13].

Перехлест аминокислотных цепей между слоями АКД и ЛСД, существующий в AMPA-, каинатных и NMDA-рецепторах, не наблюдается в известных структурах дельта-рецепторов (рис. 3*г*) [28, 29] и GLR (рис. 3*д*) [16]. Несмотря на то, что АКД и ЛСД-димеры компонуются из одних и тех же субъединиц А и В или С и D, ближние и периферийные пары субъединиц остаются теми же по отношению к центральной оси симметрии рецепторов, как и в основных подтипах глутаматных рецепторов. Действительно, АКД-домены в субъединицах А и С остаются периферийными, а в субъединицах В и D находятся близко к центральной оси симметрии, в то время как ЛСД-домены в субъединицах В и D становятся периферийным, а в субъединицах А и С располагаются ближе к оси (рис. 3*г*, 3*д*). Такое расположение субъединиц в дельта-рецепторах и GLRs является следствием поворота плоскости димера АКД на $\sim 90^\circ$ относительно плоскости димера ЛСД, что, в свою очередь, приводит к обратному порядку следования субъединиц вокруг центральной оси симметрии

второго порядка. Действительно, если смотреть с внеклеточной стороны мембраны, субъединицы А, В, С и D отсчитываются по часовой стрелке в каждом доменном слое основных глутаматных рецепторов, в то время как в дельта-рецепторах и в GLRs они отсчитываются точно так же в слое АКД, но против часовой стрелки в слоях ЛСД и ТМД (рис. 3*г*, 3*д*).

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ

Со времени обнаружения первой вспомогательной субъединицы $\gamma 2$ (старгазин) [30] стало ясно, что большинство глутаматных рецепторов вносят вклад в синаптическую передачу не как одиночные рецепторы, а скорее как центральные компоненты синаптических комплексов. В качестве других компонентов синаптических комплексов AMPA-рецепторов было обнаружено большое разнообразие вспомогательных субъединиц, включая трансмембранные регуляторные субъединицы AMPA-рецепторов (TARPs) [30–33]; корнишоны (cornichons, CNIHs) [34]; модулирующие AMPA-рецептор цистеиновые узлы (CKAMPs) [35]; специфический для стволовых клеток гомолог клаудина белок GSG1L [36, 37]; насыщенный пролинами трансмембранный белок PRRT1 (SynDIG4), кодируемый геном *SynDIG1* и индуцируемый синаптической дифференци-

ровкой [38]; трансмембранный нейрональный белок с насыщенными лейциновыми повторами (LRRT4); представители семейства MAGUK; большие дисковые гомологи (DLG1,3,4); белки поркупин (PORCN) и C9orf4; ноэлины 1–3; брорины и нейритин [36, 39–41]. Для многих из этих белков известно, что они регулируют воротные функции, доставку и распределение AMPA-рецепторов в синапсах [39, 41, 42], в то время как для некоторых из них функциональная роль и структурные механизмы взаимодействия с AMPA-рецепторами остаются неизвестными. Для каинатных рецепторов единственным типом до сих пор обнаруженных вспомогательных белков являются подобные нейрофилину и толлоиду белки Neto [43, 44]. Для NMDA- и дельта-рецепторов вспомогательных белков пока не обнаружено, однако в работах по изучению GLRs высказано предположение, что эти рецепторы образуют комплексы с растительными мембранными белками CNiNs [45].

К настоящему времени с помощью структурного анализа было охарактеризовано несколько вспомогательных субъединиц AMPA-рецепторов (рис. 4). Они включают TARPs, GSG1L и CNiN2/3. В крио-ЭМ реконструкциях AMPA-рецепторов из мышинового гиппокампа обнаружили плотность кулоновского потенциала, возможно, представляющую трансмембранную альфа-спираль SynDIG4 [46], однако не было построено никакой структурной модели из-за слишком плохого качества полученных снимков.

Структуры TARPs, которые изначально были названы γ -субъединицами в силу схожести по аминокислотному составу с субъединицей кальциевого канала $\gamma 1$ [47], разделяют на два типа на основании функциональных свойств и аминокислотных последовательностей. Эти структуры включают четыре γ -субъединицы, которые относятся к типу I ($\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ и $\gamma 8$), и две γ -субъединицы, которые относятся к типу II ($\gamma 5$ и $\gamma 7$) [30–33, 39, 48]. Оба типа γ -субъединиц увеличивают проводимость и ослабляют полиаминный блок проницаемых для кальция AMPA-рецепторов [49, 50]. Как правило, TARP-белки первого типа способствуют активации, увеличивая поверхностную экспрессию AMPA-рецепторов, замедляя кинетику десенситизации и деактивации, а также повышая вероятность открывания канала и амплитуду стационарного тока [30–33, 48, 50–54]. В отличие от белков первого типа, TARP-белки второго типа обычно приводят к уменьшению активности AMPA-рецепторов. Например, субъединица $\gamma 5$ либо уменьшает, либо не изменяет поверхностную экспрессию AMPA-рецепторов, не вызывает замедления скоростей десенситизации и деактивации, однако понижает сродство к глю-

тамату, вероятность открывания канала и амплитуду стационарного тока [33, 48, 50].

Молекулярные структуры были определены для двух TARP-белков первого типа (старгазин $\gamma 2$ и $\gamma 8$), а также для одного TARP-белка второго типа ($\gamma 5$) [55–60]. Каждый из этих белков имеет структурную укладку, похожую на таковую белка клаудина, которая состоит из связки четырех трансмембранных альфа-спиралей (TM1–TM4) и внеклеточного домена, собранного из полипептидов, соединяющих TM1–TM2 и TM3–TM4, а также включает пятицепочечный β -лист, расположенный над связкой из этих четырех альфа-спиралей (рис. 4а, 4б). В этой структуре также имеется внеклеточная альфа-спираль (extracellular helix, ECH), которая предшествует TM2 и отличает TARP-белки первого и второго типа. В TARPs первого типа ECH располагается практически параллельно мембране, в то время как в TARP второго типа ($\gamma 5$) она располагается перпендикулярно мембране и является естественным продолжением TM2. Пространственная ориентация ECH определяет форму внеклеточного домена и тип его взаимодействия с AMPA-рецептором. Например, петля $\beta 4$ –TM2, которая предшествует горизонтально ориентированной в $\gamma 2$ и $\gamma 8$ спирали ECH, заметно выпячивается в сторону лиганд-связывающих доменов ЛСД. Эта петля содержит несколько консервативных отрицательно заряженных аминокислотных остатков, которые предположительно взаимодействуют с положительно заряженными остатками в ЛСД-мотиве “KGK”, и таким образом модулирует функцию AMPA-рецептора [61, 62]. Подобные отрицательно заряженные аминокислотные остатки отсутствуют в TARPs второго типа, где удлиненный внеклеточный домен $\gamma 5$ с вертикально ориентированной спиралью ECH взаимодействует только с одним из двух ближайших доменов ЛСД, в то время как внеклеточный домен в TARPs первого типа взаимодействует с обоими доменами.

Подобно TARPs, белок GSG1L отличается структурной укладкой, типичной для белка клаудина (рис. 4в). Этот белок участвует в долговременной синаптической потенциации, формировании синапсов и синаптической пластичности, а также в процессах, связанных с развитием болезни Хантингтона [42, 63, 64]. Кроме того, GSG1L вызывает умеренное замедление кинетики деактивации и десенситизации AMPA-рецепторов, подобное наблюдаемому для TARPs первого типа [36, 37]. В то же время GSG1L значительно замедляет кинетику выхода из десенситизации и способствует переходу в десенситизированное состояние [36, 37], что более характерно для TARPs второго типа. Действительно, структура GSG1L (рис. 4в) гораздо больше похожа на структуру

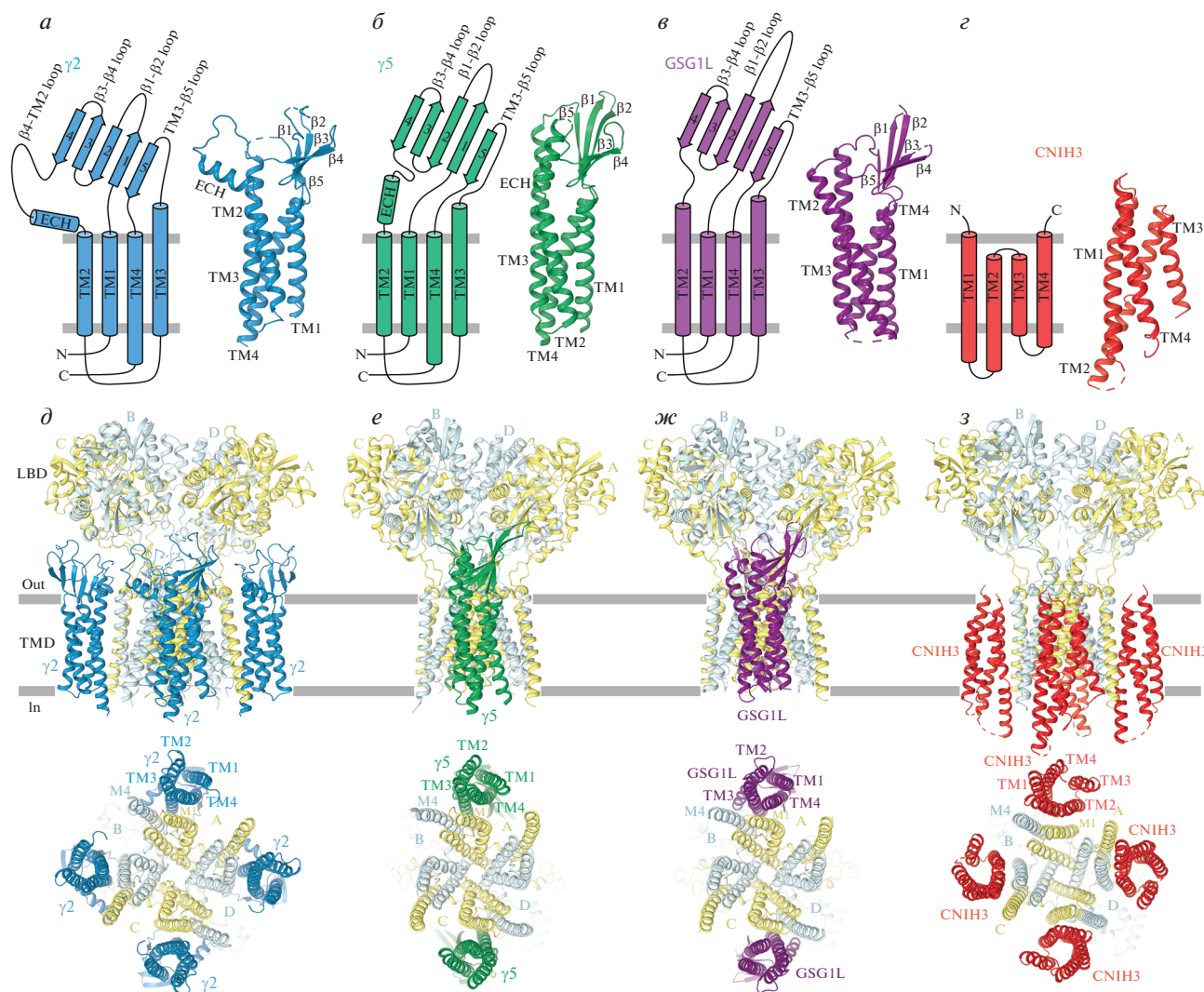


Рис. 4. Вспомогательные субъединицы AMPA-рецепторов. *a–г* – Мембранная топология с элементами вторичной структуры, изображенными цилиндрами (α -спирали) и стрелками (β -полоски), а также молекулярные структуры вспомогательных субъединиц TARP первого типа $\gamma 2$ (*a*, голубая структура, PDB ID: 5WEO), TARP второго типа $\gamma 5$ (*b*, зеленая структура, PDB ID: 7RZ8), GSG1L (*в*, фиолетовая структура, PDB ID: 7RYZ) и CNIH3 (*г*, красная структура, PDB ID: 6PEQ). *д–з* – Структуры AMPA-рецепторов в комплексе с вспомогательными субъединицами, в которых субъединицы AMPA-рецепторов показаны желтым (A и C) и светло-голубым (B и D), а вспомогательные субъединицы теми же цветами, что в *a–г*. АКД-домены не показаны. Обращает на себя внимание максимальная стехиометрия четырех вспомогательных субъединиц, приходящихся на один AMPA-тетрамер для $\gamma 2$ и CNIH3, а также стехиометрия двух вспомогательных субъединиц, приходящихся на один AMPA-тетрамер для $\gamma 5$ и GSG1L.

TARP второго типа $\gamma 5$ (рис. 4*б*), нежели на структуре TARP первого типа $\gamma 2$ и $\gamma 8$ (рис. 4*а*). Так, внеклеточная спираль ECH, которая отсутствует в GSG1L, заменена в этой субъединице более длинной трансмембранной спиралью TM2, которая выходит во внеклеточное пространство и придает внеклеточному домену GSG1L форму, похожую на $\gamma 5$. Длинная петля $\beta 1$ – $\beta 2$ из GSG1L достигает одного из двух соседних слоев ЛСД и модулирует функцию AMPA-рецептора через образовавшийся контакт. Интересно, что субъединица $\gamma 5$ также использует петлю $\beta 1$ – $\beta 2$ для замед-

ления скорости выхода AMPA-рецептора из десенситизации, но гораздо больший размер этой петли в GSG1L объясняет ее значительно более выраженное действие на скорость выхода из десенситизации.

Субъединицы CNIH2 и CNIH3, которые контролируют сборку AMPA-рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме, замедляют кинетику деактивации и десенситизации рецептора, ослабляют полиаминный блок и увеличивают проводимость одиночного канала [34, 39, 65–68], включают в себя связку четырех альфа-спиралей подобно

TARPs и GSG1L (рис. 4з). Более того, все три вида вспомогательных субъединиц связываются с теми же самыми участками на поверхности ТМД AMPA-рецептора, образованными сегментом M1 из одной субъединицы и сегментом M4 из соседней субъединицы (рис. 4д–4з). В противоположность TARPs и GSG1L, у которых аминокислотные концы находятся во внутриклеточном пространстве, оба полипептидных конца в связывающих белках CNiNs смотрят во внеклеточное пространство. Существенно, что у CNiNs полностью отсутствуют внеклеточные петли, но зато присутствуют длинные внутриклеточные петли, которые пока не удалось четко выявить в соответствующих структурах, но которые, по-видимому, играют важную роль в транспортировке AMPA-рецепторов.

Несмотря на то, что все вспомогательные субъединицы, содержащие связку четырех альфа-спиралей, связываются с теми же (указанными выше) участками на поверхности AMPA-рецептора, для них характерна различная стехиометрия (рис. 4д–4з). В зависимости от белковой конструкции и типа реагентов, заменяющих клеточную мембрану во время очистки белка, структуры гомотетрамерных рецепторов, собранных из GluA2-субъединиц в комплексе с вспомогательными субъединицами $\gamma 2$, выявили различную стехиометрию, включая четыре, две, одну, а также ни одной $\gamma 2$ -субъединицы на тетрамер AMPA-рецептора [55–59]. Максимальная стехиометрия с четырьмя вспомогательными субъединицами на тетрамер AMPA-рецептора наблюдалась также у CNiN3 [69]. Для остальных вспомогательных субъединиц, включающих в себя связку четырех альфа-спиралей, $\gamma 5$, $\gamma 8$ и GSG1L, максимальная стехиометрия предполагает связывание только двух вспомогательных субъединиц на один тетрамер AMPA-рецептора [46, 60, 70–72], что вероятнее всего определяется размером внеклеточного домена вспомогательной субъединицы [72]. Действительно, субъединицы $\gamma 5$, $\gamma 8$ и GSG1L обладают большими внеклеточными доменами и длинными петлями $\beta 1$ – $\beta 2$ по сравнению с $\gamma 2$, в то время как в CNiNs внеклеточный домен отсутствует.

Поскольку вспомогательные субъединицы, включающие в себя связку четырех альфа-спиралей, часто изменяют функцию AMPA-рецепторов, они активно используются для того, чтобы зафиксировать рецептор в определенных функциональных конформациях. Кроме того, ТМД, у которого образующий проводящий пору домен M2 в изолированных рецепторных структурах дезорганизован, приобретает надлежащую конфигурацию в различных комплексах рецептора со вспомогательными субъединицами, что позволяет детально изучать ионную проводимость,

канальный блок и структурную динамику, связанную с воротными функциями канала. ТМД был относительно хорошо выявлен и в структурах гомотетрамерного каинатного рецептора GluK2 в комплексе с вспомогательной субъединицей Neto2 [73]. Весьма вероятно, что субъединица Neto2, у которой имеется только одна трансмембранная спираль, регулирует воротную функцию каинатного рецептора посредством связывания нижних долей доменов АКД и ЛСД, используя свои внеклеточные структурные мотивы CUB.

ВОРОТНОЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ

Изучение структуры воротного механизма активации (активационного гейтинга) началось с выявления структур изолированного ЛСД-домена AMPA-рецепторов [74]. Более глубокое понимание механизма гейтинга пришло с получением первых структур полноразмерного AMPA-рецептора в комплексе со вспомогательными TARP-субъединицами первого типа $\gamma 2$ [56, 59]. Установлено, что активация iGluR вызывается связыванием молекулы агониста с участком внутри двустворчатой структуры индивидуального ЛСД. В ответ на связывание агониста двустворчатая структура ЛСД закрывается, создавая движущую силу для всего процесса активации рецептора [56, 59, 74]. Для перехода от закрывания ЛСД-доменов к открыванию канала, индивидуальные ЛСД организованы в димеры, каждый из которых принимает конфигурацию “спина-к-спине”. Во время активации закрывание димеров (“створок раковины”) индивидуальных ЛСД, удерживаемых посредством интерфейса D1–D1 между верхними долями, приводит к разведению нижних долей D2 (рис. 5а). В свою очередь, разведение нижних долей D2, связанных с ТМД посредством линкеров S1–M1, M3–S2 и S2–M4, приводит к открыванию ионного канала. Учитывая димер-димерную организацию слоя ЛСД, при рассмотрении структуры рецептора со стороны ионного канала разведение D2-долей выглядит как расширение ЛСД-тетрамера (рис. 5б) [56, 59]. Структурные изменения, которые предопределены геометрией димер-димерной организации ЛСД-слоя и связью ЛСД и ТМД посредством двенадцати линкеров, выявляют асимметричный вклад двух пар диагональных субъединиц в активацию iGluR (рис. 5в, 5г). Действительно, закрывание двустворчатых ЛСД субъединиц А и С прилагает вертикально направленную силу, которая тянет линкеры M3–S2 вверх и приводит к расплетению одного витка альфа-спиралей M3 (рис. 5в). Напротив, закрывание двустворчатых ЛСД-субъединиц В и D прилагает горизонтально направленную силу, которая разводит линкеры M3–S2

в стороны, изгибает альфа-спирали МЗ по гейтинговому шарниру, находящемуся в районе аланина А618, и отодвигает в стороны те части МЗ, которые формируют гидрофобные ворота в закрытом состоянии канала (рис. 5г). В результате скоординированных конформационных изменений, происходящих во время активации, пора ионного канала, которая большую часть времени гидрофобно закупорена для пропускания ионов и воды связкой спиралей МЗ (рис. 5д), открывается для проводимости ионов и воды (рис. 5е) [56, 59, 75]. Таким образом, открывание канала является кульминацией и представляет собой завершающий момент механизма активации глутаматного рецептора (рис. 5ж).

НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

В противоположность конкурентным ингибиторам, которые связываются с тем же участком внутри ЛСД, что и агонисты, и работают как распорки, препятствующие закрыванию его двусторонней структуры [74, 76], неконкурентные ингибиторы связываются с другими участками на поверхности iGluR и взаимодействуют с механизмом активации рецептора аллостерически. Неконкурентные ингибиторы AMPA-рецепторов, которые включают в себя прототипы антагонистов, такие как GYKI 52466 [77, 78], высокоэффективные селективные молекулы, такие как 2,3-бензодиазепины GYKI 53655 [79, 80] и CP 465022 [79, 81, 82], а также новый противоэпилептический препарат перампанел (perampnol, RMP, рис. 1з) [83–85], взаимодействуют с рецептором без лиганда более эффективно, чем с лиганд-активированным рецептором. Действительно, в ответ на совместное применение с глутаматом RMP вызывает постепенное снижение тока, проводимого каналами AMPA-рецепторов, от изначальной максимальной величины, I_{Max} , до некоторого стационарного значения, I_{RMP} (рис. 6а). Если же RMP постоянно находится в растворе без глутамата, то последующее применение глутамата вызывает ток небольшой начальной величины I_{ini} , который постепенно увеличивается и асимптотически достигает того же стационарного уровня I_{RMP} (рис. 6а). Меньшая по сравнению с I_{RMP} величина I_{ini} показывает, что RMP связывается с рецептором в неактивированном состоянии более эффективно, чем в активированном состоянии.

Кристаллические структуры рецепторов, связанных с неконкурентными ингибиторами, проливают свет на зависимость ингибирования от состояния рецептора [86]. Подобно другим неконкурентным ингибиторам, RMP связывается с гидрофобными карманами, находящимися непосредственно за короткими горизонтальными

спиралями пре-М1-сегментов в так называемом внеклеточном “воротнике”, окружающем канал (рис. 6б). В закрытом состоянии эти гидрофобные карманы открыты для связывания с малыми гидрофобными молекулами неконкурентных ингибиторов. При открывании канала МЗ-спирали субъединиц В и D сгибаются по воротному шарниру, находящемуся в районе аланина А618, так что их верхние части попадают в гидрофобные карманы, тем самым препятствуя связыванию неконкурентных ингибиторов. Напротив, если неконкурентные ингибиторы связаны с закрытым каналом, то они препятствуют сгибанию МЗ-спиралей. Соответственно, неконкурентные ингибиторы действуют как клинья, которые удерживают канал в закрытом состоянии и препятствуют его открыванию [86]. Внеклеточный “воротник” канала представляет собой центр, в котором сосредоточены участки связывания для множества положительных и отрицательных аллостерических модуляторов, а также место в iGluRs, где чаще всего возникают мутации, связанные с неврологическими болезнями [87], многие из которых, по-видимому, нарушают равновесие между закрытыми и открытыми состояниями рецептора вследствие механизмов, подобных механизму неконкурентного ингибирования AMPA-рецепторов.

БЛОКАТОРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Блок ионных каналов представляет собой еще один вид взаимодействия глутаматных рецепторов с небольшими молекулами, приводящий к ингибированию функции iGluRs и позволяющий глубже изучить их воротные системы [88]. Блокаторы ионных каналов NMDA-рецепторов включают в себя огромное разнообразие химически отличных друг от друга небольших молекул, которые можно разделить на две большие группы в зависимости от их взаимодействия с воротным механизмом канала: последовательные (“нога-в-двери”, “foot-in-the-door”) и “захватываемые-в-ловушку” (trapping). Блокаторы “нога-в-двери”, такие как 1,2,3,4-тетрагидро-9-аминоакридин, 9-аминоакридин и тетрапентиламмоний, закупоривают ионный канал в открытом состоянии и препятствуют его закрыванию; канал может закрыться снова только после того, как блокатор покинет канальную пору [89–94]. Напротив, захватываемые блокаторы, включающие в себя ионы Mg^{2+} , тетраэтиламмоний, мемантин, кетамин, фенциклидин и МК-801, не взаимодействуют с воротами канала, но могут быть заперты внутри канала при его закрывании [92, 93, 95–102]. Недавно полученные структуры NMDA-рецепторов, связанных с молекулами захватываемых бло-

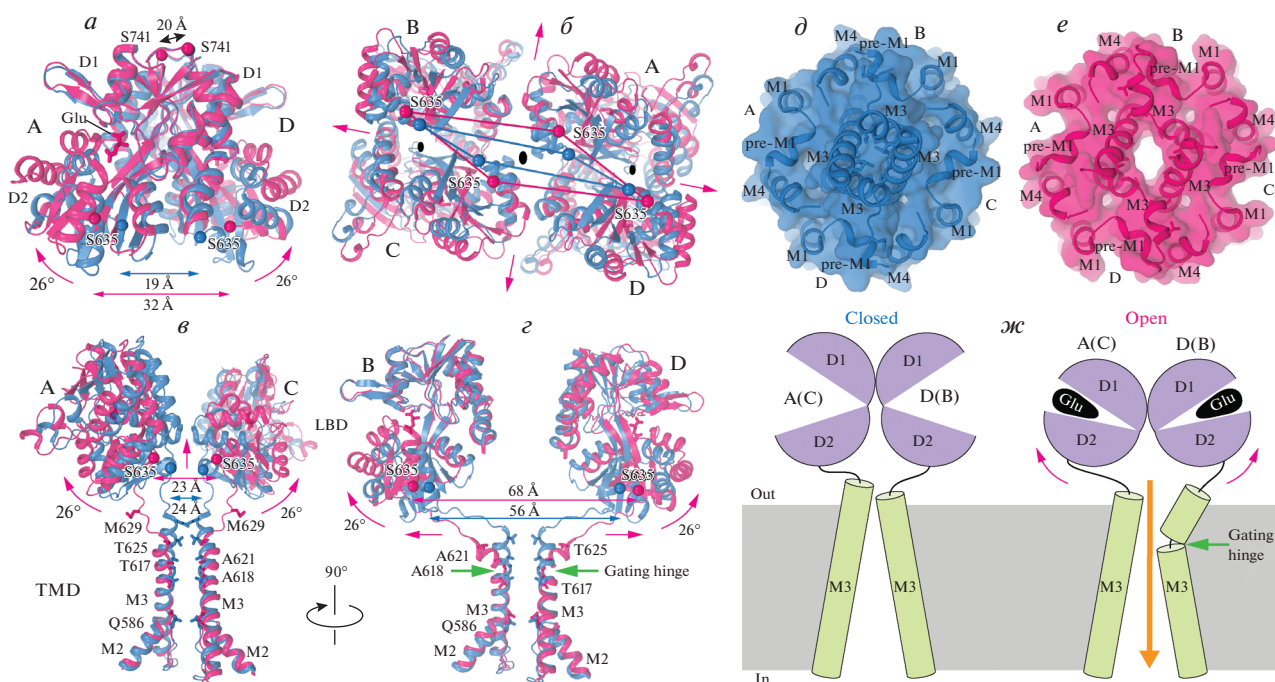


Рис. 5. Механизм активации. *a* – Суперпозиция ЛСД-димеров из структуры GluA2–GSG1L-комплекса, связанного с ZK, в закрытом состоянии (голубой димер, PDB ID: 5WEK) и из структуры GluA2–STZ-комплекса, связанного с Glu и CTZ, в открытом состоянии (розовый димер, PDB ID: 5WEO). Молекулы глутамата (Glu) показаны в виде палочковых моделей. Движение нижних долей D2 во время открывания канала показано розовыми стрелками. С α -атомы остатков S635 и S741 показаны шариками соответствующего цвета с обозначенными между ними расстояниями. *б* – Суперпозиция ЛСД-тетрамеров из тех же структур, если смотреть на них со стороны ТМД, параллельно центральной оси симметрии рецептора (большой черный овал в середине). С α -атомы остатков S635 соединены сплошными линиями соответствующего цвета. Расширение ЛСД-слоя, сопровождающее открывание канала, обозначено розовыми стрелками. *в, г* – Суперпозиция доменов M2 и M3, выстилающих пору, M3–S2 линкером и ЛСД из субъединиц A и C (*в*), а также B и D (*г*), где остатки, образующие ворота (T617, A621, T625 и M629), Q586 и аланин воротного шарнира A618 показаны в виде палочковых моделей. Расстояния между С α -атомами остатков S635 обозначены стрелками. Обращает на себя внимание сопровождающее открывание канала расплетение одного витка спирали M3 в субъединицах A и C, а также изгиб M3 по воротному шарниру (зеленые стрелки) в субъединицах B и D. *д, е* – Вид сверху на ионный канал с полупрозрачной поверхностью в закрытом (*д*) и открытом (*е*) состояниях. Обращает на себя внимание увеличение размера поры, сопровождающее открывание канала. *ж* – Иллюстрация механизма активации iGluR. Показаны только две из четырех субъединиц iGluR. Оранжевая стрелка иллюстрирует ионный ток через открытый канал.

каторов кетамина и МК-801, выявили место связывания этих блокаторов в центральной полости канальной поры [103, 104], как и было изначально предсказано [88, 105]. Остаются еще не расшифрованными структуры открытых NMDA-рецепторов в комплексе с последовательными блокаторами.

Блокаторы ионных каналов AMPA- и каинатных рецепторов обладают более консервативной химической структурой по сравнению с таковыми NMDA-рецепторов и включают в себя полиамины, а также полиамин- и ацилполиамин-содержащие токсины и их натуральные и синтетические аналоги (рис. 1з) [106–113]. Положительный заряд этих блокаторов делает их эффективными только по отношению к кальций-проницаемым каналам, которые не содержат положительно заряженный аргинин в редактируемом Q/R-сайте на вершине M2-петли. Известно, что полиамины

спермин, спермидин и путресцин присутствуют внутри живых клеток и блокируют выходящие токи при положительных мембранных потенциалах, протекающие через поры кальций-проницаемых AMPA- и каинатных рецепторов, приводя тем самым к выпрямлению входящих ионных токов (“inward rectification”, рис. 7а). С другой стороны, токсины и подобные им молекулы, применяемые внеклеточно, ингибируют входящие токи при отрицательных мембранных потенциалах и соответственно вызывают выпрямление ионных токов, направленных в противоположную сторону (“outward rectification”).

Большинство блокаторов ионных каналов не-NMDA-рецепторов действуют в соответствии с механизмом захватываемых в ловушку блокаторов. К настоящему времени получены структуры комплексов AMPA-рецепторов с вспомогательной субъединицей $\gamma 2$ [57], связанные с 1) блокатором

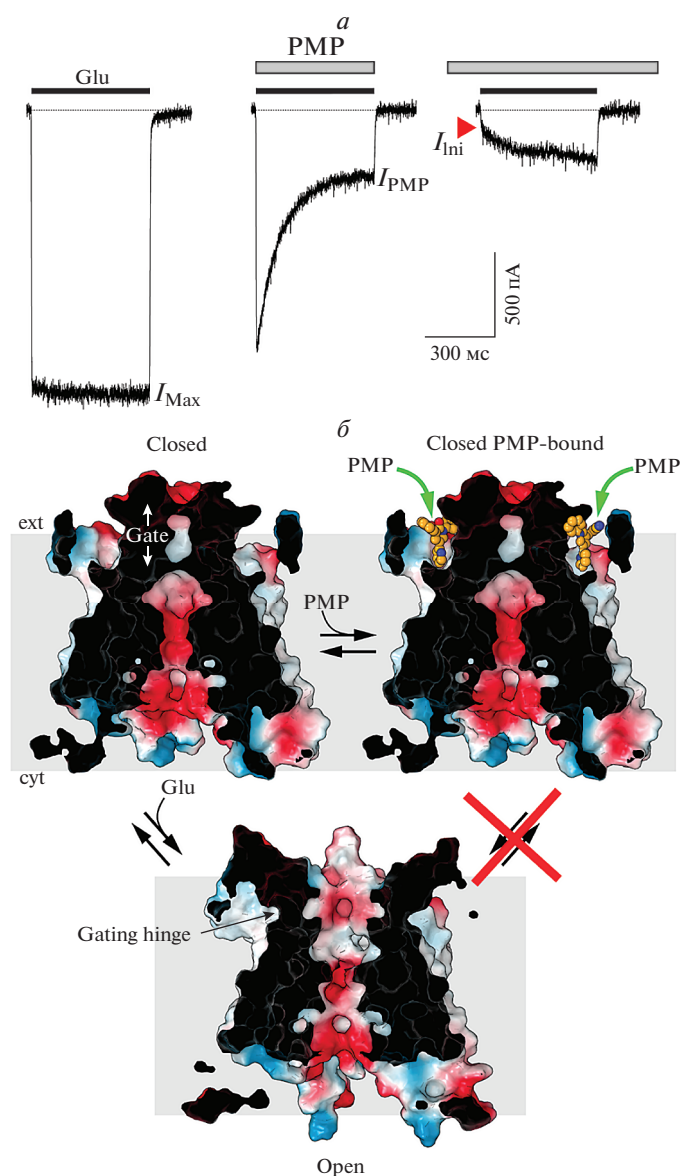


Рис. 6. Неконкурентное ингибирование. *a* – Примеры записей тока при мембранном потенциале -60 мВ от клетки НЕК 293, экспрессирующей GluA2-рецепторы AMPA-подвида, в ответ на 1-с аппликацию 3 мМ глутамата (Glu), его одновременного применения с 2 мкМ перампанела (PMP) и применения глутамата на фоне PMP. Во время этого эксперимента циклотиазид (CTZ, 30 мкМ) присутствовал во всех растворах для того, чтобы заблокировать десенситизацию. Существенно, что начальная амплитуда тока в ответ на применение Glu на фоне PMP (I_{Ini}) гораздо меньше, чем стационарный уровень тока в ответ на совместное применение Glu и PMP, I_{PMP} ; это указывает на то, что PMP связывается с закрытым каналом лучше, чем с открытым каналом. Записи сделаны методом пэтч-кламп [86]. *б* – Центральный срез поверхности канала, покрашенный в соответствии с электростатическим потенциалом, где синий цвет обозначает положительный заряд, красный цвет – отрицательный заряд, а белый цвет – нейтральные участки в закрытом (PDB ID: 7RZ5), связанном с PMP (PDB ID: 5L1F) и открытом (PDB ID: 5WEO) состояниях. Молекулы PMP изображены в виде объемных моделей. Изгибание M3-спиралей в субъединицах В и D, сопровождающее открывание канала, блокирует участки связывания с PMP. Соответственно, PMP не может связаться с каналом в открытом состоянии и наоборот, закрытый канал со связанным с ним PMP не может открыться, потому что PMP препятствует сгибанию M3-спиралей (красный крест).

ИЕМ-1460, который облегчает эпилептические эпизоды, снижает висцеральную боль и ингибирует активность рецепторов, относящуюся к шизофрении [114–119]; 2) синтетическим аналогом токсина из паука Joro (1-нафтилацетилпермин, NASPM), уменьшающего окислительный стресс и

защищающего нейроны от ишемии [120–123]; и 3) нейропротекторным токсином AgTx-636 из паука-кругопряда *Argiope lobata* [124–128]. Все три блокатора имеют консервативную химическую структуру, которая включает длинный и узкий полиаминный хвост и большую гидрофоб-

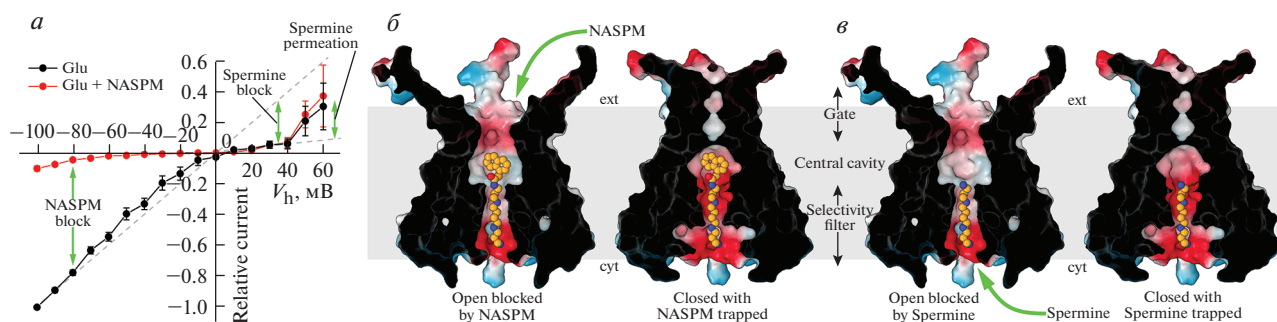


Рис. 7. Блок ионного канала. *a* – Зависимость нормализованных токов, записанных от клеток НЕК 293, экспрессирующих проницаемые для кальция АМРА-рецепторы (GluA_2), от мембранного потенциала. Записи сделаны методом пэтч-кламп в ответ на 1-с аппликацию 3 мМ глутамата (Glu) в отсутствие (черная кривая) или в присутствии (красная кривая) 4.8 мкМ NASPM и при разных мембранных потенциалах [57]. Во время этого эксперимента циклотиазид (CTZ, 30 мкМ) присутствовал во всех растворах для блокирования десенситизации. *б, в* – Центральный срез поверхности канала, окрашенный в соответствии с электростатическим потенциалом, где синий цвет обозначает положительный заряд, красный цвет обозначает отрицательный заряд, а белый цвет обозначает нейтральные участки в открытом (PDB ID: 6DM1) и закрытом (PDB ID: 7RZ5) состояниях, связанных с NASPM (*б*) или спермином (*в*). Молекулы NASPM и спермина изображены в виде объемных моделей.

ную голову. Все они входят в канал как ключ в замок: их положительно заряженный хвост помещается в узкий отрицательно заряженный селективный фильтр канала, образованный расплетенными участками петель M2, в то время как их гидрофобные головы помещаются в гидрофобном окружении центральной полости канальной поры (рис. 7*б*). Несмотря на то, что все структуры, связанные с блокаторами, были получены для открытой конформации канала, многочисленные структуры канала, полученные в закрытом состоянии без блокаторов, позволяют предсказать структуру рецептора с блокатором, захваченным внутри закрытого канала (рис. 7*б*). Представляется очевидным, что закрывание ворот, осуществляемое посредством смыкания M3-спиралей в плотный пучок, не приводит к существенным изменениям центральной полости канала и его селективного фильтра, в результате чего блокатор остается захваченным внутри канала и запертым с одной стороны воротами, которые не позволяют ему выйти во внеклеточное пространство, а с другой стороны – селективным фильтром, который является слишком узким для того, чтобы гидрофобная голова блокатора могла с легкостью протиснуться во внутриклеточное пространство. Тем не менее, медленный выход блокаторов вследствие просачивания в цитоплазму был замечен для двухкатионных производных адамантана, дифенила и фенилциклогексила [129]. В целом, однако, структурный механизм активации и идентифицированные места связывания блокаторов дают весьма правдоподобное объяснение феномена захватываемых в ловушку блокаторов iGluR-каналов.

Несмотря на то, что структуры АМРА-рецепторов в комплексе с полиаминами не были получены экспериментально, расположение полиаминных хвостов канальных блокаторов позволяет предположить характер связывания полиаминов в ионной поре (рис. 7*в*) [57]. Отсутствие у полиаминов большой гидрофобной “головы” объясняет их низкое сродство к каналу по сравнению с токсинами и подобными токсинами молекулами. При высоких положительных потенциалах на мембране электрохимическая движущая сила может преодолеть низкоаффинное связывание полиаминов и позволить им пройти через канальную пору, тем самым увеличивая величину ионного тока (рис. 7*а*).

ДЕСЕНСИТИЗАЦИЯ

Десенситизация выражается спадом тока в присутствии агониста (рис. 1*б*) и представляет собой воротный процесс, во время которого рецептор, связанный с агонистом, переходит в состояние с непроводящим ионным каналом. На уровне индивидуальных ЛСД, конформации двусторчатых структур десенситизированного состояния отличаются от полностью открытых конформаций непроводящего (закрытого) состояния (рис. 8*а*), однако они идентичны полностью закрытым двусторчатым структурам активированного (открытого) состояния (рис. 8*б*). Энергия закрывания двусторчатой структуры, которая во время активации используется для разведения нижних D2-долей организованного “спина-к-спине” димера (рис. 5*а*, 8*а*, 8*б*), во время десенситизации используется для разрыва D1–D1-интерфейса (рис. 8*в*, 8*г*) [59, 70, 72, 130, 131]. Это приводит к изменению относительного расположения индивидуальных двусторчатых структур в ЛСД диме-

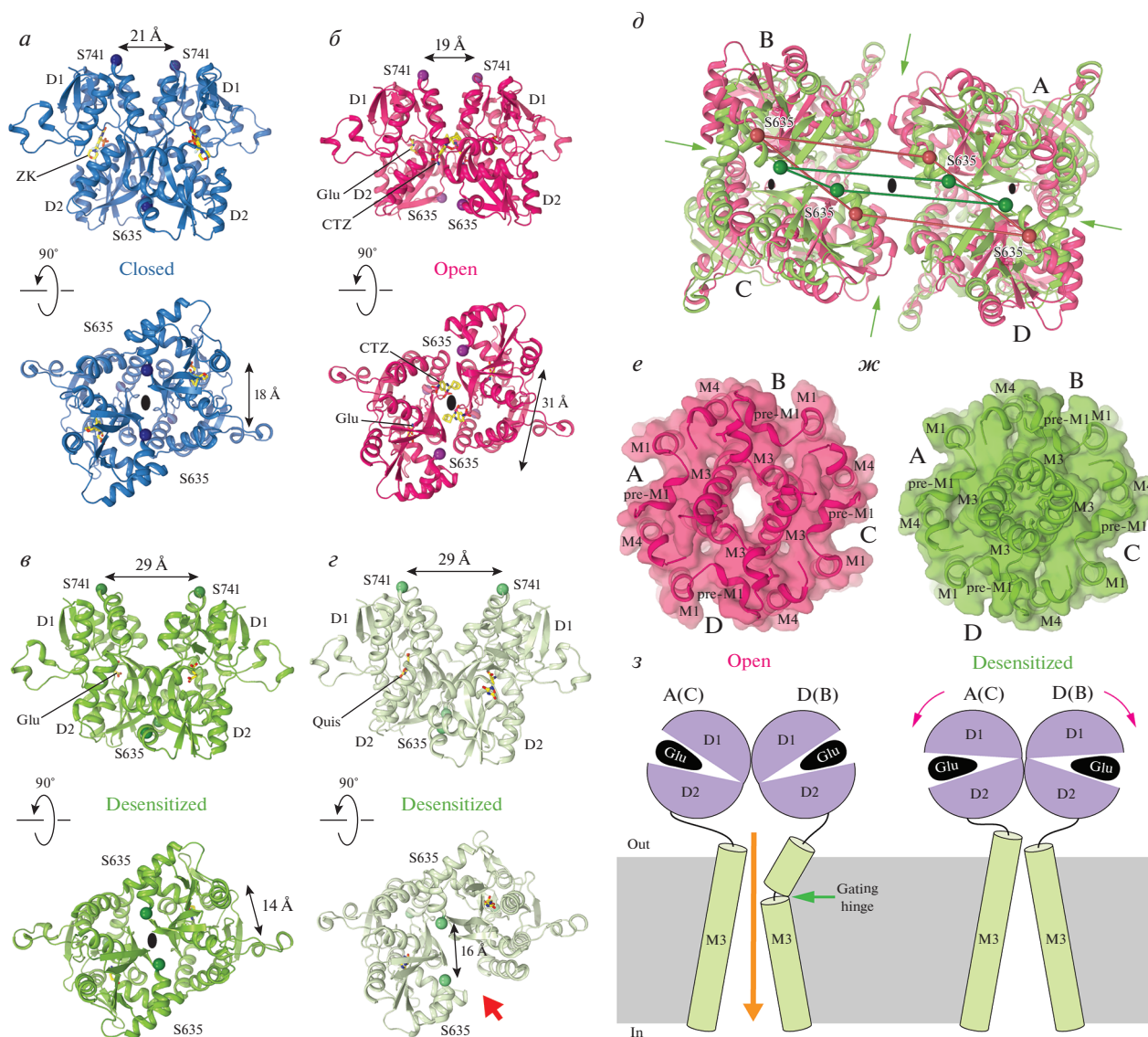


Рис. 8. Механизм десенситизации. *a–г* – Димеры ЛСД в закрытом (*a* – GluA2– γ^5_{ZK} , PDB ID: 7RZ5, синий димер), открытом (*б* – GluA2– $\gamma^2_{Glu-CTZ}$, PDB ID: 5WEO, розовый димер) и десенситизированном (*в* – GluA2– γ^5_{Glu} , PDB ID: 7RZ5, зеленый димер; *г* – GluA2–GSG1L_{Quis}, PDB ID: 7RZ5, светло-зеленый димер) состояниях, если смотреть на них сбоку (первый ряд) или снизу (второй ряд). Молекулы лигандов показаны в виде палочковых моделей. α -атомы остатков S635 и S741 показаны в виде шариков, с указанием расстояний между ними. Черные овалы обозначают локальные оси симметрии второго порядка. Красная стрелка обозначает щель между GluA2–GSG1L_{Quis}-протомерами, свидетельствующую о потере ЛСД-димером вращательной симметрии второго порядка. *д* – Суперпозиция ЛСД-тетрамеров из структур открытого (GluA2– $\gamma^2_{Glu-CTZ}$, PDB ID: 5WEO, розовый тетрамер) и десенситизированного (GluA2– γ^5_{Glu} , PDB ID: 7RZ5, зеленый тетрамер) состояний, если смотреть на них со стороны ТМД, параллельно центральной оси симметрии рецептора (большой черный овал в середине). α -атомы остатков S635 соединены сплошными линиями соответствующего цвета. Сужение ЛСД-слоя, сопровождающее десенситизацию, обозначено зелеными стрелками. *е, ж* – Вид сверху на ионный канал с полупрозрачной поверхностью в открытом (*е*, GluA2– $\gamma^2_{Glu-CTZ}$, PDB ID: 5WEO, розовый канал) и десенситизированном (*ж*, GluA2– γ^5_{Glu} , PDB ID: 7RZ5, зеленый канал) состояниях. Обратите внимание на полное закрывание канальной поры в десенситизированном состоянии. *з* – Схема, иллюстрирующая механизм десенситизации iGluR. Показаны только две из четырех iGluR-субъединиц, две другие для простоты не показаны. Оранжевая стрелка иллюстрирует ионный ток через открытый канал. Зеленая стрелка указывает на воротный шарнир. Розовые стрелки показывают движение ЛСД-мономеров, входящих в состав ЛСД-димера, сопровождающее разрыв D1–D1-интерфейса во время десенситизации.

рах, в результате чего D2-доли возвращаются приблизительно на те же позиции, что и в непроявляющем закрытом состоянии канала. Таким об-

разом, несмотря на то, что все индивидуальные двусторонние ЛСД-структуры остаются в агонист-связанном активированном состоянии, ди-

мер-димерная организация D2-долей, претерпевающая значительное расширение при переходе в открытое состояние, возвращается в слопнутую конфигурацию при переходе в десенситизированное состояние (рис. 8д). Соответственно, пора канала, которая проводит ионы и воду в открытом состоянии (рис. 8е), в десенситизированном состоянии принимает конформацию, подобную конформации закрытого неактивированного канала (рис. 8ж). Эта трансформация завершает механизм десенситизации, который начинается с разрыва D1–D1-интерфейса в ЛСД-димере (рис. 8з).

Интересно, что в ранних кристаллографических исследованиях изолированных ЛСД обнаружено, что разрыв D1–D1-интерфейса сопровождается потерей димером ЛСД вращательной симметрии второго порядка [131]. Такой же тип разрыва интерфейса D1–D1 был позже обнаружен в структурах десенситизированного состояния полноразмерного рецептора GluA2 в комплексе с GSG1L [70, 72]. Потеря вращательной симметрии второго порядка димерами ЛСД в этих структурах сопровождается появлением боковой щели в каждом ЛСД-димере (рис. 8з). Очевидно, что такой тип разрыва D1–D1-интерфейса в ЛСД-димерах не является единственно возможным. Например, в структурах полноразмерного рецептора GluA2 в десенситизированном состоянии в комплексе с вспомогательными TARP субъединицами $\gamma 2$ и $\gamma 5$ разрыв интерфейса D1–D1 происходит с сохранением димерами ЛСД вращательной симметрии второго порядка (рис. 8в) [59, 72].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные исследования последних лет позволили сделать гигантские шаги вперед на пути достижения прогресса в изучении структуры и функции глутаматных рецепторов. Однако такой прогресс был бы невозможен, если бы анализ молекулярной структуры не сопровождался исследованиями с использованием других подходов, включая электрофизиологию, биохимию белка, протеомику, фармакологию, кинетическое и молекулярное моделирование. Параллельная работа многих лабораторий по всему миру сделала возможным более глубокое понимание молекулярных принципов сборки глутаматных рецепторов, их активации, десенситизации и регуляции небольшими молекулами и вспомогательными субъединицами. Тем не менее, многие вопросы пока остаются без ответов. До сих пор непонятно, что лежит в основе 1) сходства и различия между воротными и регуляторными механизмами различных подвидов глутаматных рецепторов, 2) молекулярных составов и принципов сборки синап-

тических комплексов iGluR в различных областях мозга, а также в нейронах разного типа и возраста, 3) вклада индивидуальных субъединиц iGluR в воротные и регуляторные функции тетрамерных сборок и 4) зависимости функции iGluR от окружающей среды, включая липиды мембраны, белки внутриклеточного и внеклеточного матрикса, а также участки белка, такие как карбокси-терминали и внутриклеточные петли, структура которых до сих пор неизвестна. Можно надеяться, что эти и другие вопросы привлекут внимание будущих исследователей, которым ответы на эти вопросы будут снова и снова приносить радость открытия.

Вклад авторов. М.В.Е. и А.И.С. участвовали в написании этой статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках проектов Национального Института Здоровья (NIH CA206573, NS083660, NS107253) и Национального Научного Фонда (NSF 1818086).

Этические принципы. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Благодарности

Мы посвящаем этот обзор памяти нашего учителя профессора Бориса Израилевича Ходорова в 100-летнюю годовщину со дня его рождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T., McBain C.J., Jayaraman V., Low C.M., Dell'Acqua M.L., Diamond J.S., Camp C.R., Perszyk R.E., Yuan H., Traynelis S.F. 2021. Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **73** (4), 298–487.
2. Bowie D. 2008. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **7** (2), 129–143.
3. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14** (6), 383–400.
4. Moretto E., Murru L., Martano G., Sassone J., Passafaro M. 2018. Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **84** (Pt B), 328–342.
5. Moroz L.L., Nikitin M.A., Policar P.G., Kohn A.B., Romanova D.Y. 2021. Evolution of glutamatergic signaling and synapses. *Neuropharmacology.* **199**, 108740.

6. Kong D., Hu H.C., Okuma E., Lee Y., Lee H.S., Munemasa S., Cho D., Ju C., Pedoeim L., Rodriguez B., Wang J., Im W., Murata Y., Pei Z.M., Kwak J.M. 2016. L-Met activates arabidopsis GLR Ca. *Cell Rep.* **17** (10), 2553–2561.
7. Michard E., Lima P.T., Borges F., Silva A.C., Portes M.T., Carvalho J.E., Gilliam M., Liu L.H., Obermeyer G., Feijó J.A. 2011. Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science.* **332** (6028), 434–437.
8. Mousavi S.A., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature.* **500** (7463), 422–426.
9. Wudick M.M., Michard E., Oliveira Nunes C., Feijo J.A. 2018. Comparing plant and animal glutamate receptors: Common traits but different fates? *J. Exp. Bot.* **69** (17), 4151–4163.
10. Kong D., Ju C., Parihar A., Kim S., Cho D., Kwak J.M. 2015. Arabidopsis glutamate receptor homolog3.5 modulates cytosolic Ca²⁺ level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. *Plant Physiol.* **167** (4), 1630–1642.
11. Li F., Wang J., Ma C., Zhao Y., Wang Y., Hasi A., Qi Z. 2013. Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **162** (3), 1497–1509.
12. Singh S.K., Chien C.T., Chang I.F. 2016. The Arabidopsis glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4. *J. Exp. Bot.* **67** (6), 1853–1869.
13. Carrillo E., Gonzalez C.U., Berka V., Jayaraman V. 2021. Delta glutamate receptors are functional glycine- and serine-gated cation channels in situ. *Sci. Adv.* **7** (52), eabk2200.
14. Gangwar S.P., Green M.N., Michard E., Simon A.A., Feijo J.A., Sobolevsky A.I. 2021. Structure of the *Arabidopsis* glutamate receptor-like channel GLR3.2 ligand-binding domain. *Structure.* **29** (2), 161–169.
15. Alfieri A., Doccula F.G., Pederzoli R., Grenzi M., Bonza M.C., Luoni L., Candeo A., Romano Armada N., Barbiroli A., Valentini G., Schneider T.R., Bassi A., Bolognesi M., Nardini M., Costa A. 2020. The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis* thaliana glutamate receptor-like channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117** (1), 752–760.
16. Green M.N., Gangwar S.P., Michard E., Simon A.A., Portes M.T., Barbosa-Caro J., Wudick M.M., Lizzio M.A., Klykov O., Yelshanskaya M.V., Feijo J.A., Sobolevsky A.I. 2021. Structure of the *Arabidopsis* thaliana glutamate receptor-like channel GLR3.4. *Mol. Cell.* **81** (15), 3216–3226.
17. Lomash S., Chittori S., Brown P., Mayer M.L. 2013. Anions mediate ligand binding in *Adineta vaga* glutamate receptor ion channels. *Structure.* **21** (3), 414–425.
18. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51** (1), 7–61.
19. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R., Sibley D. 2010. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62** (3), 405–496.
20. Meyerson J.R., Chittori S., Merk A., Rao P., Han T.H., Serpe M., Mayer M.L., Subramaniam S. 2016. Structural basis of kainate subtype glutamate receptor desensitization. *Nature.* **537** (7621), 567–571.
21. Khanra N., Brown P.M., Perozzo A.M., Bowie D., Meyerson J.R. 2021. Architecture and structural dynamics of the heteromeric GluK2/K5 kainate receptor. *Elife.* **10**, e66097.
22. Karakas E., Furukawa H. 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science.* **344** (6187), 992–997.
23. Lee C.H., Lu W., Michel J.C., Goehring A., Du J., Song X., Gouaux E. 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature.* **511** (7508), 191–197.
24. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F. 2018. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* **150** (8), 1081–1105.
25. Wang J.X., Furukawa H. 2019. Dissecting diverse functions of NMDA receptors by structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **54**, 34–42.
26. Stroebel D., Paoletti P. 2021. Architecture and function of NMDA receptors: An evolutionary perspective. *J. Physiol.* **599** (10), 2615–2638.
27. Geoffroy C., Paoletti P., Mony L. 2021. Positive allosteric modulation of NMDA receptors: Mechanisms, physiological impact and therapeutic potential. *J. Physiol.* **600** (2), 233–259.
28. Burada A.P., Vinnakota R., Kumar J. 2020. The architecture of GluD2 ionotropic delta glutamate receptor elucidated by cryo-EM. *J. Struct. Biol.* **211** (2), 107546.
29. Burada A.P., Vinnakota R., Kumar J. 2020. Cryo-EM structures of the ionotropic glutamate receptor GluD1 reveal a non-swapped architecture. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27** (1), 84–91.
30. Chen L., Chetkovich D.M., Petralia R.S., Sweeney N.T., Kawasaki Y., Wenthold R.J., Brecht D.S., Nicoll R.A. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature.* **408**, 936–943.
31. Tomita S., Adesnik H., Sekiguchi M., Zhang W., Wada K., Howe J.R., Nicoll R.A., Brecht D.S. 2005. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature.* **435** (7045), 1052–1058.
32. Tomita S., Chen L., Kawasaki Y., Petralia R.S., Wenthold R.J., Nicoll R.A., Brecht D.S. 2003. Functional studies and distribution define a family of trans-

- membrane AMPA receptor regulatory proteins. *J. Cell Biol.* **161** (4), 805–816.
33. Kato A.S., Siuda E.R., Nisenbaum E.S., Brecht D.S. 2008. AMPA receptor subunit-specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron*. **59** (6), 986–996.
 34. Schwenk J., Harmel N., Zolles G., Bildl W., Kulik A., Heimrich B., Chisaka O., Jonas P., Schulte U., Fakler B., Klöcker N. 2009. Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science*. **323**, 1313–1319.
 35. von Engelhardt J., Mack V., Sprengel R., Kavenstock N., Li K.W., Stern-Bach Y., Smit A.B., Seeburg P.H., Monyer H. 2010. CKAMP44: A brain-specific protein attenuating short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Science*. **327** (5972), 1518–1522.
 36. Schwenk J., Harmel N., Brechet A., Zolles G., Berkefeld H., Müller C.S., Bildl W., Baehrens D., Huber B., Kulik A., Klockner N., Schulte U., Fakler B. 2012. High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes. *Neuron*. **74** (4), 621–633.
 37. Shanks N.F., Savas J.N., Maruo T., Cais O., Hirao A., Oe S., Ghosh A., Noda Y., Greger I.H., Yates J.R. 3rd, Nakagawa T. 2012. Differences in AMPA and kainate receptor interactomes facilitate identification of AMPA receptor auxiliary subunit GSG1L. *Cell Rep.* **1** (6), 590–598.
 38. Matt L., Kirk L.M., Chenuaux G., Speca D.J., Puhger K.R., Pride M.C., Qneibi M., Haham T., Plambeck K.E., Stern-Bach Y., Silverman J.L., Crawley J.N., Hell J.W., Diaz E. 2018. SynDIG4/Prnt1 is required for excitatory synapse development and plasticity underlying cognitive function. *Cell Rep.* **22** (9), 2246–2253.
 39. Jackson A.C., Nicoll R.A. 2011. The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron*. **70** (2), 178–199.
 40. Schwenk J., Baehrens D., Haupt A., Bildl W., Boudkazi S., Roeper J., Fakler B., Schulte U. 2014. Regional diversity and developmental dynamics of the AMPA-receptor proteome in the mammalian brain. *Neuron*. **84** (1), 41–54.
 41. Schwenk J., Fakler B. 2021. Building of AMPA-type glutamate receptors in the endoplasmic reticulum and its implication for excitatory neurotransmission. *J. Physiol.* **599** (10), 2639–2653.
 42. Gu X., Mao X., Lussier M.P., Hutchison M.A., Zhou L., Hamra F.K., Roche K.W., Lu W. 2016. GSG1L suppresses AMPA receptor-mediated synaptic transmission and uniquely modulates AMPA receptor kinetics in hippocampal neurons. *Nat. Commun.* **7**, 10873.
 43. Tang M., Pelkey K.A., Ng D., Ivakine E., McBain C.J., Salter M.W., McInnes R.R. 2011. Neto1 is an auxiliary subunit of native synaptic kainate receptors. *J. Neurosci.* **31** (27), 10009–10018.
 44. Zhang W., St-Gelais F., Grabner C.P., Trinidad J.C., Sumioka A., Morimoto-Tomita M., Kim K.S., Straub C., Burlingame A.L., Howe J.R., Tomita S. 2009. A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. *Neuron*. **61** (3), 385–396.
 45. Wudick M.M., Portes M.T., Michard E., Rosas-Santiago P., Lizzio M.A., Nunes C.O., Campos C., Santa Cruz Damineli D., Carvalho J.C., Lima P.T., Pantoja O., Feijó J.A. 2018. CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca. *Science*. **360** (6388), 533–536.
 46. Yu J., Rao P., Clark S., Mitra J., Ha T., Gouaux E. 2021. Hippocampal AMPA receptor assemblies and mechanism of allosteric inhibition. *Nature*. **594** (7863), 448–453.
 47. Jay S.D., Ellis S.B., McCue A.F., Williams M.E., Vedvick T.S., Harpold M.M., Campbell K.P. 1990. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. **248** (4954), 490–492.
 48. Kato A.S., Zhou W., Milstein A.D., Knierman M.D., Siuda E.R., Dotzlaw J.E., Yu H., Hale J.E., Nisenbaum E.S., Nicoll R.A., Brecht D.S. 2007. New transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform, gamma-7, differentially regulates AMPA receptors. *J. Neurosci.* **27** (18), 4969–4977.
 49. Shelley C., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2012. TARP-associated AMPA receptors display an increased maximum channel conductance and multiple kinetically distinct open states. *J. Physiol.* **590** (22), 5723–5738.
 50. Soto D., Coombs I.D., Renzi M., Zonouzi M., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2009. Selective regulation of long-form calcium-permeable AMPA receptors by an atypical TARP, gamma-5. *Nat. Neurosci.* **12** (3), 277–285.
 51. Soto D., Coombs I.D., Kelly L., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2007. Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **10**, 1260–1270.
 52. Carrillo E., Shaikh S.A., Berka V., Durham R.J., Litwin D.B., Lee G., MacLean D.M., Nowak L.M., Jayaraman V. 2020. Mechanism of modulation of AMPA receptors by TARP-gamma8. *J. Gen. Physiol.* **152** (1), e201912451.
 53. Priel A., Kollerker A., Ayalon G., Gillor M., Osten P., Stern-Bach Y. 2005. Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J. Neurosci.* **25** (10), 2682–2686.
 54. Ben-Yaacov A., Gillor M., Haham T., Parsai A., Qneibi M., Stern-Bach Y. 2017. Molecular mechanism of AMPA receptor modulation by TARP/Stargazin. *Neuron*. **93** (5), 1126–1137.
 55. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., Grassucci R.A., Frank J., Sobolevsky A.I. 2016. Elucidation of AMPA receptor-stargazin complexes by cryo-electron microscopy. *Science*. **353** (6294), 83–86.

56. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., Grassucci R.A., Frank J., Sobolevsky A.I. 2017. Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. *Nature*. **549** (7670), 60–65.
57. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., Vassilevski A.A., Sobolevsky A.I. 2018. Mechanisms of channel block in calcium-permeable AMPA receptors. *Neuron*. **99** (5), 956–968.
58. Zhao Y., Chen S., Yoshioka C., Bacongus I., Gouaux E. 2016. Architecture of fully occupied GluA2 AMPA receptor-TARP complex elucidated by cryo-EM. *Nature*. **536** (7614), 108–111.
59. Chen S., Zhao Y., Wang Y., Shekhar M., Tajkhorshid E., Gouaux E. 2017. Activation and desensitization mechanism of AMPA receptor-TARP complex by Cryo-EM. *Cell*. **170** (6), 1234–1246.
60. Herguedas B., Watson J.F., Ho H., Cais O., Garcia-Nafria J., Greger I.H. 2019. Architecture of the heteromeric GluA1/2 AMPA receptor in complex with the auxiliary subunit TARP gamma8. *Science*. **364** (6438), eaav9011.
61. Dawe G.B., Musgaard M., Aourousseau M.R., Nayeem N., Green T., Biggin P.C., Bowie D. 2016. Distinct structural pathways coordinate the activation of AMPA receptor-auxiliary subunit complexes. *Neuron*. **89** (6), 1264–1276.
62. Riva I., Eibl C., Volkmer R., Carbone A.L., Plested A.J. 2017. Control of AMPA receptor activity by the extracellular loops of auxiliary proteins. *Elife*. **6**, e28680.
63. Mao X., Gu X., Lu W. 2017. GSG1L regulates the strength of AMPA receptor-mediated synaptic transmission but not AMPA receptor kinetics in hippocampal dentate granule neurons. *J. Neurophysiol.* **117** (1), 28–35.
64. Becanovic K., Pouladi M.A., Lim R.S., Kuhn A., Pavlidis P., Luthi-Carter R., Hayden M.R., Leavitt B.R. 2010. Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Hum. Mol. Genet.* **19** (8), 1438–1452.
65. Brockie P.J., Jensen M., Mellem J.E., Jensen E., Yamasaki T., Wang R., Maxfield D., Thacker C., Hoerndli F., Dunn P.J., Tomita S., Madsen D.M., Maricq A.V. 2013. Cornichons control ER export of AMPA receptors to regulate synaptic excitability. *Neuron*. **80** (1), 129–142.
66. Herring B.E., Shi Y., Suh Y.H., Zheng C.Y., Blankenship S.M., Roche K.W., Nicoll R.A. 2013. Cornichon proteins determine the subunit composition of synaptic AMPA receptors. *Neuron*. **77** (6), 1083–1096.
67. Gill M.B., Kato A.S., Roberts M.F., Yu H., Wang H., Tomita S., Brecht D.S. 2011. Cornichon-2 modulates AMPA receptor-transmembrane AMPA receptor regulatory protein assembly to dictate gating and pharmacology. *J. Neurosci.* **31** (18), 6928–6938.
68. Coombs I.D., Soto D., Zonouzi M., Renzi M., Shelley C., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2012. Cornichons modify channel properties of recombinant and glial AMPA receptors. *J. Neurosci.* **32** (29), 9796–9804.
69. Nakagawa T. 2019. Structures of the AMPA receptor in complex with its auxiliary subunit cornichon. *Science*. **366** (6470), 1259–1263.
70. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., Grassucci R.A., Frank J., Sobolevsky A.I. 2017. Structural bases of desensitization in AMPA receptor-auxiliary subunit complexes. *Neuron*. **94** (3), 569–580.
71. Zhang D., Watson J.F., Matthews P.M., Cais O., Greger I.H. 2021. Gating and modulation of a hetero-octameric AMPA glutamate receptor. *Nature*. **594** (7863), 454–458.
72. Klykov O., Gangwar S.P., Yelshanskaya M.V., Yen L., Sobolevsky A.I. 2021. Structure and desensitization of AMPA receptor complexes with type II TARP gamma5 and GSG1L. *Mol. Cell*. **81**(23), 4771–4783.
73. He L., Sun J., Gao Y., Li B., Wang Y., Dong Y., An W., Li H., Yang B., Ge Y., Zhang X.C., Shi Y.S., Zhao Y. 2021. Kainate receptor modulation by NETO2. *Nature*. **599** (7884), 325–329.
74. Armstrong N., Gouaux E. 2000. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: Crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*. **28** (1), 165–181.
75. Biedermann J., Braunbeck S., Plested A.J.R., Sun H. 2021. Nonselective cation permeation in an AMPA-type glutamate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118** (8), e2012843118.
76. 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.
77. Donevan S.D., Rogawski M.A. 1993. GYKI 52466, a 2,3-benzodiazepine, is a highly selective, noncompetitive antagonist of AMPA/kainate receptor responses. *Neuron*. **10**, 51–59.
78. Tarnawa I., Farkas S., Berzsenyi P., Pataki A., Andrasi F. 1989. Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466. *Eur. J. Pharmacol.* **167** (2), 193–199.
79. Balannik V., Menniti F.S., Paternain A.V., Lerma J., Stern-Bach Y. 2005. Molecular mechanisms of AMPA receptor noncompetitive antagonism. *Neuron*. **48**, 279–288.
80. Donevan S.D., Yamaguchi S., Rogawski M.A. 1994. Non-N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by 3-N-substituted 2,3-benzodiazepines: Relationship to anticonvulsant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271** (1), 25–29.
81. Lazzaro J.T., Paternain A.V., Lerma J., Chenard B.L., Ewing F.E., Huang J., Welch W.M., Ganong A.H., Menniti F.S. 2002. Functional characterization of CP-465,022, a selective, noncompetitive AMPA receptor antagonist. *Neuropharmacology*. **42** (2), 143–153.
82. Menniti F.S., Chenard B.L., Collins M.B., Ducat M.F., Elliott M.L., Ewing F.E., Huang J.I., Kelly K.A., Lazzaro J.T., Pagnozzi M.J., Weeks J.L., Welch W.M.,

- White W.F. 2000. Characterization of the binding site for a novel class of noncompetitive alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.* **58** (6), 1310–1317.
83. Chen C.Y., Matt L., Hell J.W., Rogawski M.A. 2014. Perampanel inhibition of AMPA receptor currents in cultured hippocampal neurons. *PLoS One.* **9** (9), e108021.
84. Hibi S., Ueno K., Nagato S., Kawano K., Ito K., Norimine Y., Takenaka O., Hanada T., Yonaga M. 2012. Discovery of 2-(2-oxo-1-phenyl-5-pyridin-2-yl-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzotrile (perampanel): A novel, noncompetitive alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropanoic acid (AMPA) receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **55** (23), 10584–10600.
85. Bialer M., Johannessen S.I., Levy R.H., Perucca E., Tomson T., White H.S. 2010. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Tenth Eilat conference (EILAT X). *Epilepsy Res.* **92** (2–3), 89–124.
86. Yelshanskaya M.V., Singh A.K., Sampson J.M., Narangoda C., Kurnikova M., Sobolevsky A.I. 2016. Structural bases of noncompetitive inhibition of AMPA subtype ionotropic glutamate receptors by antiepileptic drugs. *Neuron.* **91** (6), 1305–1315.
87. Perszyk R.E., Myers S.J., Yuan H., Gibb A.J., Furukawa H., Sobolevsky A.I., Traynelis S.F. 2020. Hodgkin-Huxley-Katz prize lecture: Genetic and pharmacological control of glutamate receptor channel through a highly conserved gating motif. *J. Physiol.* **598** (15), 3071–3083.
88. Sobolevsky A.I. 2003. Channel block of glutamate receptors. In: *Recent Research Developments in Physiology*. Ed. Pandalai S.G. Research Signpost, Trivandrum. p. 1–38.
89. Costa A.C., Albuquerque E.X. 1994. Dynamics of the actions of tetrahydro-9-aminoacridine and 9-aminoacridine on glutamatergic currents: Concentration-jump studies in cultured rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268** (1), 503–514.
90. Benveniste M., Mayer M.L. 1995. Trapping of glutamate and glycine during open channel block of rat hippocampal neuron NMDA receptors by 9-aminoacridine. *J. Physiol.* **483** (2), 367–384.
91. Koshelev S.G., Khodorov B.I. 1995. Blockade of open NMDA channel by tetrabutylammonium, 9-aminoacridine and tacrine prevents channels closing and desensitization. *Membr. Cell Biol.* **9**, 93–109.
92. Sobolevsky A.I. 1999. Two-component blocking kinetics of open NMDA channels by organic cations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1416** (1–2), 69–91.
93. Sobolevsky A.I., Koshelev S.G., Khodorov B.I. 1999. Probing of NMDA channels with fast blockers. *J. Neurosci.* **19** (24), 10611–10626.
94. Sobolevsky A.I. 2000. Quantitative analysis of tetrapentylammonium-induced blockade of open N-methyl-D-aspartate channels. *Biophys. J.* **79** (3), 1324–1335.
95. Huettner J.E., Bean B.P. 1988. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** (4), 1307–1311.
96. MacDonald J.F., Bartlett M.C., Mody I., Pahapill P., Reynolds J.N., Salter M.W., Schneiderman J.H., Pennefather P.S. 1991. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *J. Physiol.* **432**, 483–508.
97. Parsons C.G., Quack G., Bresink I., Baran L., Przegalinski E., Kostowski W., Krzacik P., Hartmann S., Danysz W. 1995. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology.* **34** (10), 1239–1258.
98. Blanpied T.A., Boeckman F.A., Aizenman E., Johnson J.W. 1997. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J. Neurophysiol.* **77** (1), 309–323.
99. Chen H.S., Lipton S.A. 1997. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: Uncompetitive antagonism. *J. Physiol.* **499** (1), 27–46.
100. Dillmore J.G., Johnson J.W. 1998. Open channel block and alteration of N-methyl-D-aspartic acid receptor gating by an analog of phencyclidine. *Biophys. J.* **75** (4), 1801–1816.
101. Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V. 2000. The trapping block of NMDA receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* **526** (3), 493–506.
102. Sobolevsky A.I., Koshelev S.G., Khodorov B.I. 1998. Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **512** (1), 47–60.
103. Song X., Jensen M.O., Jogini V., Stein R.A., Lee C.H., McHaourab H.S., Shaw D.E., Gouaux E. 2018. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. *Nature.* **556** (7702), 515–519.
104. Zhang Y., Ye F., Zhang T., Lv S., Zhou L., Du D., Lin H., Guo F., Luo C., Zhu S. 2021. Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors. *Nature.* **596** (7871), 301–305.
105. Sobolevsky A.I., Beck C., Wollmuth L.P. 2002. Molecular rearrangements of the extracellular vestibule in NMDAR channels during gating. *Neuron.* **33** (1), 75–85.
106. Bowie D., Mayer M.L. 1995. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron.* **15** (2), 453–462.
107. Koh D.S., Burnashev N., Jonas P. 1995. Block of native Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J. Physiol.* **486**, 305–312.

108. Kamboj S.K., Swanson G.T., Cull-Candy S.G. 1995. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J. Physiol.* **486**, 297–303.
109. Donevan S.D., Rogawski M.A. 1995. Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca^{2+} -permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (20), 9298–9302.
110. Antonov S.M., Grishin E.V., Magazanik L.G., Shupliakov O.V., Vesselkin N.P., Volkova T.M. 1987. Argiopin blocks the glutamate responses and sensorimotor transmission in motoneurons of isolated frog spinal cord. *Neurosci. Lett.* **83** (1–2), 179–184.
111. Гришин Е.В., Волкова Т.М., Арсеньев А.С., Решетова О.С., Оноприенко В.В. 1986. Структурно-функциональная характеристика аргиопина – блокатора ионных каналов из яда паука *Argiope lobata*. *Биоорг. химия.* **12** (8), 1121–1124.
112. Shudo K., Endo Y., Hashimoto Y., Aramaki Y., Nakajima T., Kawai N. 1987. Newly synthesized analogues of the spider toxin block the crustacean glutamate receptor. *Neurosci. Res.* **5** (1), 82–85.
113. Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E., Konno K., Mansour N.A., Nakanishi K., Oltz E., Usherwood P.N. 1988. Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** (13), 4910–4913.
114. Kopach O., Krotov V., Goncharenko J., Voitenko N. 2016. Inhibition of spinal Ca^{2+} -permeable AMPA receptors with dicationic compounds alleviates persistent inflammatory pain without adverse effects. *Front. Cell Neurosci.* **10**, 50.
115. Liu S.B., Zhang M.M., Cheng L.F., Shi J., Lu J.S., Zhuo M. 2015. Long-term upregulation of cortical glutamatergic AMPA receptors in a mouse model of chronic visceral pain. *Mol. Brain.* **8** (1), 76.
116. Szczerowska E., Mares P. 2015. An antagonist of calcium permeable AMPA receptors, IEM1460: Anticonvulsant action in immature rats? *Epilepsy Res.* **109**, 106–113.
117. Gmiro V.E., Serdyuk S.E. 2008. Combined blockade of AMPA and NMDA receptors in the brain of rats prevents pentylentetrazole-induced clonic and tonic-clonic seizures without ataxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145** (6), 728–730.
118. Umino M., Umino A., Nishikawa T. 2018. Effects of selective calcium-permeable AMPA receptor blockade by IEM 1460 on psychotomimetic-induced hyperactivity in the mouse. *J. Neural. Transm. (Vienna).* **125** (4), 705–711.
119. Magazanik L.G., Buldakova S.L., Samoilova M.V., Gmiro V.E., Mellor I.R., Usherwood P.N. 1997. Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by adamantane derivatives. *J. Physiol.* **505**, 655–663.
120. Noh K.M., Yokota H., Mashiko T., Castillo P.E., Zukin R.S., Bennett M.V. 2005. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** (34), 12230–12235.
121. Zhang Q., Zhang G., Meng F., Tian H. 2003. Biphasic activation of apoptosis signal-regulating kinase 1-stress-activated protein kinase 1-c-Jun N-terminal protein kinase pathway is selectively mediated by Ca^{2+} -permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors involving oxidative stress following brain ischemia in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **337** (1), 51–55.
122. Koike M., Iino M., Ozawa S. 1997. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **29** (1), 27–36.
123. Takazawa A., Yamazaki O., Kanai H., Ishida N., Kato N., Yamauchi T. 1996. Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats. *Brain Res.* **706** (1), 173–176.
124. Herlitze S., Raditsch M., Ruppertsberg J.P., Jahn W., Monyer H., Schoepfer R., Witzemann V. 1993. Argiotoxin detects molecular differences in AMPA receptor channels. *Neuron.* **10** (6), 1131–1140.
125. Grishin E.V., Volkova T.M., Arseniev A.S. 1989. Isolation and structure analysis of components from venom of the spider *Argiope lobata*. *Toxicon.* **27** (5), 541–549.
126. Poulsen M.H., Lucas S., Bach T.B., Barslund A.F., Wenzler C., Jensen C.B., Kristensen A.S., Stromgaard K. 2013. Structure-activity relationship studies of argiotoxins: Selective and potent inhibitors of ionotropic glutamate receptors. *J. Med. Chem.* **56** (3), 1171–1181.
127. Barygin O.I., Grishin E.V., Tikhonov D.B. 2011. Argiotoxin in the closed AMPA receptor channel: Experimental and modeling study. *Biochemistry.* **50** (38), 8213–8220.
128. Green A.C., Nakanishi K., Usherwood P.N. 1996. Polyamine amides are neuroprotective in cerebellar granule cell cultures challenged with excitatory amino acids. *Brain Res.* **717** (1–2), 135–146.
129. Tikhonova T.B., Barygin O.I., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. 2008. Organic blockers escape from trapping in the AMPA receptor channels by leaking into the cytoplasm. *Neuropharmacology.* **54** (4), 653–664.
130. Sun Y., Olson R., Horning M., Armstrong N., Mayer M., Gouaux E. 2002. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature.* **417** (6886), 245–253.
131. Armstrong N., Jasti J., Beich-Frandsen M., Gouaux E. 2006. Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell.* **127** (1), 85–97.
132. Yelshanskaya M.V., Li M., Sobolevsky A.I. 2014. Structure of an agonist-bound ionotropic glutamate receptor. *Science.* **345** (6200), 1070–1074.

Structural Insights into Function of Ionotropic Glutamate Receptors

M. V. Yelshanskaya¹, A. I. Sobolevsky^{1, *}

¹*Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University, New York, NY 10032, USA*

**e-mail: as4005@cumc.columbia.edu*

Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) mediate fast excitatory neurotransmission. They are implicated in nervous system development and function, while their dysfunction is associated with neurological and psychiatric disorders. In this review, we describe recent progress in structural studies of iGluRs and how crystal and cryo-EM structures helped determining the principles of iGluR architecture and assembly, and the mechanisms of activation, desensitization and regulation by auxiliary subunits, positive and negative allosteric modulators, and ion channel blockers. The new structural insights facilitate better understanding of iGluR physiological and pathophysiological roles in functioning of the central nervous system and provide valuable information for structure-based drug design.

Keywords: iGluR, AMPA receptor, NMDA receptor, kainate receptor, delta receptor, GLR, auxiliary subunit, gating, desensitization, channel blocker, inhibitor, cryo-EM, X-ray crystallography

УДК 577.151.63

Na⁺,K⁺-АТФ-аза КАК ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК© 2022 г. О. Д. Лопина^{a, *}, О. В. Букач^a, С. В. Сидоренко^a, Е. А. Климанова^{a, **}^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии, Москва, 119234 Россия

*e-mail: od_lopina@mail.ru

**e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 01.03.2022 г.

Принята к публикации 06.03.2022 г.

С момента открытия Na⁺,K⁺-АТФ-азы Й. Скоу в 1957 году этот фермент рассматривался исключительно как транспортер, обеспечивающий активный перенос ионов Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану клеток, в связи с чем подробно изучалась его структура и механизм функционирования, а также вовлеченность в работу систем вторичного транспорта ионов. В настоящем обзоре кратко рассмотрены данные о структуре и функционировании фермента. Более подробно описана установленная позднее роль Na⁺,K⁺-АТФ-азы как рецептора кардиотонических стероидов (КТС), связывание которых с ферментом инициирует разнообразные сигнальные пути за счет белок-белковых взаимодействий, модифицируемых также изменением внутриклеточной концентрации ионов Na⁺ и K⁺ за счет ингибирования транспортной функции Na⁺,K⁺-АТФ-азы, и Ca²⁺ путем опосредованного изменения активности Na⁺/Ca²⁺-обменника. Все это обеспечивает разнообразные эффекты КТС, включая их влияние на экспрессию генов, состояние плотных контактов, адгезию клеток, индукцию гипертрофии миокарда, стимуляцию генерации свободно-радикальных форм кислорода, а также инициирует смерть или выживание клеток в зависимости от типа ткани. Приведены данные об открытии эндогенных КТС, а также анализ данных литературы, свидетельствующих о том, что концентрации эндогенных КТС столь малы, что вряд ли они способны вызвать ингибирование Na⁺,K⁺-АТФ-азы. В связи с этим приведены данные об активации фермента низкими дозами КТС и высказана идея о возможной суммации концентраций различных стероидов. В заключении рассмотрены возможные направления исследования множественных функций Na⁺,K⁺-АТФ-азы.

Ключевые слова: Na⁺,K⁺-АТФ-аза, кардиотонические стероиды, экспрессия генов**DOI:** 10.31857/S0233475522040065**ВВЕДЕНИЕ**

В 1997 году Нобелевская премия по химии была вручена трем ученым: датчанину Й. Скоу из Орхусского университета, американцу П. Бойеру из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе и англичанину Дж. Уокеру из лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета Великобритании (Кембридж) за изучение ферментов, обратимо преобразующих энергию АТФ в трансмембранный градиент ионов. П. Бойер и Дж. Уокер длительное время занимались изучением АТФ-синтетазы митохондрий: П. Бойер предложил трехтактный механизм работы этого фермента и предсказал существование вращения части этой молекулярной машины в процессе работы, а Дж. Уокер с использованием методов электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа выяснил строение этого фермента и подтвердил трехтактную кинетиче-

скую схему его работы. Вращение части фермента при его функционировании было позднее подтверждено японскими исследователями.

Третий нобелевский лауреат Й. Скоу был известен научному миру как первооткрыватель и исследователь Na⁺,K⁺-АТФ-азы, фермента, обеспечивающего перенос ионов Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану клеток животных против электрохимического градиента. В 1957 году, исследуя гомогенат нервов краба, Й. Скоу обнаружил в нем АТФ-азную активность, зависящую от соотношения ионов Na⁺ и K⁺ в среде, т.е. обнаружил фермент, который специфически распознает два этих одновалентных иона [1].

Еще в конце 30-х годов прошлого века было установлено, что кардиотонические стероиды (класс родственных соединений, в структуру которых входит циклопентанпергидрофенантеновое (стероидное) ядро) вызывают накопление

ионов Na^+ и потерю ионов K^+ в сердечной мышце [2], а в 1953 году Х. Шатцман установил, что эти соединения подавляют АТФ-зависимую аккумуляцию K^+ и выведение Na^+ из эритроцитов человека [3]. Эти эксперименты дали основание считать, что в клетках имеется Na^+, K^+ -насос, который переносит ионы Na^+ и K^+ через клеточную мембрану против электрохимического градиента. Уже через три года после обнаружения Na^+, K^+ -зависимой АТФ-азы Й. Скоу опубликовал следующую работу, в которой показал, что обнаруженная им Na^+, K^+ -АТФ-аза ингибируется убаином (соединением из класса кардиостероидов) и заключил, что именно она является тем самым Na^+ -насосом, который выкачивает Na^+ из клетки, используя в качестве источника энергии АТФ [4].

Na^+, K^+ -АТФ-аза: СТРОЕНИЕ И ТРАНСПОРТНЫЕ ФУНКЦИИ

Во второй половине XX века в лаборатории Й. Скоу и еще в нескольких лабораториях США и Европы начали интенсивно исследовать механизм работы Na^+ -насоса. Этот фермент был получен из почек [5], где он принимает активное участие в реабсорбции ионов Na^+ из первичной мочи, а также (за счет создания градиента Na^+) обеспечивает энергией системы вторичного транспорта, такие как $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ -котранспорт, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, Na^+/H^+ -обменник, а также системы реабсорбции аминокислот, нуклеотидов и др. [6]. Изучение его структуры показало, что Na^+, K^+ -АТФ-аза состоит минимум из двух типов субъединиц, одна из которых является каталитической (α -субъединица) с молекулярной массой около 100 кДа, а другая (β -субъединица), белковая часть которой имеет массу около 35 кДа, существенно гликозилируется (до достижения молекулярной массы в 55–60 кДа) и непосредственного участия в катализе не принимает, однако обеспечивает доставку α -субъединицы от места синтеза к плазматической мембране и является регуляторной, влияя на сродство фермента к одновалентным катионам [7, 8].

В настоящее время идентифицировано 4 изоформы α - ($\alpha 1$ – $\alpha 4$) и 3 изоформы β -субъединиц ($\beta 1$ – $\beta 3$), они характеризуются различным распределением в тканях и могут образовывать комплексы в любом сочетании, например, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ и т.д. Образованные путем таких комбинаций тканеспецифичные изоферменты Na^+, K^+ -АТФ-азы различаются по кинетическим свойствам, в частности имеют различное сродство к убаину, АТФ и одновалентным катионам [7, 9].

Почти сразу после получения очищенной Na^+, K^+ -АТФ-азы из почек была обнаружена и ее третья, γ -субъединица [10]. Однако ее функциональное значение долгое время оставалось неясным, пока не было обнаружено, что она формирует в мембране единый комплекс с $\alpha\beta$ -димером, влияя на некоторые кинетические характеристики Na^+, K^+ -АТФ-азы, в частности на ее чувствительность к одновалентным катионам [11]. γ -Субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы относится к семейству малых мембранных белков FXYD с единственным трансмембранным доменом, по крайней мере 5 из 7 белков этого семейства, имеющие различные названия, а именно FXYD1 (фосфолеман), FXYD2 (γ -субъединица Na^+, K^+ -АТФ-азы), FXYD3 (Mat-8), FXYD4 (CHIF) и FXYD7, входят в состав Na^+, K^+ -АТФ-азы и принимают участие в регуляции ее активности. Следует, однако, отметить, что белки семейства FXYD взаимодействуют не только с Na^+, K^+ -АТФ-азой, они способны образовывать комплексы и с другими мембранными белками, например, в плазматической мембране сердца они находятся рядом и при иммунопреципитации осаждаются совместно с $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником и Ca^{2+} -каналом L-типа [12]. Взаимодействуя с этим транспортером, фосфолеман (FXYD1) подавляет его активность [13].

При изучении ферментативных свойств Na^+, K^+ -АТФ-азы было установлено, что в процессе каталитического цикла происходит образование так называемого фосфорилированного интермедиата, возникающего за счет переноса терминального фосфорильного остатка АТФ на остаток аспартата, расположенного в активном центре Na^+, K^+ -АТФ-азы [14]. Этот процесс происходит одновременно с переносом Na^+ из клетки наружу, в то время как гидролиз фосфоинтермедиата – с переносом ионов K^+ в противоположном направлении. Почти сразу после обнаружения фосфоинтермедиата Р. Постом была предложена схема каталитического цикла фермента, получившая название схемы Алберса–Поста, по фамилиям авторов, опубликовавших статью с этой схемой [15, 16]. В процессе исследований она уточнялась, несколько модифицировалась, и в результате оказалась пригодной для описания каталитического цикла других ферментов, относящихся к АТФ-азам Р-типа (например, Ca^{2+} -АТФ-азы, H^+, K^+ -АТФ-азы слизистой оболочки желудка и др.) [17].

Итак, уже к началу XXI века были выявлены изоформы всех субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы, исследовано их распределение в различных тканях, выяснено, как именно полипептидные цепи этих

субъединиц располагаются внутри мембраны. Благодаря усилиям сотрудников нескольких лабораторий была установлена аминокислотная последовательность отдельных субъединиц. И наконец, фермент был закристаллизован в различных конформациях и были получены 3D-структуры Na⁺,K⁺-АТФ-азы с высоким разрешением [18]. Следует отметить, что все работы по кристаллизации и определению третичной структуры фермента были выполнены с использованием α 1 β 1 γ -изофермента, поскольку только этот изофермент был получен в очищенном виде.

После получения Й. Скоу Нобелевской премии и установления механизма функционирования и трехмерной структуры Na⁺,K⁺-АТФ-азы стало казаться, что этот объект уже не представляет интереса для исследователей. Однако ситуация оказалась не столь проста, как выглядела на первый взгляд. Последние данные позволяют считать Na⁺,K⁺-АТФ-азу белком с множественными функциями.

КАРДИОТОНИЧЕСКИЕ СТЕРОИДЫ – РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Работы, вызвавшие вторую волну интереса к Na⁺,K⁺-АТФ-азе, были начаты еще в 80-е годы прошлого века. Они привели к открытию так называемых эндогенных кардиостероидов. Кардиотонические стероиды, являющиеся ингибиторами Na⁺,K⁺-АТФ-азы, были известны как вещества растительного происхождения. С давних времен они использовались в качестве ядов и лекарств. Например, название “уабаин” происходит от сомалийского *waabaayo*, что означает “яд стрелы”. Он в больших количествах содержится в африканских растениях строфант приятный (*Strophanthus gratus*) и акокантера абиссинская (*Acokanthera schimperi*) и применялся охотниками для отравления наконечников стрел. Отвары из растений рода наперстянка (*Digitalis purpurea* и *Digitalis lanata*), содержащих родственные уабаину кардиостероиды дигоксин и дигитоксин, использовались для лечения водянки. Еще в 1650 г. наперстянка пурпурная была включена в английскую фармакопею, но ее перестали использовать в 1746 г. из-за часто происходящих отравлений. [19]. Однако в 1775 г. английский врач сэр У. Визеринг опубликовал сообщение о том, что экстракт из листьев наперстянки является средством для лечения сердечной недостаточности, и потратил почти 10 лет на его реабилитацию [20]. Дигоксин и в настоящее время используют для лечения хронической сердечной недостаточности, свя-

занной с декомпенсированными пороками клапанов сердца, а также при атеросклеротическом кардиосклерозе и перегрузке миокарда вследствие артериальной гипертензии [21].

Все кардиотонические стероиды по структуре делят на две группы: карденелиды и буфадиенолиды. Соединения обеих групп содержат стероидное ядро, которое в 17 положении имеет в качестве заместителя пятичленное (карденелиды) или шестичленное (буфадиенолиды) лактоновое кольцо. Кроме того, у карденелидов в 3-м положении могут находиться от одного до трех остатков сахаров; буфадиенолиды являются, главным образом, агликонами. Буфадиенолиды обнаружены в слизи жаб рода *Bufo* (в частности, *Bufo rubescens* и *Bufo marinus*), они защищают этих амфибий от поедания хищниками.

В 80-е годы прошлого столетия было обнаружено, что у некоторых экспериментальных животных, например, крыс с гипертензией, сопровождающейся увеличением объема циркулирующей жидкости (модель “one clip, one kidney”), а также у больных гипертонической болезнью и некоторыми другими заболеваниями, в крови обнаруживаются органические соединения с молекулярной массой менее 1000 Да [22]. Использование антител против дигоксина у таких животных снижало у них артериальное давление. Это привело исследователей к выводу, что у млекопитающих в крови присутствуют так называемые эндогенные кардиостероиды, повышение концентрации которых происходит при развитии сердечно-сосудистых, почечных, нейрональных и некоторых других заболеваний [22, 23].

Длительные поиски этих соединений привели к выделению из биологических жидкостей млекопитающих и идентификации сначала уабаина [24], а затем и таких кардиостероидов, как дигоксин, буфалин, маринобуфагенин, телочинобуфагин и маринобуфатоксин [25]. Есть данные, свидетельствующие в пользу того, что эти эндогенные кардиостероиды синтезируются, предположительно, в коре надпочечников и гипоталамусе [6].

Какова же функция эндогенных стероидов? Что они регулируют в организме млекопитающих? В течение последних двух десятилетий было показано, что длительная инкубация различных клеток с кардиостероидами (в первую очередь с уабаином, который благодаря хорошей растворимости в воде обычно используется в экспериментах *in vitro*) приводит в разных клетках к различным физиологическим эффектам. Так, было показано, что уабаин влияет на экспрессию генов, синтез белка, состояние плотных контактов, ад-

гезию клеток, вызывает гипертрофию миокарда, активирует генерацию свободно-радикальных форм кислорода, а также инициирует смерть или выживание клеток в зависимости от типа ткани и видовой принадлежности животного [25].

Обнаружено, что кардиотонические стероиды способны активировать различные сигнальные каскады благодаря конформационным переходам $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы. Их связывание с $\alpha 1$ -субъединицей и вызванный этим конформационный переход приводит к активации нерецепторной тирозинкиназы Src, фосфатидилинозитол-3-киназы и рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (Ca^{2+} -канал эндоплазматического ретикулама) [26]. Эти данные позволили предположить, что эндогенные кардиостероиды представляют собой новый класс стероидных гормонов.

Достаточно давно было выявлено, что инкубация клеток с убаином приводит к увеличению экспрессии генов, в частности тех, что кодируют собственные субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы (по крайней мере, в нервной ткани [27–29]). Но одно из обширных пионерских исследований, проведенных в лаборатории А. Аскарри с использованием кардиомиоцитов, показало, что после связывания убаина Na^+, K^+ -АТФ-аза взаимодействует с заякоренной в мембране нерецепторной Src-киназой, вызывая ее активацию [30].

Прямое взаимодействие Src-киназы с Na^+, K^+ -АТФ-азой впоследствии было подтверждено в экспериментах других исследователей [31], и механизм, лежащий в основе этого явления, был подробно изучен [32]. Установлено, что активированная Src-киназа фосфорилирует остаток тирозина в рецепторе фактора роста эпидермиса (EGFR), находящемся в плазматической мембране, и в нескольких других белках, причем это фосфорилирование устраняется ингибиторами Src-киназы, например, гербимицином А [33]. После фосфорилирования EGFR с остатком фосфотирозина этого белка взаимодействует адапторный белок Shc, содержащий необходимый для такого взаимодействия SH2-домен. В свою очередь с белком Shc взаимодействует белок Grb2, после чего последний связывает белок Sos, являющийся фактором обмена нуклеотидов. После образования комплекса с Grb2 он активируется и обеспечивает обмен GDP на GTP в мономерном G-белке Ras. Эти события происходят независимо от изменения внутриклеточного соотношения ионов Na^+ и K^+ [30], т.е. для активации Ras достаточно связывания убаина с Na^+, K^+ -АТФ-азой. Однако связывание Ras необходимо, но недостаточно для

дальнейшей активации классического каскада митоген-активируемых киназ, включающего Raf (MAP3K), MEK (MAP2K) и p42/p44 MAPK. Последняя в этом ряду протеинкиназа называется также ERK1/2. Она проникает в ядро и путем фосфорилирования регуляторных элементов влияет на экспрессию генов.

Активация Ras оказывается также необходима для увеличения генерации свободно-радикальных форм кислорода митохондриями. Параллельно убаин, ингибируя Na^+, K^+ -АТФ-азу, увеличивает внутриклеточную концентрацию Na^+ , что приводит к активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и к локальному повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [34]. Это, с одной стороны, вызывает активацию сокращения сердечной мышцы, с чем и связано, как считается, терапевтическое действие дигоксина при хронической сердечной недостаточности, называемое положительным инотропным эффектом. Предполагается, что этот эффект реализуется в специальных микродоменах, называемых плазматическими, основными компонентами которых являются $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [35]. В то же время точный механизм этого явления неясен, и уже давно вызывает дискуссии [36]. Есть сомнения в том, что в основе положительного инотропного эффекта лежит ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азы, поскольку концентрация дигоксина в плазме крови пациентов, принимающих этот кардиостероид в дозах, снижающих смертность, не превышает 1–2 нМ [37]. Тогда как концентрация дигоксина, при которой наблюдается полумаксимальное ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азы, содержащей $\alpha 1$ -субъединицу, составляет 1.2 мкМ [38], а Na^+, K^+ -АТФ-азы, содержащей $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединицы, равна 219 нМ [39]. Даже если учесть, что все изоферменты Na^+, K^+ -АТФ-азы человека наиболее чувствительны к кардиостероидам, 1–2 нМ дигоксина недостаточно, чтобы вызвать ингибирование фермента. По мнению З. Се и А. Аскарри, именно повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , с одной стороны, активирует факторы регуляции транскрипции NF κ B и AP-1, что приводит к активации генов раннего ответа (*Fos*, *Jun*), а с другой – это второй фактор, необходимый для активации каскада протенкиназ, заканчивающегося активацией ERK1/2 [30]. Все эти события вызывают стимуляцию синтеза белка и, как следствие, гипертрофию миокарда, а также вовлечены в увеличение продукции свободно-радикальных форм кислорода в различных типах клеток [30]. Важно отметить, что невзирая на существующую возмож-

ность убаина инициировать сигнальный каскад МАРК исключительно за счет белок-белковых взаимодействий, на некоторых этапах реализации его действия необходимо также изменение концентрации внутриклеточных ионов Na⁺ и/или Ca²⁺ [30].

Однако в дальнейшем не все попытки повторить эти эксперименты оказались успешными. А. Аскари пишет о том, что у него в процессе исследования были разногласия по поводу трактовки результатов экспериментов, проведенных в его лаборатории совместно с З. Се, и подробно обсуждает эту проблему [40]. По мнению А. Аскари, невозможность результатов обусловлена тем, что результаты экспериментов по изучению взаимодействия Na⁺,K⁺-АТФ-азы и Src *in vitro* искажены присутствием детергентов. В дальнейшем было установлено, что активацию Src-киназы вызывает не только убаин, но и другие ингибиторы Na⁺,K⁺-АТФ-азы, например, ванадат. Это позволило предположить, что Src-киназа активируется за счет того, что при ингибировании Na⁺,K⁺-АТФ-азы увеличивается локальная концентрация общего для обоих ферментов субстрата, АТФ, и экспериментально было показано, что фосфорилирование EGFR меняется в зависимости от активности Na⁺,K⁺-АТФ-азы [41]. И наконец, были получены свидетельства, что гипертрофия кардиомиоцитов происходит, скорее всего, с участием одной из изоформ фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) [40]. Стоит отметить, что исследование сигнальных каскадов, между которыми существует множественные взаимодействия, является довольно сложной технической проблемой. По-видимому, вопрос о механизмах, лежащих в основе действия убаина, опосредующего гипертрофию сердечной мышцы, до сих пор нельзя считать полностью решенным. Возможно, существуют оба механизма взаимодействия Na⁺,K⁺-АТФ-азы и Src, которые существуют параллельно, и в определенных условиях преобладает один из них. Для окончательного решения этого вопроса необходимы дальнейшие эксперименты.

Установлено, что кардиотонические стероиды могут через активацию Src инициировать также сигнальный каскад с участием фосфолипазы С (PLC-γ), которая обычно активируется через рецепторы, сопряженные с G-белками. Фосфорилирование Src-киназой PLC-γ крысы по остатку тирозина активирует последнюю, что вызывает гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата и увеличение концентрации 1,2-диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата [42]. Инозитол-

1,4,5-трифосфат в свою очередь связывается с Ca²⁺-каналом эндоплазматического ретикулаума, являющегося рецептором этого вторичного мессенджера, вызывая освобождение ионов Ca²⁺ [42]. Другим сигнальным путем с участием маринобуфагина, Na⁺,K⁺-АТФ-азы и фосфолипазы С является каскад, приводящий к ингибированию транскрипционного фактора Fli1, являющегося негативным регулятором синтеза коллагена [43]. Этот механизм может вносить существенный вклад и в патогенез соль-чувствительной гипертонической болезни [44].

Л. Лю и соавторы показали также, что в присутствии низких концентраций убаина в культуре крысиных кардиомиоцитов наблюдается активация серин-треониновой протеинкиназы В, известной также как Akt. Эта активация устраняется ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы [45]. Они обнаружили, что убаин вызывает увеличение концентрации инозитол-1,4,5-трифосфата и приводит к взаимодействию α-субъединицы Na⁺,K⁺-АТФ-азы и фосфорилированной 85 кДа субъединицы PI3K (p85). Исследуя роль Src-киназы в индукции PI3K/Akt сигнального каскада, Й. У и соавторы провели эксперименты с мышинными фибробластами с нокаутом Src. Они показали, что 10–100 мкМ убаин индуцирует накопление фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата, активацию PI3K1A и Akt, а также взаимодействие p85 субъединицы PI3K и Na⁺,K⁺-АТФ-азы в обоих типах клеток (нокаутной и нормальной), и все эти процессы нечувствительны к ингибитору Src-киназы PP2 [46]. Эти данные позволяют считать, что активация Akt обусловлена прямым взаимодействием обогащенного пролином участка α-субъединицы Na⁺,K⁺-АТФ-азы с SH3-доменом p85 субъединицы PI3K, которое индуцируется связыванием кардиотонических стероидов с Na⁺,K⁺-АТФ-азой и не связано (или мало) с ингибированием фермента.

Обнаружено, что в клетках проксимального канальца нефрона частичное ингибирование Na⁺,K⁺-АТФ-азы низкими концентрациями убаина приводит к возникновению или усилению осцилляций внутриклеточной концентрации Ca²⁺, которые устраняются нифедипином, блоатором Ca²⁺-каналов L-типа [47]. Показано, что это обусловлено прямым взаимодействием N-концевой части полипептидной цепи α-субъединицы Na⁺,K⁺-АТФазы с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата, расположенного в прилегающей к плазматической части эндоплазматического ретикулаума [47]. Осцилляции внутриклеточной концентрации Ca²⁺ обеспечивают фосфорилиро-

вание большого количества Ca^{2+} -зависимых белков. Блокада индуцируемой убаином активации транскрипционных факторов NF- κ B и CREB, устраняющая их активацию, вызвана их фосфорилированием и входом в ядро [48].

Длительная обработка убаином различных типов клеток собаки, свиньи и человека вызывает их смерть, сочетающую в себе признаки апоптоза и некроза, причем эта смерть не связана с ингибированием Na^+ , K^+ -АТФ-азы, поскольку такое же по времени выдерживание клеток в среде без K^+ , обеспечивающее полное ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы, не оказывает аналогичного эффекта. Однако столь же длительная обработка убаином клеток грызунов, также вызывающая полное ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы, не индуцирует клеточную смерть (см. обзор [49]). Мы предприняли попытку исследовать механизмы, лежащие в основе смерти одних клеток и выживания других. Клетки грызунов отличаются от клеток других млекопитающих “не-грызунов” тем, что они менее чувствительны к убаину (значение констант диссоциации комплексов убаин— $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -АТФ-аза для грызунов примерно на три порядка выше, в то же время существенных различий в сродстве других $\alpha 2$ — $\alpha 4$ -изоформ между грызунами и “не-грызунами” не выявлено. В этой связи далее по тексту термины “убаин-чувствительная” и “убаин-резистентная” применяются по отношению к $\alpha 1$ -изоформе Na^+ , K^+ -АТФ-азы). В нашей лаборатории, руководимой профессором Орловым С., было обнаружено, что связывание убаина с убаин-чувствительной (“не-грызуны”) и убаин-резистентной (грызуны) Na^+ , K^+ -АТФ-азой приводит к различным изменениям конформации фермента, что вызывает активацию в случае “не-грызунов” р38 митоген-активируемой протеинкиназы MAPK [50]. Выживание клеток грызунов обусловлено тем, что убаин-резистентная Na^+ , K^+ -АТФ-аза этих животных при связывании убаина претерпевает иные конформационные изменения, что приводит к активации сигнального каскада, связанного с ERK1/2 [50]. Введение в клетки мыши гена, кодирующего убаин-чувствительную форму $\alpha 1$ -субъединицы, приводит к тому, что клетки мышей начинают умирать при инкубации с убаином. Таким образом, смерть клеток под действием убаина обусловлена, по всей видимости, конформационными переходами Na^+ , K^+ -АТФ-азы, которые приводят к активации тех или иных сигнальных каскадов [49].

Способность кардиотонических стероидов индуцировать гибель клеток позволила рассмат-

ривать их в качестве сенолитических компонентов — соединений, вызывающих апоптоз стареющих клеток, у которых нарушены процессы программируемой клеточной смерти [51]. Изучение механизмов этого явления, проведенное А. Шатровой и соавторами на мезенхимальных стволовых клетках эндометрия человека, показало, что старение этих клеток сопровождается одновременным уменьшением и увеличением внутриклеточного содержания K^+ ($[\text{K}^+]_i$) и Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) соответственно. Инкубация этих клеток в присутствии 1 мкМ убаина в течение 48 ч, приводящая к ингибированию Na^+ , K^+ -АТФ-азы и сопровождающаяся дальнейшим увеличением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в этих клетках, не влияла на их жизнеспособность [52]. Стоит отметить, что взаимосвязь между внутриклеточным содержанием одновалентных катионов и нарушением механизмов клеточной смерти обсуждается довольно давно. Так, в монографии “Vitamins and Minerals in the Prevention and Treatment of Cancer” под редакцией М. Джейкобс одна из глав посвящена этой проблеме [53]. Авторы подчеркивают, что высокое содержание K^+ снижает рост опухоли и риск онкотрансформации, тогда как высокое соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ (за счет увеличения $[\text{Na}^+]_i$) оказывает противоположный эффект. Кроме того, приводятся результаты анализа внутриядерного содержания этих ионов в разных типах раковых клеток, который показал, что соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в них в несколько раз больше по сравнению с нормальными клетками того же типа.

КАРДИОТОНИЧЕСКИЕ СТЕРОИДЫ КАК АКТИВАТОРЫ Na^+ , K^+ -АТФ-азы

Еще один важный вопрос связан с тем, какова концентрация эндогенного убаина (или средняя концентрации других кардиостероидов) в организме млекопитающих по сравнению с теми концентрациями, которые вызывают описанные выше эффекты. Сравнение средних концентраций кардиостероидов, оказывающих действие на различные процессы в клетках, показывает, что большинство эффектов инициируется теми концентрациями, которые в крови млекопитающих не достигаются, т.е. при концентрациях кардиостероидов, существующих в организме млекопитающих, ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы невозможно [25]. Те концентрации убаина (или других кардиостероидов), которые обнаружены в организмах млекопитающих (менее 1 нМ), могут инициировать лишь часть из описанных выше процессов, а именно: пролиферацию клеток, ак-

тивацию Src-киназы, осцилляцию внутриклеточных концентраций Ca²⁺ и активацию Na⁺,K⁺-АТФ-азы. Таким образом, процессы, для которых необходимо увеличение внутриклеточных концентраций Na⁺, вызываемое ингибированием Na⁺,K⁺-АТФ-азы (например, гипертрофия сердечной мышцы), *in vivo*, по-видимому, не произойдут без воздействия экзогенно добавленных кардиостероидов. Однако нельзя также исключить, что если концентрации разных присутствующих в крови млекопитающих кардиостероидов, например, дигоксина или маринобуфагенина, могут суммироваться и насыщать убаин-связывающие центры фермента, тогда их суммарной концентрации будет достаточно для инициации процессов, которые обусловлены более высокими концентрациями.

Удивительно, но данные, полученные многими исследовательскими группами, свидетельствуют о том, что убаин не только ингибирует, но в низких дозах (т.е. в физиологическом диапазоне) активирует Na⁺,K⁺-АТФ-азу. Это явление было описано в литературе еще в 60-х годах XX века [54, 55]. Спустя 10 лет после этого сообщения Т. Годфрейнд и Дж. Гизель-Бертон опубликовали данные о том, что инкубация изолированного левого предсердия морской свинки в присутствии 1 и 3 нМ убаина в течение 3 ч приводила к уменьшению внутриклеточного содержания Na⁺ и увеличению внутриклеточного содержания K⁺ по сравнению с контрольными образцами [56]. Авторы предположили существование двух участков связывания убаина с разным сродством внутри молекулы Na⁺,K⁺-АТФ-азы. Позднее Д. Лихштейн и соавторы показали, что убаин в диапазоне концентраций 1–100 нМ оказывает ярко выраженный стимулирующий эффект на Na⁺,K⁺-АТФ-азу в гомогенате мозга крысы. Однако подобного эффекта не наблюдалось на препарате микросом, полученных из мозга крысы [36]. Авторы также отметили, что активирующий эффект (в отличие от ингибирующего) убаина зависит от времени хранения препарата при –20°С, что также ранее было показано другими исследователями [54, 55]. Они предложили два возможных объяснения стимулирующего эффекта низких концентраций убаина. Первое связано с наличием эндогенного убаино-подобного соединения, которое, связываясь с высокоаффинным участком Na⁺,K⁺-АТФ-азы, приводит к частичной потере активности фермента. Добавление низких концентраций убаина в такой ситуации “растормаживает” Na⁺,K⁺-АТФ-азу. Второе объяснение предполагает изменение мембранного

окружения Na⁺-насоса в результате связывания этого кардиостероида, которое само по себе может оказывать ингибирующее действие на фермент. Т. Хоуген и соавторы в экспериментах с использованием изолированного левого предсердия морской свинки также показали увеличение активности Na⁺,K⁺-АТФ-азы в присутствии 3 нМ убаина, и этот эффект устранялся в присутствии пропранолола (ингибитора β-адренергических рецепторов). Это наблюдение (а также эксперименты с использованием резерпина и 6-гидроксидофамина) позволило авторам предположить, что убаин-опосредованная активация Na⁺-насоса обеспечивается действием эндогенных катехоламинов [57]. Мы также регистрировали увеличение активности Na⁺,K⁺-АТФ-азы в микросомах из почек свиньи в присутствии 1–10 нМ убаина и в клетках эндотелия пупочной вены человека в присутствии 0,3, 1 и 3 нМ убаина [58, 59].

Возникает вопрос, каков физиологический смысл активации Na⁺,K⁺-АТФ-азы убаином, в частности в отношении невозбудимых тканей? Анализ данных литературы относительно физиологических эффектов суб- и наномолярных концентраций КТС в различных типах клеток позволяет сделать следующие заключения. Такие концентрации КТС часто усиливают клеточную пролиферацию [25]. Так, убаин в концентрации 1–10 нМ, не ингибирующей Na⁺-насос, увеличивает пролиферацию культивируемых эндотелиальных клеток человека [60], гладкомышечных клеток собаки [61] и эпителиальных клеток почки опоссума [62], содержащих чувствительную к кардиостероидам Na⁺,K⁺-АТФ-азу, до 40%. Мы также регистрировали увеличение жизнеспособности HUVES (клетки эндотелия пупочной вены человека) и синтез ДНК в HREC (клетки почечного эпителия человека) и HUVES в присутствии 1 и 3 нМ убаина [58, 59].

Механизм бимодального действия убаина на активность Na⁺,K⁺-АТФ-азы (активация и ингибирование при низких и высоких концентрациях соответственно) остается пока не выясненным. Среди возможных, описанных в литературе, можно выделить основные: 1) наличие двух участков связывания убаина внутри молекулы фермента [56]; 2) изменение мембранного окружения фермента, оказывающего ингибирующее воздействие в результате связывания убаина [36]; 3) белок-белковые взаимодействия (например, с Na⁺/H⁺-обменником [63, 64]), опосредованные связыванием убаина с Na⁺,K⁺-АТФ-азой. Экспериментальные данные, полученные в нашей лаборатории с использованием различных культур клеток, а так-

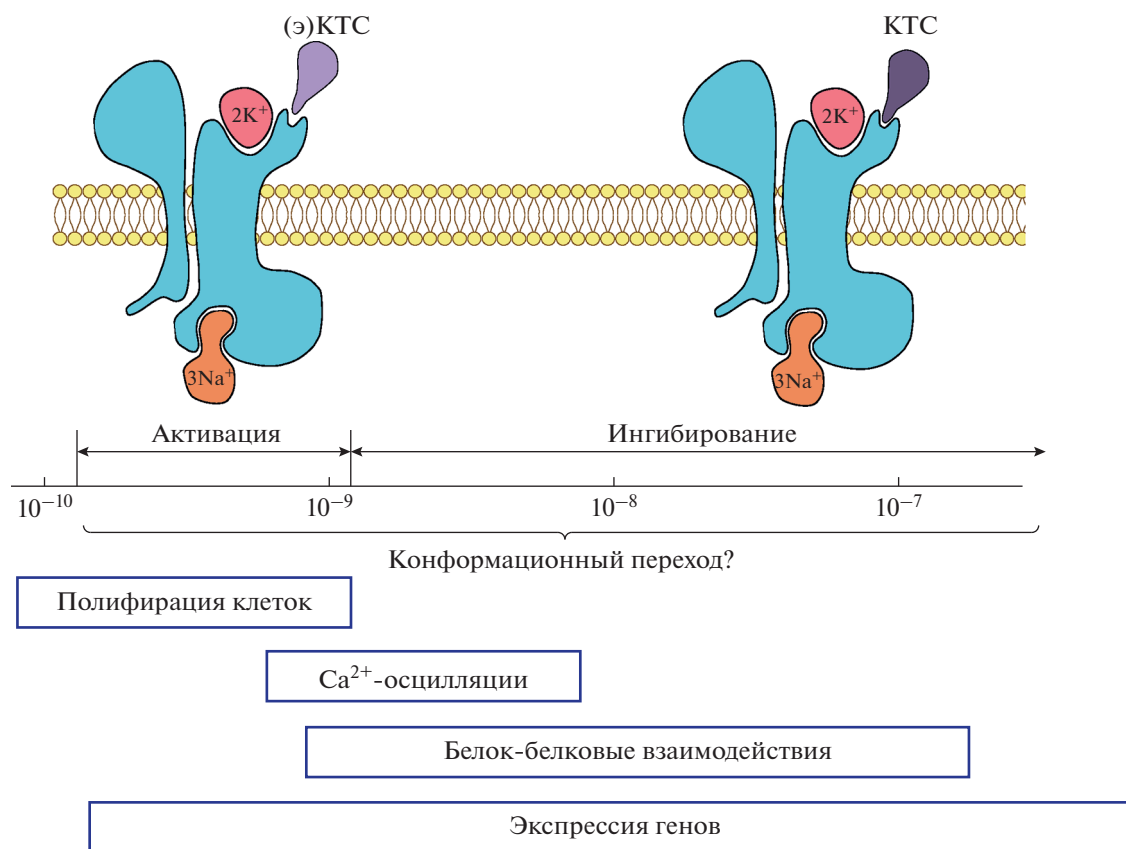


Рис. 1. Эффекты связывания кардиотонических стероидов с Na^+, K^+ -АТФ-азой: роль изменений соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, которые возникают при ингибировании и активации Na^+, K^+ -АТФ-азы соответственно, и запуска клеточной сигнализации за счет конформационных изменений фермента.

же частично очищенных (фракция микросом) и высокоочищенных препаратов Na^+, K^+ -АТФ-азы (солюбилизированный фермент), позволяют предположить следующий механизм активации фермента низкими концентрациями кардиотонических стероидов (в частности, убаина). Функциональной единицей Na^+, K^+ -АТФ-азы является $\alpha\beta$ -протомер, который может обратимо олигомеризоваться с образованием более крупных молекулярных комплексов вида $(\alpha\beta)_n$ [65]. Этот процесс может регулироваться, например, посредством АТФ. Так, его связывание с олигомером Na^+, K^+ -АТФ-азы приводит к формированию ее закрытой конформации [66], последующей диссоциации комплекса на мономеры и усилением транспортной функции фермента [17]. Образованию закрытой конформации Na^+, K^+ -АТФ-азы также способствует связывание убаина [67]. Таким образом, можно предположить, что убаин, связываясь с высокоаффинным участком Na^+, K^+ -АТФ-азы в составе ее олигомерного комплекса, провоцирует переход фермента в закрытую конформацию, что влечет за собой диссоциа-

цию олигомера на мономеры, которые проявляют усиленную транспортную активность. Увеличение концентрации убаина приводит к насыщению фермента ингибитором и сопровождается уменьшением его активности.

Резюмируя вышеизложенные факты, можно заключить, что спектр действия кардиотонических стероидов на различные типы клеток весьма обширен и зависит от того, каким образом они влияют на Na^+, K^+ -АТФ-азу (рис. 1). Эти влияния могут затрагивать как ионный гомеостаз (причем не только увеличивать соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, но и снижать), так и внутриклеточный сигналинг посредством изменения конформации фермента. Таким образом, исследуя эффекты кардиотонических стероидов, следует по возможности оценивать их влияние на транспортную функцию Na^+, K^+ -АТФ-азы и внутриклеточный ионный состав.

Есть ли взаимосвязь между внутриклеточным соотношением $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ и экспрессией генов? Каковы механизм и физиологическая роль акти-

вазии Na⁺,K⁺-АТФ-азы кардиотоническими стероидами? Что является сенсором внутриклеточных одновалентных катионов? Эти вопросы требуют детального изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, годы, прошедшие с момента получения Й. Скоу Нобелевской премии, показали, что Na⁺,K⁺-АТФ-аза обладает не только транспортной функцией, обеспечивая перенос ионов Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану. Этот фермент также является рецептором для эндогенных кардиостероидов, связывая которые он может передавать сигнал внутрь клетки за счет взаимодействия с белками-партнерами, включая таким образом сигнальные каскады, регулирующие клеточные функции. Кроме того, от транспортной функции этого фермента зависит внутриклеточная концентрация ионов Na⁺ и K⁺, изменение соотношения этих ионов в клетке прямо влияет на экспрессию многих генов [68–70]. Этот аспект влияния Na⁺,K⁺-АТФ-азы на функции клетки не обсуждался в настоящей статье, но прямое действие соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i на экспрессию генов заставляет нас задуматься о поиске сенсора этих катионов [71]. Заклучая, мы можем сказать, что вопросов о роли Na⁺,K⁺-АТФ-азы в функционировании клеток и о механизмах, вовлеченных в осуществление влияния фермента на клетку, пока больше, чем ответов. По этой причине Na⁺,K⁺-АТФ-аза еще долго останется объектом для исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skou J.C. 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* **23**, 394–401.
- Wood E.H., Moe G.K. 1938. Studies on the effect of digitalis glycosides on potassium ion loss from the heart. *Am. J. Physiol.* **123**, 219–220.
- Schatzmann H.J. 1953. Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* **11**, 346–354.
- Skou J.C. 1960. Further investigations on a Mg⁺⁺ + Na⁺-activated adenosinotriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **42**, 6–23.
- Jørgensen L.P., Skou J.C. 1969. Preparation of highly active (Na⁺ + K⁺)-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 39–46.
- Lingrel J.B. 2010. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 395–412.
- Blanco G., Mercer R.W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* **275**, F633–F650.
- Geering K. 2001. The Functional role of β subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 425–438.
- Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. 2017. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.* **8**, 371.
- Forbush B., Kaplan J.H., Hoffman J.F. 1978. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: Labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry.* **17**, 3667–3676.
- Geering K. 2006. FXYD proteins: New regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, F241–250.
- Cheung J.Y., Zhang X.-Q., Song J., Gao E., Chan T.O., Rabinowitz J.E., Koch W.J., Feldman A.M., Wang J. 2013. Coordinated regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺-K⁺-ATPase by phospholemman (FXYD1). *Adv. Exp. Med. Biol.* **961**, 175–190.
- Ahlers B.A., Zhang X.-Q., Moorman J.R., Rothblum L.I., Carl L.L., Song J., Wang J., Geddis L.M., Tucker A.L., Mounsey J.P., Cheung J.Y. 2005. Identification of an endogenous inhibitor of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger, phospholemman. *J. Biol. Chem.* **280**, 19875–19882.
- Lingrel J.B., Kuntzweiler T. 1994. Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19659–19662.
- Albers R.W. 1967. Biochemical aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **36**, 727–756.
- Post R.L., Hegyvary C., Kume S. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**, 6530–6540.
- Clarke R.J. 2009. Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases. *Eur. Biophys. J.* **39**, 3.
- Dyla M., Kjærgaard M., Poulsen H., Nissen P. 2020. Structure and mechanism of P-type ATPase ion pumps. *Annu. Rev. Biochem.* **89**, 583–603.
- Burchell H.B. 1976. Coincidental bicentennials: United States and foxglove therapy. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **31**, 292–306.

20. Krickler D.M. 1985. The foxglove, "The old woman from Shropshire" and William Withering. *J. Am. Coll. Cardiol.* **5** (5), 3A–9A.
21. Patocka J., Nepovimova E., Wu W., Kuca K. 2020. Digoxin: Pharmacology and toxicology—A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **79**, 103400.
22. Pavlovic D. 2019. Endogenous cardiotonic steroids and cardiovascular disease, where to next? *Cell Calcium.* **86**, 102156.
23. Lopachev A.V., Abaimov D.A., Fedorova T.N., Lopacheva O.M., Akkuratova N.V., Akkuratov E.E. 2018. Cardiotonic steroids as potential endogenous regulators in the nervous system. *Neurochem. J.* **12**, 1–8.
24. Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H. 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6259–6263.
25. Orlov S.N., Tverskoi A.M., Sidorenko S.V., Smolyaninova L.V., Lopina O.D., Dulin N.O., Klimanova E.A. 2020. Na,K-ATPase as a target for endogenous cardiotonic steroids: What's the evidence? *Genes Dis.* **8**, 259–271.
26. ZhuGe R., DeCrescenzo V., Sorrentino V., Lai F.A., Tuft R.A., Lifshitz L.M., Lemos J.R., Smith C., Fogarty K.E., Walsh J.V. 2006. Syntillas release Ca^{2+} at a site different from the microdomain where exocytosis occurs in mouse chromaffin cells. *Biophys. J.* **90**, 2027–2037.
27. Kometiani P., Tian J., Nabih Z., Gick G., Xie Z. 2000. Regulation of Na/K-ATPase β 1-subunit gene expression by ouabain and other hypertrophic stimuli in neonatal rat cardiac myocytes. *Mol. Cell Biochem.* **215**, 65–72.
28. Hosoi R., Matsuda T., Asano S., Nakamura H., Hashimoto H., Takuma K., Baba A. 1997. Isoform-specific up-regulation by ouabain of Na^+ , K^+ -ATPase in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **69**, 2189–2196.
29. Xue Z., Li B., Gu L., Hu X., Li M., Butterworth R.F., Peng L. 2010. Increased Na, K-ATPase α 2 isoform gene expression by ammonia in astrocytes and in brain in vivo. *Neurochem. Int.* **57**, 395–403.
30. Xie Z., Askari A. 2002. Na^+ / K^+ -ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2434–2439.
31. Nie Y., Bai F., Chaudhry M.A., Pratt R., Shapiro J.I., Liu J. 2020. The Na/K-ATPase α 1 and c-Src form signaling complex under native condition: A crosslinking approach. *Sci. Rep.* **10**, 6006.
32. Pratt R.D., Brickman C.R., Cottrill C.L., Shapiro J.I., Liu J. 2018. The Na/K-ATPase signaling: From specific ligands to general reactive oxygen species. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2600.
33. Haas M., Askari A., Xie Z. 2000. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na^+ / K^+ -ATPase. *J. Biol. Chemistry.* **275**, 27832–27837.
34. Blaustein M.P., Juhaszova M., Golovina V.A. 1998. The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: A new hypothesis. *Clin. Exp. Hypertens.* **20**, 691–703.
35. Blaustein M.P., Hamlyn J.M. 2020. Ouabain, endogenous ouabain and ouabain-like factors: The Na^+ pump/ouabain receptor, its linkage to NCX, and its myriad functions. *Cell Calcium.* **86**, 102159.
36. Lichtstein D., Samuelov S., Bourrit A. 1985. Characterization of the stimulation of neuronal Na^+ , K^+ -ATPase activity by low concentrations of ouabain. *Neurochem. Int.* **7**, 709–715.
37. Askari A. 2019. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **7**, e00505.
38. Tverskoi A.M., Poluektov Y.M., Klimanova E.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Orlov S.N., Petrushanko I.Y., Lopina O.D. 2021. Depth of the steroid core location determines the mode of Na,K-ATPase inhibition by cardiotonic steroids. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13268.
39. Rocha S.C., Pessoa M.T.C., Neves L.D.R., Alves S.L.G., Silva L.M., Santos H.L., Oliveira S.M.F., Taranto A.G., Comar M., Gomes I.V., Santos F.V., Paixão N., Quintas L.E.M., Noël F., Pereira A.F., Tassis A.C.S.C., Gomes N.L.S., Moreira O.C., Rincon-Heredia R., Varotti F.P., Blanco G., Villar J.A.F.P., Contreras R.G., Barbosa L.A. 2014. 21-Benzylidene digoxin: A proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. *PLoS One.* **9**, e108776.
40. Askari A. 2019. The other functions of the sodium pump. *Cell Calcium.* **84**, 102105.
41. Weigand K.M., Swarts H.G.P., Fedosova N.U., Russell F.G.M., Koenderink J.B. 2012. Na,K-ATPase activity modulates Src activation: A role for ATP/ADP ratio. *Biochim. Biophys. Acta.* **1818**, 1269–1273.
42. Yuan Z., Cai T., Tian J., Ivanov A.V., Giovannucci D.R., Xie Z. 2005. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 4034–4045.
43. Agalakova N.I., Kolodkin N.I., Adair C.D., Trashkov A.P., Bagrov A.Y. 2021. Preeclampsia: Cardiotonic steroids, fibrosis, Fli1 and hint to carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1941.
44. Bagrov A.Y. 2021. High salt is a risk factor for cardiovascular and kidney diseases. What is next, fibrosis? *J. Hypertens.* **39**, 1309–1310.
45. Liu L., Zhao X., Pierre S.V., Askari A. 2007. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, 1489–1497.
46. Wu J., Akkuratov E.E., Bai Y., Gaskill C.M., Askari A., Liu L. 2013. Cell signaling associated with Na^+ / K^+ -ATPase: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. *Biochemistry.* **52**, 9059–9067.
47. Aizman O., Uhlén P., Lal M., Brismar H., Aperia A. 2001. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 13420–13424.
48. Desfrere L., Karlsson M., Hiyoshi H., Malmersjö S., Nanou E., Estrada M., Miyakawa A., Lagercrantz H., Manira A.E., Lal M., Uhlén P. 2009. Na,K-ATPase

- signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 2212–2217.
49. Lopina O.D., Tverskoi A.M., Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Orlov S.N. 2020. Ouabain-induced cell death and survival. Role of α 1-Na,K-ATPase-mediated signaling and $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -dependent gene expression. *Front. Physiol.* **11**, 1060.
 50. Akimova O.A., Lopina O.D., Rubtsov A.M., Gekle M., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2009. Death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence for p38 MAPK-mediated Na^+/K^+ -independent signaling. *Apoptosis*. **14**, 1266.
 51. Triana-Martínez F., Picallos-Rabina P., Silva-Álvarez S.D., Pietrocola F., Llanos S., Rodilla V., Soprano E., Pedrosa P., Ferreirós A., Barradas M., Hernández-González F., Lalinde M., Prats N., Bernadó C., González P., Gómez M., Ikonomopoulou M.P., Fernández-Marcos P.J., García-Caballero T., Pino P. del, Arribas J., Vidal A., González-Barcia M., Serrano M., Loza M.I., Domínguez E., Collado M. 2019. Identification and characterization of cardiac glycosides as senolytic compounds. *Nat. Commun.* **10**, 1–12.
 52. Shatrova A., Pugovkina N., Domnina A., Nikolsky N., Marakhova I. 2022. Monovalent ions and stress-induced senescence in human mesenchymal endometrial stem cells. *Research Square*.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1087662/v1>
 53. Jacobs M.M., Pienta R.J. 1991. In: *Vitamins and minerals in the prevention and treatment of cancer*. Ed Jacobs M.M. Boca Raton: CRC Press, p. 228–245.
 54. Brown H.D. 1966. A characterization of the ouabain sensitivity of heart microsomal ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. **120**, 162–165.
 55. Palmer R.F., Lasseter K.C., Melvin S.L. 1966. Stimulation of Na^+ and K^+ dependent adenosine triphosphatase by ouabain. *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 629–633.
 56. Godfraind T., Ghysel-Burton J. 1977. Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature*. **265**, 165–166.
 57. Hougen T.J., Spicer N., Smith T.W. 1981. Stimulation of monovalent cation active transport by low concentrations of cardiac glycosides. Role of catecholamines. *J. Clin. Invest.* **68**, 1207–1214.
 58. Tverskoi A.M., Sidorenko S.V., Klimanova E.A., Akimova O.A., Smolyaninova L.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2016. Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na^+ , K^+ -ATPase activity and intracellular ratio of Na^+ and K^+ . *Biochemistry (Mosc)*. **81**, 876–883.
 59. Klimanova E.A., Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Abramicheva P.A., Lopina O.D., Orlov S.N. 2020. Ouabain and marinobufagenin: physiological effects on human epithelial and endothelial cells. *Biochemistry (Mosc)*. **85**, 507–515.
 60. Saunders R., Scheiner-Bobis G. 2004. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1054–1062.
 61. Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J.C. 2001. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**, 46605–46611.
 62. Khundmiri S.J., Metzler M.A., Ameen M., Amin V., Rane M.J., Delamere N.A. 2006. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C1247–C1257.
 63. Khundmiri S.J., Salyer S.A., Farmer B., Qipshidze-Kelm N., Murray R.D., Clark B.J., Xie Z., Pressley T.A., Lederer E.D. 2014. Structural determinants for the ouabain-stimulated increase in Na–K ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1843**, 1089–1102.
 64. Holthouser K.A., Mandal A., Merchant M.L., Schelling J.R., Delamere N.A., Valdes R.R., Tyagi S.C., Lederer E.D., Khundmiri S.J. 2010. Ouabain stimulates Na-K-ATPase through a sodium/hydrogen exchanger-1 (NHE-1)-dependent mechanism in human kidney proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F77–F90.
 65. Yoneda J.S., Scanavachi G., Sebinelli H.G., Borges J.C., Barbosa L.R.S., Ciancaglini P., Itri R. 2016. Multimeric species in equilibrium in detergent-solubilized Na,K-ATPase. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 238–245.
 66. Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Klimanova E.A., Dergousova E.A., Lopina O.D., Markarov A.A. 2014. Critical role of γ -phosphate in structural transition of Na,K-ATPase upon ATP binding. *Sci. Rep.* **4**, 5165.
 67. Grimaldi S., Pascale E., Pozzi D., D’Onofrio M., Giganti M.G., Verna R. 1988. Effect of ouabain binding on the fluorescent properties of the Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. **944**, 13–18.
 68. 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+} -independent excitation-transcription coupling. *PLoS One*. **7**, e38032.
 69. Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Smolyaninova L.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2019. Ubiquitous and cell type-specific transcriptomic changes triggered by dissipation of monovalent cation gradients in rodent cells: Physiological and pathophysiological implications. *Curr. Top. Membr.* **83**, 107–149.
 70. Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Tverskoi A.M., Abramicheva P.A., Maksimov G.V., Orlov S.N., Lopina O.D., Klimanova E.A. 2021. Na^+/K^+ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl. *Heliyon*. **7**, e08088.
 71. Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Tverskoi A.M., Shiyan A.A., Smolyaninova L.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Maksimov G.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2019. Search for intracellular sensors involved in the functioning of monovalent cations as secondary messengers. *Biochemistry (Mosc)*. **84**, 1280–1295.

Na,K-ATPase As a Polyfunctional Protein

O. D. Lopina¹ *, O. V. Bukach¹, S. V. Sidorenko¹, E. A. Klimanova¹ **

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biochemistry, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: od_lopina@mail.ru

**e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Since the discovery of Na,K-ATPase by Jens Skou in 1957, this enzyme has been considered exclusively as a transporter that ensures the active transport of Na⁺ and K⁺ ions across the cell plasma membrane; therefore, its structure and mechanism of functioning as well as its involvement in secondary ion transport systems have been studied in detail. In the present review, the data on the structure and functioning of the enzyme are briefly reviewed. The role of Na,K-ATPase as a receptor for cardiotonic steroids (CTS), whose binding to the enzyme initiates a variety of signaling pathways through protein–protein interactions modified also by changes in the intracellular concentration of Na⁺ and K⁺ ions by inhibiting the Na,K-ATPase transport function and Ca²⁺, by mediating changes in Na/Ca-exchange activity, was described in more detail. All this provides a variety of CTS effects, including their effect on gene expression, the state of tight junctions, cell adhesion, induction of myocardial hypertrophy, stimulation of free-radical oxygen species generation, and initiation of cell death or survival depending on tissue type. Data on the discovery of endogenous CTS are presented, as well as an analysis of published data indicating that concentrations of endogenous CTS are so low that they are unlikely to cause inhibition of Na,K-ATPase. In this connection, the data on the enzyme activation by low doses of CTS are presented, and the idea of a possible summation of the concentrations of various steroids is proposed. In conclusion, possible directions for studying the multiple functions of Na,K-ATPase are discussed.

Keywords: Na,K-ATPase, cardiotonic steroids, gene expression

УДК 577,57.04

НАРУШЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА И ОТВЕТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2022 г. В. А. Дзряя^а, А. М. Хайтин^{а, *}, С. В. Демьяненко^а^аЮжный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: andrej.wojt@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 13.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Фотодинамическое воздействие на нейроны и глиальные клетки, вызывающее окислительный стресс и ишемическое повреждение, сопровождается нарушением кальциевого гомеостаза и активацией либо подавлением различных кальций-зависимых механизмов — кальциевых насосов и каналов, кальций-зависимых сигнальных и исполнительных белков, а также других сигнальных систем, взаимодействующих с кальциевым путем — ионных каналов, насосов и обменников, оксида азота, глутамата и прочих. Каскад инициированных окислительным стрессом и ишемией процессов в нервной ткани включает как защитные реакции, так и апоптотический либо некротический сценарий клеточной смерти. В этом мини-обзоре рассматриваются и сопоставляются с литературой данные об этих процессах, полученные в нашей лаборатории на моделях фототромботического инсульта на головном мозге крыс *in vivo*, и фотодинамической терапии на модели механорецептора речного рака *in vitro*. Данные направления исследований обусловлены необходимостью поиска методов экстренной нейропротекции при ишемическом инсульте и повышением точности и эффективности фотодинамической терапии опухолей при минимизации повреждений доброкачественной ткани. В протеомном исследовании области пенумбры на модели фототромботического инсульта были обнаружены изменения экспрессии ряда кальций-зависимых белков, связанные с нарушением кальциевого гомеостаза и имеющие либо защитную, либо повреждающую направленность. При ингибиторном анализе воздействия фотоокислительного стресса на модели рецептора растяжения рака было выявлено участие ряда белков кальций-зависимого пути в смерти либо выживании нейронов и глиальных клеток. В этой статье данные анализируются и обобщаются с тем, чтобы выявить перспективные направления дальнейших исследований.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация, глутаматная сигнализация, нейрон, глия, фототромботический инсульт, фотодинамическая терапия

DOI: 10.31857/S023347522040041

ВВЕДЕНИЕ

Исследования нашей лаборатории имеют пересечения с работами Б.И. Ходорова по исследованию молекулярно-клеточных основ нейротоксичности, в том числе нарушений кальциевого гомеостаза.

Кальций, будучи универсальным вторичным мессенджером в системе сигнальной трансдукции, интегрирует ряд сигнальных путей, контролируемых различными функциями и смертью клетки. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} до 10^{-4} – 10^{-3} М запускает некротический или апоптотический сценарий клеточной смерти. В клетках

работают одновременно разные системы поддержания кальциевого гомеостаза: натрий-кальциевые и другие обменники, пассивные кальциевые каналы с различными механизмами активации, активные кальциевые насосы, специфические митохондриальные механизмы ввода и вывода Ca^{2+} , депо-зависимые механизмы, кальций-зависимые белки.

Центральная роль Ca^{2+} в физиологических и патологических процессах обуславливает необходимость изучения их роли, в том числе и в процессах, вызванных окислительным стрессом. В этом обзоре будут затронуты исследования нарушений

кальциевого гомеостаза, происходящих при фототромботическом инсульте головного мозга и фотодинамически индуцированном окислительном стрессе нейронов и прилегающей глии.

ФОТОТРОМБОТИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ И КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ

Инсульт представляет собой многоступенчатый процесс, при котором повреждение клеток распространяется от очага инфаркта к окружающим тканям, в результате чего формируется переходная зона, так называемая ишемическая пенумбра, где смерть клеток развивается медленней, в течение нескольких часов [1, 2].

Ионы кальция являются универсальными внутриклеточными мессенджерами как во время ишемического повреждения, так и в постшемический период. В частности, они играют ключевую роль в механизме эксайтотоксичности, активации протеолитических ферментов, инициации некроза и апоптоза, распространении повреждающих процессов за пределы ядра инфаркта и формировании пенумбры. Предыдущие исследования показали, что повышенные уровни Ca^{2+} влияют на размер инфаркта, а также определяют исход и рецидив ишемического инсульта [3]. Такая многогранная роль Ca^{2+} объясняет необходимость дальнейших исследований роли кальция в инициации гибели клеток при ишемической атаке.

Согласно современной парадигме, в очаге ишемии дефицит кислорода и глюкозы вызывает истощение АТФ, образование активных форм кислорода (АФК), окислительное повреждение мембран, потерю ионных градиентов, приток Ca^{2+} , высвобождение K^+ , окислительный стресс и отек тканей. K^+ -опосредованная деполяризация способствует открытию каналов NMDA в соседних нейронах, дополнительному притоку Ca^{2+} и высвобождению K^+ и глутамата [4, 5]. Такой саморазвивающийся эксайтотоксический процесс приводит к распространению повреждения за пределы очага инфаркта [6, 7].

Внутриклеточный Ca^{2+} индуцирует митохондриальную дисфункцию, образование АФК и продукцию NO. Ca^{2+} -активируемая нейрональная NO-синтаза, которая часто пространственно связана с NMDA-рецепторами, продуцирует оксид азота, который реагирует с O^{2-} с образованием мощного окислителя пероксинитрита ($ONOO^-$). Кроме того, цитозольный Ca^{2+} активирует различные гидролитические ферменты, такие как протеиназы, липазы и нуклеазы, которые разрушают клеточные компоненты, что приводит к смерти клеток [8]. В частности, Ca^{2+} -активируе-

мые кальпаин и катепсины играют существенную роль в нейродегенерации. Ca^{2+} -опосредованные сигнальные пути стимулируют различные факторы транскрипции, такие как NF- κ B, AP-1, CREB, STAT и др., которые регулируют экспрессию белков, участвующих в выживании или гибели клеток [9–11]. Избыток внутриклеточного Ca^{2+} может проникать в ядра нейронов и активировать экспрессию специфических генов в зависимости от пути проникновения. Приток Ca^{2+} через синаптические рецепторы NMDA может индуцировать кальциевую волну, которая распространяется к ядру. Ядерный кальций стимулирует путь CaMKIV/CREB, который индуцирует экспрессию генов, участвующих в регуляции физиологических функций: метаболизма, синаптической передачи и выживания клеток. Напротив, гиперактивация экстрасинаптических NMDA-рецепторов при стрессе или ишемии индуцирует патогенную Ca^{2+} -перегрузку и экспрессию генов, связанных с апоптозом и нейродегенерацией. В этом случае CREB может быть функционально инактивирован быстрым дефосфорилированием и последующей деградацией. Активация этих рецепторов вызывает накопление в ядре гистондеацетилазы HDAC4 и HDAC5, которые репрессируют транскрипцию. Он также стимулирует накопление в ядре проапоптотического фактора транскрипции FOXO3A. Кроме того, перегрузка Ca^{2+} быстро снижает потенциал митохондриальной мембраны [9, 10, 12].

В нашей лаборатории изучена роль Ca^{2+} в клеточно-молекулярных механизмах очагового фототромботического инфаркта (ФТИ) в коре головного мозга крыс и мышей, индуцированного локальным фотодинамическим воздействием [9–11]. Фотодинамический эффект основывался на фотовозбуждении красителя бенгальского розового в окрашенных клетках с последующей генерацией синглетного кислорода и других АФК, окислительным стрессом и, наконец, некрозом или апоптозом клеток. Фотооблучение вызывает локальное окислительное повреждение эндотелия сосудов, с последующей агрегацией тромбоцитов и окклюзией микрососудов.

Уже в течение первых 10 мин после ФТИ отмечается резкое повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле [6, 13]. Выделяют следующие механизмы повышения внутриклеточного Ca^{2+} : проникновение через NMDA-рецепторы, потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, [12, 14]; высвобождение из митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭР); ингибирование Ca^{2+} -АТФ-аз в ЭР и плазматической мембране и нарушение работы Na^+/Ca^{2+} -обменника [7, 12]; долговременная активация белков каналов транзистентного рецепторного по-

тенциала (transient receptor potential, TRP) [12, 15], неселективных катион-зависимых каналов, способных активироваться независимо от деполяризации мембраны. В ядре инсульта гибель клеток наступает немедленно, но в пенумбре многие клетки стремятся защитить себя с помощью различных внутренних механизмов, в том числе путем регулирования обмена Ca^{2+} . Падение внеклеточного Ca^{2+} и Mg^{2+} приводит к активации TRPM7. Снижение внеклеточного Ca^{2+} активирует также кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs), которые активируются во время ишемии благодаря продукции молочной кислоты и протонов. Было показано, что TRPM7, TRPM2 и ASIC способствуют отсроченной гибели клеток центральной нервной системы (ЦНС) при инсульте [15, 16].

Показано, что в условиях ишемии при связывании глутамата рецептор NMDAR2a обеспечивает приток Na^+ и Ca^{2+} в нейроны и высвобождение K^+ , что деполяризует соседние клетки и опосредует распространение эксайтотоксичности. Ca^{2+} -зависимый эксайтотоксический ответ приводит к апоптозу. Наблюдаемая в пенумбре после ФТИ гиперэкспрессия NMDAR2a и глутаматдекарбоксилазы (GAD65/67), отвечающей за превращение *L*-глутамата в гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), была еще одним проапоптотическим эффектом, связанным с метаболизмом глутамата [11]. Этот эффект согласуется с наблюдением, что эмбриональный вариант сплайсинга GAD67 индуцирует апоптоз во взрослом мозге при инсульте [17–19].

Комплекс Ca^{2+} /кальмодулин регулирует многочисленные функции, такие как производство и высвобождение нейротрансмиттеров, ремоделирование цитоскелета, аксональный транспорт, экспрессию генов, выживаемость клеток, обучение и память. Кальмодулин и кальмодулин-зависимые киназы, СаМКII и СаМКIV, широко распространены в мозге млекопитающих. Наши исследования показали, что их уровень в ишемической пенумбре повышался после ФТИ. СаМКII-опосредованная нейротоксичность связана с фосфорилированием и ингибированием некоторых проапоптотических белков, таких как NO-синтаза и GSK-3 β . С другой стороны, СаМКII фосфорилирует глутаматные рецепторы NMDA и AMPA. Это увеличивает приток Ca^{2+} и усугубляет эксайтотоксичность. Ингибиторы СаМКII защищают мозг от ишемического повреждения. СаМКIV ингибирует эксайтотоксичность за счет активации антиапоптотического пути PI3K/Akt и фосфорилирования CREB, который опосредует экспрессию некоторых антиапоптотических генов [11].

Другой Ca^{2+} -зависимый белок кальретикулин регулирует гомеостаз кальция и контролирует сворачивание белка в ЭР. Он модулирует экспрессию и активность p53 и, таким образом, регулирует апоптоз. Показано, что на ранних стадиях инсульта кальретикулин ингибирует апоптоз нейронов в пенумбре [7]. Таким образом, наблюдаемая нами в результате протеомного анализа активация кальретикулина в пенумбре через 4 ч после ФТИ может играть защитную роль [9].

Вместе с тем уровень некоторых сигнальных белков в ФТИ-индуцированной пенумбре существенно снижался. Возможно, массовое проникновение Ca^{2+} в клетки пенумбры при повреждении и отеке мозга вызывает протеолиз и снижение экспрессии Ca^{2+} -зависимых белков. Например, уровень таких Ca^{2+} -зависимых сигнальных белков как фосфолипаза $\text{C}\gamma$ (PLC γ) и протеинкиназа C (PKC), снижался в ФТИ-индуцированной пенумбре. PLC γ при повреждении плазматической мембраны или активации тирозинкиназных рецепторов расщепляет мембранные фосфолипиды и высвобождает инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3), который стимулирует высвобождение Ca^{2+} из ЭР, и диацилглицерол, который активирует PKC [11]. Активируемая ионами Ca^{2+} PKC и ее изоформы α , γ , δ , ϵ , η и μ управляют множеством функций клеток, таких как регуляция гомеостаза, синаптические процессы, пролиферация, апоптоз и реакции мозга на ишемическое повреждение [9, 10]. При изучении экспрессии PKC и ее изоформ с помощью сигнальных и нейрональных микрочипов [9] мы получили противоречивые результаты. Применение нейрональных микрочипов показало более чем 4–6-кратное снижение общего уровня PKC в пенумбре через 1 и 4 ч после ФТИ. Эти результаты согласуются с быстрой потерей общего уровня PKC и ее активности после ишемического повреждения головного мозга вследствие, вероятно, ее деградации. Ингибиторы PKC защищали нейроны от постишемического и эксайтотоксического повреждения, что свидетельствовало об участии PKC в нейродегенерации. Поэтому наблюдавшееся снижение уровня PKC могло соответствовать уменьшению повреждения нервных клеток в пенумбре. Экспрессия ее изоформы PKC β 1 в пенумбре тоже значительно снижалась в 1.65–2 раза в течение всего изученного периода от 1 до 24 ч после ФТИ, но уровень другой изоформы PKC β 2 через 4 ч, напротив, повышался. Однако с помощью сигнальных микрочипов [11] наблюдалось повышение уровня PKC β и PKC α на 34–36 и 31–54% соответственно, через 4–24 ч после ФТИ. Можно предположить, что в ткани пенумбры больше изоформы PKC β 2, чем PKC β 1. Поэтому именно изоформа PKC β 2 вносила решающий вклад в повышение общего уровня PKC β .

Уровни обеих протеинкиназ, РКСа и РКСβ, в мозге крыс также повышались после неполной глобальной ишемии, что авторы связывают с увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Протеинкиназа Сμ (РКСμ, ее также называют РКД) выступает в качестве нейропротектора при ишемии головного мозга. Она фосфорилирует шаперон Hsp27, который подавляет нейрональный апоптоз, опосредованный каскадом ASK1/JNK. Мы наблюдали активацию РКСμ (РКД) в ФТИ-индуцированной пенумбре, что в целом согласуется с литературными данными [9].

Уровни Ca²⁺-связывающего белка S-100 и его β-цепи (S-100β) более чем в 2 раза снижались в пенумбре через 1–24 ч после ФТИ. Белок S-100β специфичен для нервной ткани, в частности для глиальных клеток. В наномолярном диапазоне он демонстрирует нейропротекторные свойства, но при микромолярных концентрациях он может вызвать апоптоз. Появление S-100 и S-100β в сыворотке крови может являться маркером таких нейропатологий, как острый инсульт, нейротравма, опухоль головного мозга и нейродегенеративные заболевания [9–11]. Ca²⁺ также косвенно контролирует экспрессию генов посредством Ca²⁺-зависимого взаимодействия между кальмодулином и S-100 с димерными факторами транскрипции, что предотвращает связывание этих факторов с ДНК [9].

Через 1 и 4 ч после ФТИ уровень белка VILIP1 в пенумбре снижался на 66–71%. Этот Ca²⁺-связывающий белок служит одним из датчиков Ca²⁺ в клетке. Он широко распространен в головном мозге. VILIP1 оказывает влияние на различные внутриклеточные сигнальные каскады, включая системы циклических нуклеотидов и MAP-киназный путь. При увеличении цитозольной концентрации Ca²⁺ VILIP1 связывается с клеточной мембраной и регулирует везикулярный трафик и рециркуляцию рецепторов и ионных каналов. После инсульта VILIP1 высвобождается из поврежденных нервных клеток в спинномозговую жидкость и сыворотку крови, являясь маркером инсульта [9]. Ca²⁺-сенсор синаптоагмин отвечает за слияние синаптических пузырьков с синаптической мембраной и высвобождение нейромедиатора. ФТИ воздействие приводило к подавлению его экспрессии. Это соответствовало ультраструктурным данным о деструкции и дезорганизации синаптических пузырьков. У крыс мРНК синаптоагмина подавлялась во время ранней рециркуляции после фокальной церебральной ишемии [9, 11].

Протеомный анализ показал повышение экспрессии белка-предшественника β-амилоида (β-amyloid precursor protein, APP) в ФТИ-инду-

цированной пенумбре в первые 24 ч после воздействия [11]. Наши результаты согласуются с данными об активации APP после церебральной ишемии, что рассматривается как адаптивный и нейропротекторный ответ [20]. На разных животных моделях ишемического инсульта были показаны защитные эффекты APP или его растворимых фрагментов (APPs). Основные механизмы такого защитного эффекта включают APP-опосредованную регуляцию гомеостаза кальция через NMDA-рецепторы, а также потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC) и внутриклеточные кальциевые депо [12, 20]. Исследования на нокаутных мышах показали, что в условиях ишемии мутации пресенилина-1 (PS1), участвующего в протеолизе APP, приводят к нарушению клеточного кальциевого гомеостаза в нейронах, что связано с высвобождением кальция из ЭР, и тем самым повышают их уязвимость к ишемическому повреждению [20]. Наши исследования также продемонстрировали повышение уровня β-амилоида [9], фрагмента амилоидного пептида (Aβ), стимулирующего приток Ca²⁺ в клетку и обладающего тем самым нейротоксичностью. Механизмы APP-опосредованной нейропротекции через регуляцию уровней клеточного кальция с помощью блокирования кальциевых каналов L-типа (LTCC) и NMDA-рецепторов определяют новые терапевтические мишени в противоишемической терапии [20].

Данные о влиянии фототромботической ишемии на экспрессию связанных с кальцием функциональных белков обобщены на рис. 1. Так как Ca²⁺ является одним из ключевых факторов ишемического повреждения клеток, в ходе многочисленных поисков нейропротекторов были испытаны различные блокаторы Ca²⁺-каналов, а также ингибиторы Ca²⁺-связывающих белков. Однако эффективные нейропротекторы пока не найдены. Даже соединения, которые проявляли положительное действие на экспериментальных животных, не были эффективны в организме человека, либо вызвали нежелательные побочные эффекты [1, 2, 8]. Данные о влиянии Ca²⁺ на процессы выживания и гибели клеток при ишемическом инсульте все еще неполны и местами противоречивы, однако их достаточно для понимания важности этого иона в выживании и смерти клеток. Поэтому для разработки новых подходов к лечению последствий инсульта необходимо глубокое, всестороннее изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропротекции в ткани пенумбры с участием Ca²⁺.

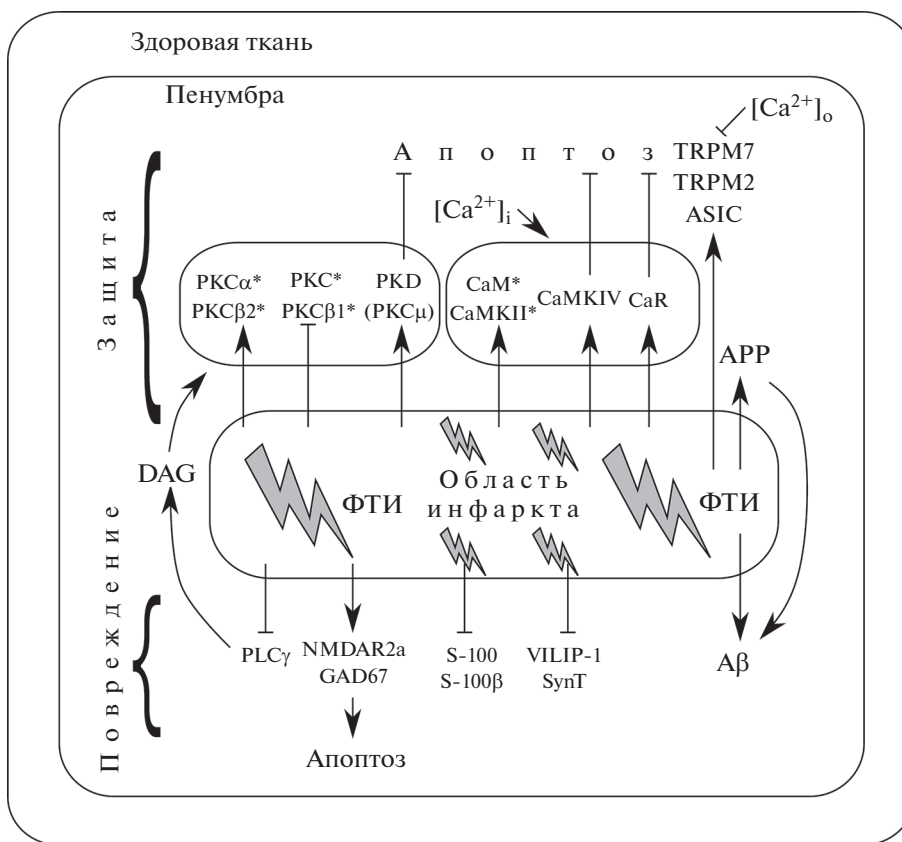


Рис. 1. Защитные и повреждающие эффекты фототромботического инсульта на экспрессию кальций-зависимых белков в пенумбре. Стрелки с острыми концами указывают на стимулирующее воздействие, стрелки с тупыми концами – на подавляющее воздействие. ФТИ – фототромботический инсульт; РКС – протеинкиназа С; СаМ – кальмодулин; СаМК – кальмодулинкиназа; СаR – кальретикулин; APP – белок-прекурсор амилоида; Аβ – β-амилоид; DAG – диацилглицерин; PLC – фосфолипаза С; SynT – синаптогагмин; [Ca²⁺]_o – внеклеточный кальций; [Ca²⁺]_i – внутриклеточный кальций. Звездочками (*) указаны противоречивые данные о защитном/повреждающем характере эффекта. Остальные обозначения см. в тексте.

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ И КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В НЕЙРОНАХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Фотодинамическая терапия – медицинский метод, при котором световое излучение разрушает патологически измененные ткани (например, опухолевые), избирательно окрашенные специальными фотосенсибилизирующими составами. Фотодинамический (ФД) эффект основан на фотохимическом превращении молекул, находящихся в электронно-возбужденном состоянии, в ходе которого происходит образование АФК, среди которых наиболее важен синглетный кислород, способный повреждать только биоструктуры, находящиеся в непосредственной близости от молекул фотосенсибилизатора. В ЦНС опухоли может образовывать только способная к пролиферации глия, но не нейроны. В нашей лаборатории на фундаментальном уровне были изучены различные сигнальные пути, в том числе кальций-зависимые механизмы, участвующие в клеточном

ответе нейронов и глии на ФД воздействие в изолированном абдоминальном механорецепторе речного рака [21, 22], а также совместно с лабораторией А.Ю. Абрамова на первичных культурах нейронов и астроцитов крыс.

Участие кальциевого сигнального пути в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток

Было изучено участие Са²⁺ и РКС в электрофизиологическом ответе нейрона на фотодинамическое повреждение с широко клинически применяемым препаратом Фотосенс (гидроксиалюминия трисульфоталозианин), на изолированном механорецепторе речного рака. Активизация РКС 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТРА) и повышение цитозольной концентрации Са²⁺ с помощью иономицина и тапсигаргина ускоряли ФД-индуцированное прекращение импульсной активности. Ингибирование РКС стау-

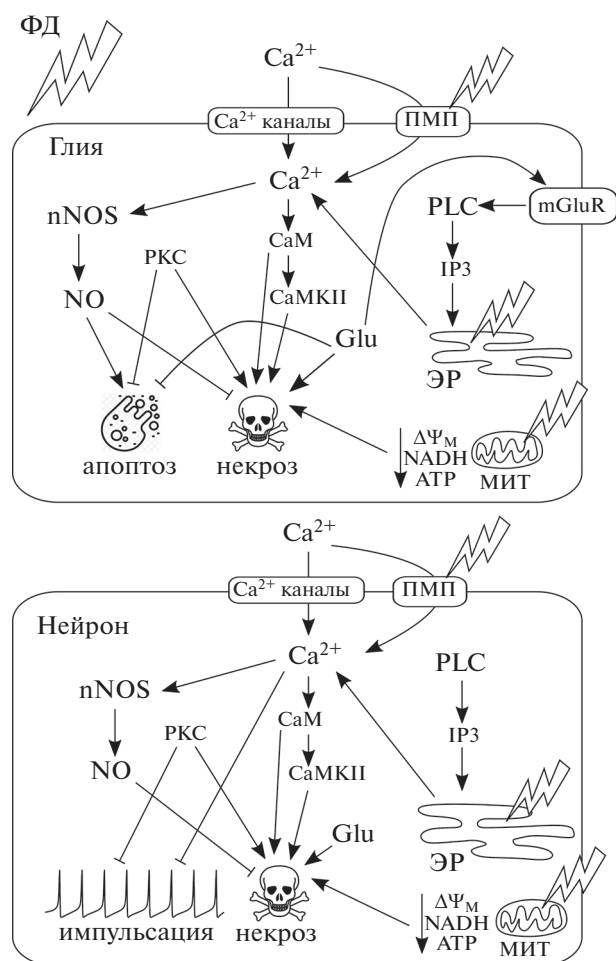


Рис. 2. Участие Ca²⁺-зависимых путей, включая NO- и глутаматную сигнализацию, в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие. Потенциальные мишени ФД воздействия обозначены молниями. Стрелки с острыми концами указывают на стимулирующее воздействие, стрелки с тупыми концами – на подавляющее воздействие. Сокращения: МИТ – митохондрии; ЭР – эндоплазматический ретикулум; СаМ – кальмодулин; СаМКII – кальмодулин-зависимая киназа II; nNOS – нейронная NO-синтаза; IP3 – инозитолтрифосфат; РКC – протеинкиназа C; PLC – фосфолипаза C; ПМП – поры в плазматической мембране; Glu – глутамат; mGluR – метаботропные рецепторы глутамата; ΔΨ_M – митохондриальный потенциал.

ропоринном, гиперацином и хелеритрином, наоборот, продлевало время функциональной активности. Это показывает участие Ca²⁺ и РКC в ФД-индуцированной инактивации и последующей смерти нейрона [23]. ФД воздействие не только приводит к прекращению импульсной активности и некрозу нейронов, но и вызывает некроз и апоптоз, а также пролиферацию окружающей их глии. Было изучено участие в этом эффекте белков кальций-зависимого сигнального пути – кальмодулина, СаМКII и РКC, с помощью их

специфических ингибиторов. Было выяснено, что кальмодулин и СаМКII участвуют в ФД-индуцированном некрозе нейрона и глии, а РКC защищает глию от апоптоза и некроза при ФД воздействии [24].

Кальциевый ответ на фотодинамическое воздействие радахлорина

В модели рецептора растяжения рака (PPP) перспективный фотосенсибилизатор радахлорин накапливался преимущественно в глиальной оболочке и относительно слабо проникал в тело и аксон механорецепторного нейрона (МРН). Фотоактивированный радахлорин сокращал продолжительность импульсации нейрона и индуцировал некроз и апоптоз сателлитной глии при концентрациях 10⁻⁹ М и ниже [25]. ФД эффект радахлорина использовался для выявления воздействия фотоиндуцированного окислительного стресса на кальциевую сигнализацию и перекисное окисление липидов (ПОЛ) в первичных культурах нейронов и астроцитов с помощью прижизненной клеточной визуализации. Облучение в присутствии 200 нМ радахлорина индуцировало кальциевый сигнал в нейронах и астроцитах, который зависит от внутриклеточных кальциевых депо, т.к. может блокироваться истощением ЭР и ингибированием Ca²⁺-АТP-азы ЭР тапсигаргином. Также кальциевый ответ блокировался ингибированием PLC. При этом радахлорин индуцировал ПОЛ в нейронах и астроцитах. Можно предположить, что ФД-индуцированное ПОЛ ведет к активации PLC, что ведет к продукции IP3, который, в свою очередь, вызывает выход Ca²⁺ из ЭР в цитозоль через IP3-рецепторы [26]. Также было обнаружено, что ФД воздействие на клетки с радахлорином приводит к митохондриальной деполаризации как в нейронах, так и в астроцитах, и снижает уровень митохондриального NADH [27].

Кальций-зависимая регуляция продукции оксида азота при фотодинамическом воздействии

Оксид азота (NO) регулирует многие физиологические и патофизиологические процессы, включая нейротрансмиссию, вазодилатацию, стрессовый ответ и др. Он обладает защитным действием при апоптозе и ПОЛ как антиоксидант. Фотодинамическое воздействие с Фотосенсом на модели PPP индуцировало генерацию NO в глиальных клетках и дендритах и в меньшей степени в соме и аксоне нейрона. С помощью модуляторов уровня цитозольного кальция было показано, что Ca²⁺ и NF-κB регулируют генерацию NO в фотосенсибилизированных нейронах и глие. Производство

NO стимулировалось четырехкратным повышением концентрации внеклеточного Ca^{2+} , иономицином и ингибированием Ca^{2+} -АТР-азы ЭР. Блокирование кальциевых каналов плазмалеммы, наоборот, снижало продукцию NO. По-видимому, Ca^{2+} -зависимая нейрональная NO-синтаза участвует, наряду с независимой от Ca^{2+} индуцибельной NO-синтазой, в производстве NO в нейронах и глиальных клетках речного рака [28].

*Действие глутамата
при фотодинамическом воздействии*

Ионотропные глутаматные рецепторы (в частности, NMDA) являются ионными каналами, пропускающими в том числе Ca^{2+} . Метаботропные глутаматные рецепторы участвуют в регуляции потенциал-зависимых кальциевых каналов и IP₃-рецепторов ЭР. Добавление глутамата усиливало пронекротический эффект ФД воздействия на нейроны и глию, однако снижало ФД-индуцированный апоптоз глии. Нейроны рака выделяют N-ацетиласпартилглутамат (NAAG), расщепление которого карбоксипептидазой II (GCP II) во внеклеточном пространстве высвобождает глутамат. NAAG также подавлял ФД-индуцированный апоптоз. Ингибирование же GCP II, соответственно, напротив, стимулировало апоптоз глии. Ингибирование метаботропных рецепторов глутамата, но не NMDA, снижало ФД-индуцированный апоптоз глии. Таким образом, высвобождаемый посредством GCP II глутамат защищает глию от апоптоза, по-видимому, через метаботропные, но не ионотропные рецепторы [29]. Полученные результаты проиллюстрированы на рис. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение кальциевого гомеостаза нейронов и глиальных клеток может быть спровоцировано различными факторами, включая вызванную фототромботическим инсультом ишемию и вызванный фотодинамическим повреждением окислительный стресс. Ионы кальция, в свою очередь, опосредуют различные механизмы клеточного ответа на повреждение, направленные как на защиту, так и на дегенерацию клеток. Центральным звеном этих процессов является концентрация кальция в цитозоле, которая в физиологических условиях поддерживается на низком уровне, а в патологических повышается на несколько порядков и зачастую запускает необратимые сигнальные каскады, ведущие к клеточной смерти. Исследование на модели РРР также подтвердило противоапоптотическую активность глутамата, предположительно связанную с метаботропными рецепторами, и кальций-зависимое повышение

продукции оксида азота в условиях окислительного стресса на физиологическую активность нейрона и выживание нейронов и глиальных клеток. В сочетании с данными, полученными на других моделях, эти результаты дают вклад в фундаментальную базу для дальнейшей разработки методов нейропротекции и терапии опухолей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0852-2020-0028).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campbell B.C.V., De Silva D.A., Macleod M.R., Coutts S.B., Schwamm L.H., Davis S.M., Donnan G.A. 2019. Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 70.
2. Chavez J.C., Hurko O., Barone F.C., Feuerstein G.Z. 2009. Pharmacologic interventions for stroke: Looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch. *Stroke*. **40** (10), e558–e563. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.559914>
3. Ludhiadch A., Sharma R., Muriki A., Munshi A. 2022. Role of calcium homeostasis in ischemic stroke: A review. *CNS Neurol. Disord. – Drug Targets*. **21**, 52–61.
4. Khodorov B.I. 2000. Mechanisms of destabilization of Ca^{2+} -homeostasis of brain neurons caused by toxic glutamate challenge. *Membr. Cell Biol.* **14**, 149–162.
5. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 279–351.
6. Uzdensky A.B. 2018. Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* **9**, 437–451.
7. Узденский А.Б., Демьяненко С.В. 2016. *Фототромботический инсульт: биохимия пенумбры*. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета. 127 с.
8. Radak D., Katsiki N., Resanovic I., Jovanovic A., Sudar-Milovanovic E., Zafirovic S., Mousad S.A., Ise-novic E.R. 2017. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **15**, 115–122.
9. Uzdensky A., Demyanenko S., Fedorenko G., Lapteva T., Fedorenko A. 2017. Protein profile and morphological alterations in penumbra after focal photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4172–4188.
10. Uzdensky A.B. 2019. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*. **24**, 687–702.

11. Demyanenko S., Uzdensky A. 2017. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex. *Mol. Neurobiol.* **54**, 6839–6856.
12. Singh V., Mishra V.N., Chaurasia R.N., Joshi D., Pandey V. 2019. Modes of calcium regulation in ischemic neuron. *Indian J. Clin. Biochem.* **34**, 246–253.
13. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* **17**, 497–504.
14. Wang M., Tan J., Miao Y., Li M., Zhang Q. 2018. Role of Ca²⁺ and ion channels in the regulation of apoptosis under hypoxia. *Histol. Histopathol.* **33**, 237–246.
15. MacDonald J.F., Xiong Z.-G., Jackson M.F. 2006. Paradox of Ca²⁺ signaling, cell death and stroke. *Trends Neurosci.* **29**, 75–81.
16. Aarts M., Iihara K., Wei W.-L., Xiong Z.-G., Arundine M., Cerwinski W., MacDonald J.F., Tymianski M. 2003. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell.* **115**, 863–877.
17. Ginsberg M.D. 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology.* **55**, 363–389.
18. Zhou X., Ding Q., Chen Z., Yun H., Wang H. 2013. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* **288**, 24151–24159.
19. Jaenisch N., Popp A., Guenther M., Schnabel J., Witte O.W., Frahm C. 2014. Pro-apoptotic function of GABA-related transcripts following stroke. *Neurobiol. Dis.* **70**, 237–244.
20. Hefter D., Draguhn A. 2017. APP as a protective factor in acute neuronal insults. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 22. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00022>
21. Uzdensky A.B., Rudkovskii M.V., Fedorenko G.M., Berezhnaya E.V., Ischenko I.A., Kovaleva V.D., Komandirov M.A., Neginskaya M.A., Khaitin A.M., Sharifulina S.A. 2014. Responses of crayfish neurons and glial cells to photodynamic impact: Intracellular signaling, ultrastructural changes, and neuroglial interactions. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **8**, 1–15.
22. Uzdensky A., Berezhnaya E., Khaitin A., Kovaleva V., Komandirov M., Neginskaya M., Rudkovskii M., Sharifulina S. 2015. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways. *Mol. Neurobiol.* **52**, 811–825.
23. Bragin D.E., Kolosov M.S., Uzdensky A.B. 2003. Photodynamic inactivation of isolated crayfish neuron requires protein kinase C, PI 3-kinase and Ca²⁺. *J. Photochem. Photobiol. B.* **70**, 99–105.
24. Uzdensky A., Lobanov A., Bibov M., Petin Y. 2007. Involvement of Ca²⁺- and cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling pathways in photodynamic injury of isolated crayfish neuron and satellite glial cells. *J. Neurosci. Res.* **85**, 860–870.
25. Neginskaya M.A., Berezhnaya E.V., Rudkovskii M.V., Demyanenko S.V., Uzdensky A.B. 2014. Photodynamic effect of Radachlorin on nerve and glial cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**, 357–364.
26. Neginskaya M., Berezhnaya E., Uzdensky A.B., Abramov A.Y. 2018. Reactive oxygen species produced by a photodynamic effect induced calcium signal in neurons and astrocytes. *Mol. Neurobiol.* **55**, 96–102.
27. Berezhnaya E., Neginskaya M., Uzdensky A.B., Abramov A.Y. 2018. Photo-induced oxidative stress impairs mitochondrial metabolism in neurons and astrocytes. *Mol. Neurobiol.* **55**, 90–95.
28. Rodkin S.V., Kovaleva V.D., Berezhnaya E.V., Neginskaya M.A., Uzdensky A.B. 2019. Ca²⁺- and NF-κB-dependent generation of NO in the photosensitized neurons and satellite glial cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **199**, 111603.
29. Rudkovskii M.V., Romanenko N.P., Berezhnaya E.V., Kovaleva V.D., Uzdensky A.B. 2010. Glutamate-mediated protection of crayfish glial cells from PDT-induced apoptosis. *Saratov Fall Meet. 2010 Opt. Technol. Biophys. Med. XII.* **7999**, 79990Q.

Disruption of Calcium Homeostasis and Following Changes of Calcium Signaling in Neurons and Glial Cells in Response to Photodynamic Treatment

V. A. Dzreyan¹, A. M. Khaitin^{1, *}, S. V. Demyanenko¹

¹Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia

*e-mail: andrej.wojt@gmail.com

Photodynamic impact on neurons and glial cells, causing oxidative stress and ischemic damage, is accompanied by disruption of calcium homeostasis and activation or suppression of diverse calcium-dependent mechanism, such as calcium pumps and channels, calcium-dependent signaling or executive proteins, and other signaling systems that interact with calcium pathway, like ion channels, pumps and exchangers, nitric oxide, glutamate, and others. The cascade of processes, initiated by oxidative stress and ischemia in nervous tissue, includes both protective responses and apoptotic or necrotic cell death scenario. This mini-review considers and compares with other publications the data on these processes obtained in our laboratory on the model of photothrombotic stroke on rat brain in vivo and the model of photodynamic treatment on crayfish mechanoreceptor in vitro. These areas of research are dictated by the need to find methods of emergency neuroprotection in ischemic stroke and to improve the accuracy and efficiency of photodynamic therapy of tumors with minimized damage

to benign tissues. A proteomic study of the penumbra zone in the photothrombotic stroke model revealed changes in the expression of a number of calcium-dependent proteins associated with impaired calcium homeostasis and having either a protective or damaging tendency. Inhibitory analysis of the effects of photo-oxidative stress on the mode of action of crayfish stretch receptors revealed the involvement of a number of proteins in the calcium-dependent pathway in neuronal or glial cell death or survival. In this paper, these data are analyzed and summarized to identify promising directions for further research.

Keywords: calcium signaling, glutamate signaling, neuron, glia, photothrombotic stroke, photodynamic therapy

ФИЗИОЛОГИЯ ПЕРЕХВАТОВ РАНВЬЕ ЖИВЫХ МИЕЛИНОВЫХ ВОЛОКОН

© 2022 г. О. С. Сотников^а, С. В. Ревенко^{б, *}

^аИнститут физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бНИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава РФ,
Москва, 121552 Россия

*e-mail: s_revenko@mail.ru

Поступила в редакцию 14.01.2022 г.

После доработки 02.03.2022 г.

Принята к публикации 03.03.2022 г.

Известно, что все фиксированные гистологические препараты не могут претендовать на доказательства динамики морфофизиологических объектов, являясь лишь основой для гипотетической физиологии. В то же время прижизненная микроскопия подвижных и изменяющихся структур может рассматриваться как область клеточной физиологии. Настоящее исследование сфокусировано на раскрытии особенностей этого отдела нейрофизиологии в отношении нервных волокон. Важно отметить, что приготовление препаратов живых изолированных нейронов по Тасаки непременно вызывает определенное механическое воздействие на структуру перехвата, масштаб и значимость которого остаются малоизученными. Альтерации могут заключаться в деформации или исчезновении миелинового конуса перехвата, частично луковицы волокна и в изменении щели перехвата. Такие же изменения возникают и у интактного волокна в течение длительного переживания в растворе Рингера. При электронной микроскопии набухание и увеличение объема нейроплазмы паранодальных петель в гипотонических растворах сопровождаются захватом территории аксоплазмы конуса при сужении аксона. Эти процессы являются обратимыми. По-видимому, они отражают новую форму метаболического трансмембранного нейроглиального обмена глюкозы, аминокислот и других низкомолекулярных соединений, ведущего к образованию смешанной общей цитоплазмы нервного волокна. Потеря четкой границы миелина конуса и частично луковицы зависит от массового расщепления одиночных главных плотных линий и обводнения пучков нодальных петель. Влияние гипертонического раствора мочевины (2 М), не вызывающей набухания цитоплазмы, но денатурирующей белки, вызывает сходные изменения перехвата Ранвье. Следовательно, описанные изменения перехватов Ранвье связаны не с явлением внешней осмотической альтерации, а с влиянием неспецифических физических изменений конформации протеинов аксоплазмы. Проведенные электрофизиологические эксперименты с исследованием перехватов методом фиксации потенциала продемонстрировали соответствие структурных и электрофизиологических изменений натриевой и калиевой проводимостей, а также проводимости утечки. Опыты с модификатором натриевых каналов батрахотоксином не выявили структурных изменений перехватов в течение часа. Рассмотренные данные означают, что исходным механизмом альтерации перехватов, по-видимому, является не изменение белковых структур аксолеммы, а конформационная перестройка белков аксоплазмы.

Ключевые слова: интравитальные перехваты Ранвье, обратимая динамика структуры перехвата, аксоглиальный метаболизм цитоплазмы нервного волокна, твердая и жидкая фракции аксоплазмы, расслоение основных плотных линий миелина

DOI: 10.31857/S0233475522040077

ВВЕДЕНИЕ

Большинство исследователей считают перехваты Ранвье главной физиологически значимой структурой миелиновых волокон [1–6]. Именно перехваты Ранвье обеспечивают высокоскорост-

ное салтаторное проведение нервных импульсов. В дискуссии о значении глии в функции нервной системы, миелиновые нервные волокна, и особенно, их перехваты занимают важное место. Считается, что “именно клетки глии и обес-

печивают существование и функционирование нервных клеток, выполняя опорную, разграничительную, трофическую, защитную и секреторную функции”. “Глиальные клетки являются ключевыми регуляторами функции нервных цепей” [7]. При этом остается неясным, каким образом электрическая активность самого нейрона влияет на состояние и микроструктуру глии, в частности, на перехват Ранвье и насечки Шмидта–Лантермана. Несомненно, изменение морфологии перехватов (глии) сказывается и, возможно, весьма существенно, на функции миелинового волокна.

Морфологическое строение перехватов Ранвье (*nodus*, узел) в статике хорошо известно. Под электронным микроскопом можно выявить их самостоятельные структуры: два терминальных отдела смежных миелиновых оболочек [8] с паранодальными мембранными петлями [9–11] и аксоглиальными септами [5, 6, 12, 13], а также суженный аксон между терминалями миелиновых оболочек [11, 14–16]. По-видимому, только путем экспериментов на перехватах живых миелиновых волокон можно выяснить особенности их морфологической динамики, интегрированную связь между ними, их влияние на функцию нервных волокон и воздействие самой нервной активности на морфологическую динамику перехватов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на седалищных нервах лягушек *Rana temporaria* ($n = 87$), выловленных в водоемах Ленинградской области. Эксперименты проведены в гипотоническом растворе Рингера, в вазелиновом масле, в растворе мочевины (2 М), а также в растворе Рингера с батрахотоксином (20 мкМ). Исследования проводили методом фазового контраста на микроскопе МБИ-13 (ЛОМО, СССР). Кинетику морфологических изменений перехвата Ранвье нерва лягушки регистрировали с помощью видеосъемки. Использована видеокамера DCM310 (Scopetek, Китай).

Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция) и окрашивали тройным контрастом по Рейнольдсу. Ультраструктурные исследования проводили с помощью электронного микроскопа LEO-10 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физические свойства структур перехватов живых волокон в статике. Миелиновая оболочка представляет собой слоистое образование со

свойствами жидкости. Ее форма объясняется тем, что, обладая такими физическими свойствами, как вязкость и адгезия, миелин располагается вокруг осевого цилиндра (аксона), имеющего определенное сходство с сократимым гелем, способным в отличие от жидкости длительное время удерживать цилиндрическую форму, даже протеолитически лишенным наружной опорной соединительной ткани [17]. Обладая в целом стабильной трубчатой формой, живое волокно характеризуется резким сужением в области перехвата Ранвье. В центре перехвата оболочка образует миелиновый конус, достигающий размеров также суженного аксона, причем по обе стороны от этого центра диаметр волокна увеличивается (рис. 1а). Физические свойства миелина являются свидетельством динамики его онтогенетического построения. Поскольку миелин является жидкой субстанцией, ему присуще поверхностное натяжение и свободная поверхностная энергия Гиббса [18]. На концах межперехватного сегмента миелиновой оболочки давление Лапласа (P) стремится сформировать каплевидное утолщение (луковицу перехвата). Известно, что внутри микроскопических капель это давление может быть очень большим, так как оно обратно пропорционально радиусу (R) капли согласно формуле: $P = 2a/R$, где a является поверхностным натяжением. Стремясь сократить площадь своей поверхности, миелин ретрагирует и отдаляет друг от друга миелиновые оболочки смежных шванновских клеток, тем самым формируя щель перехвата (рис. 1а) и позволяя межклеточной жидкости достичь внешней стороны аксона. В результате этого оказывается возможным движение ионов через мембрану, необходимое для электрической активности перехвата Ранвье. Стремясь образовать сферу, миелин одновременно в силу молекулярного внутриклеточного давления сужает аксон в конусе перехвата. Увеличение объема в области луковицы происходит благодаря жидкостным свойствам геля аксоплазмы (рис. 1б). В норме в области щели перехвата обнаруживается уникальное физическое свойство аксоплазмы перехвата, незамеченное в предыдущих исследованиях. Действительно, аксоплазма в норме дифференцируется на два слоя: периферическую жидкую аксоплазму и относительно твердую фазу с низкой степенью дисперсности аксоплазматических белковых микротрубочек. В результате в центре цитоплазмы аксона выделяется относительно твердый, плотный агрегат белковых микротрубочек, который называется аксиальным тяжем. В этом месте экструзия жидкого слоя может

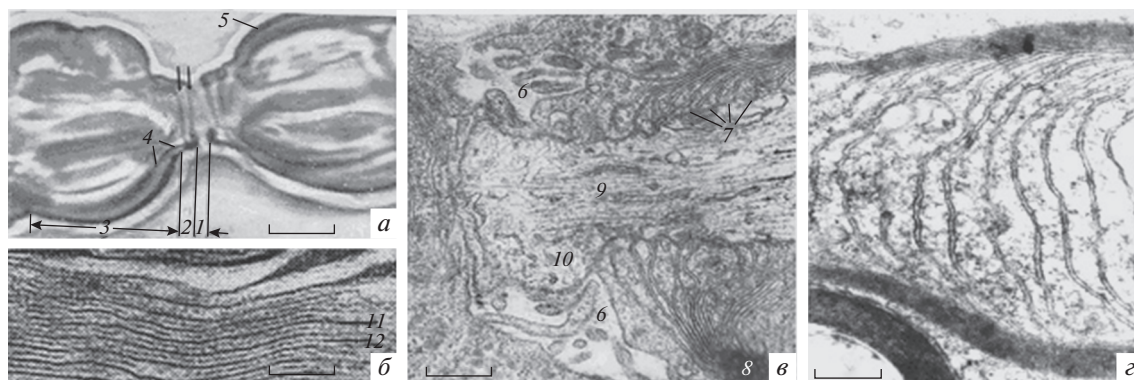


Рис. 1. Структурные элементы условно нормального живого перехвата Ранвье в световом (а) и электронном (б–е) микроскопах.

1 – Межсегментарная щель перехвата; 2 – миелиновый конус; 3 – луковица перехвата; 4 – уменьшение толщины мякотной оболочки в области конуса; 5 – мякотная оболочка; 6 – наружные отростки шванновской клетки; 7 – паранодальные петли и формирующиеся септы; 8 – компактный миелин; 9 – уменьшение дисперсности микротрубочек аксоплазмы; 10 – жидкая фракция экструзии аксоплазмы; 11 – главная линия; 12 – промежуточная линия. а – Прижизненная микроскопия, фазовый контраст. Ph 90, Ок. 20. б–е – Электронная микроскопия, увеличение 78000× (б), 50000× (в), 56000× (г). Масштабные полосы: 3.0 (а), 7.4 (б), 3 (в), 8.5 мкм (г).

превращаться в пресинаптическое выпячивание или в тканевую рецептор [19].

Представленные физические свойства прижизненной статической морфологии дают новые возможности для гипотез о морфофизиологической динамике перехватов. Несмотря на то, что в литературе широко обсуждаются различные гипотетические молекулярные механизмы формирования перехватов Ранвье после сборки “ранних кластеров” Na^+ -каналов аксолеммы, до сих пор нет убедительных данных об их структурной динамике [20].

Варианты ультраструктуры перехватов в статике увеличивают возможность морфофизиологической динамики. Электронная микроскопия выявила особенности структуры живого волокна (рис. 1). Компактный миелин (рис. 1б–1г) в области конуса оказался состоящим из пластин, известных как главные и вспомогательные линии Робертсона [21]. Расщепление главных плотных линий и их последующий контакт с образованием истинных мембран оказались паранодальными глиальными петлями (рис. 1в), которые в трехмерном пространстве представляют собой единый низкоомный электрический проводящий путь между внешней средой и аксоном (рис. 1г). Обращают на себя внимание три ультраструктурные особенности. Во-первых, на разных собственных фотографиях препаратов и иллюстрациях других авторов петли различаются объемом их содержимого. Эти препараты могут представлять собой крупные объемные вытянутые петли с четким раздвоением главных плотных линий ми-

елина, а также малые по объему шаровидные полости. Логично предположить, что указанные структуры могут быть фазами или стадиями некоторого единого динамического процесса, физиологически связанного с водообменом в цитоплазме глиоцита (в частности, с набуханием).

Вторым существенным вариантом глиоплазмы паранодиума является электронно-плотный материал петель (рис. 2). Несмотря на то что электронная микроскопия не считается строгим гистохимическим методом, она способна выявить биологические мембраны с четко определяемой формой, а также белки, которые бывают различной оптической плотности, зависящей от их локальной концентрации [21–23]. С учетом этого обстоятельства следует обратить внимание на характер плотности заполнения паранодального канала белками глиоплазмы (рис. 2). Исследования выявили различную степень концентрации белков в глиальных паранодальных петлях конуса перехвата: от плотного их заполнения до следовых количеств, оцениваемых по маркеру белка в отдельных агрегатах, которые адгезированы, главным образом, на глиальной мембране [24]. Важно отметить, что снижение дисперсности агрегатов должно приводить к просветлению глиоплазмы аналогично тому, что наблюдается при любой агрегации протеинов в растворах. При этом остается неясным, почему при геометрически аккуратной и упорядоченно четкой организации светлых нормальных паранодальных петель в них полностью отсутствует глиоплазма. Они не только лишены гранул и других органелл, но в

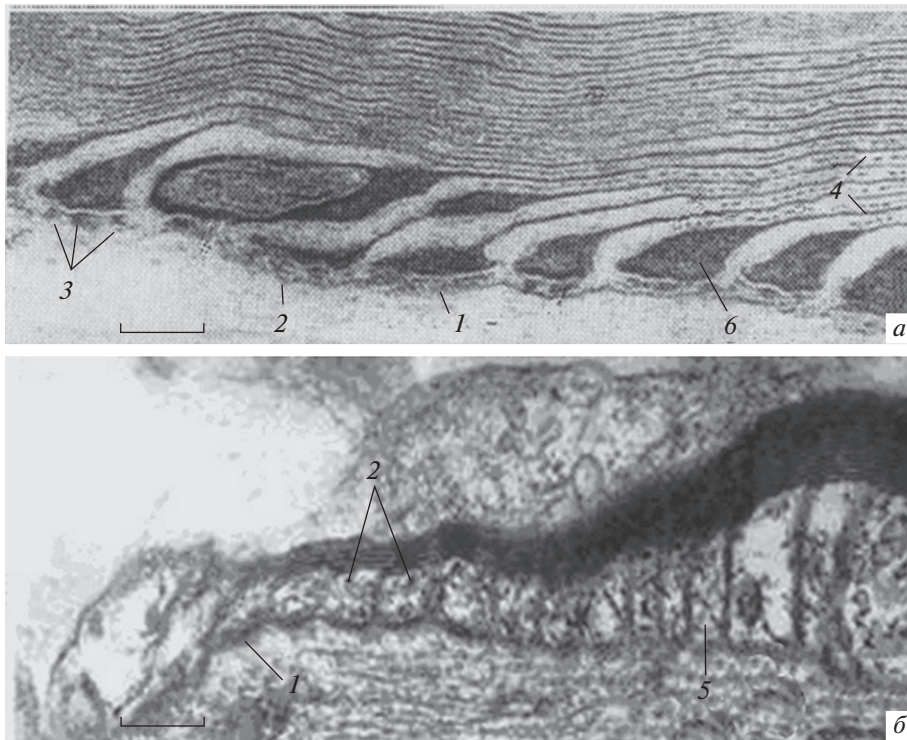


Рис. 2. Характер распределения межмембранных аксоглиальных белков паранодальной зоны (*а, б*). *1* – Межклеточные аксоглиальные щели, полностью заполненные диффузным черным веществом, отмеченным маркером белка; *2* – появление признаков замаскированных септ; *3* – сформированные белковые агрегаты межклеточных септ; *4* – основные плотные линии миелина по Робертсону; *5* – белковые структуры глии; *6* – плотное заполнение паранодальных петель белковым материалом. Электронная микроскопия, увеличение 55000×. Масштабные полоски: 5.7 (*а*) и 6.0 мкм (*б*).

них также обесцвечен маркер цитоплазматического белка.

Наконец, третьим признаком предполагаемой динамики структуры можно считать наличие или отсутствие септированных (лестничных) контактов (мостиков) в аксоглиальной межклеточной щели [24, 25]. Нейроморфологам хорошо известно, что эти контакты в норме нередко не могут быть выделены; при этом они выглядят как непрерывные бесщелевые, плотно импрегнированные контакты в связи с тем, что межклеточная глионейрональная щель полностью заполнена электронно-плотным белковым материалом. Плотность его столь велика, что она закрывает собой как глиальную, так и нейрональную мембраны [9, 15]. Часть препаратов имеет форму с едва заметными межклеточными агрегатами белка (рис. 2*а*), напоминающими септы со светлым окружением и выявляющимися мембранами [11, 12, 26]. Другие исследователи выявили выраженные многочисленные септы на границе паранодальных петель и аксона [12, 27]. В настоящее время изучен подробный состав этих своеобразных межклеточных контактов [5, 6, 25, 28]. При

сравнении вариантов таких препаратов возникает предположение о том, что указанные септы являются не постоянными, а транзиторными структурами, связанными с какими-то парабиотическими альтерациями, способствующими обратимой конформации ранее компактных мембранных протеинов. В работах [26, 29] петли и аксоглиальные контакты на одних рисунках заполнены контрастным гранулярным веществом, а на других можно различить значительное число септированных паранодальных контактов. В этих и других работах исследователи рассматривают септы как постоянные статичные структуры перехватов, барьеры между ионными каналами аксолеммы или перегородками субмембранных каналов [5]. Возможно, это тот же структурный эффект, который маскирует и межклеточную щель между паранодальными петлями и аксолеммой. По-видимому, диаметр аксонального тяжа внутри щели перехвата изменяется мало, однако на разных препаратах у нас и других авторов существенно варьирует объем и форма слоя окружающей его аксоплазмы. В некоторых случаях она напоминает результат экструзии аксоплазмы, “выдавлен-

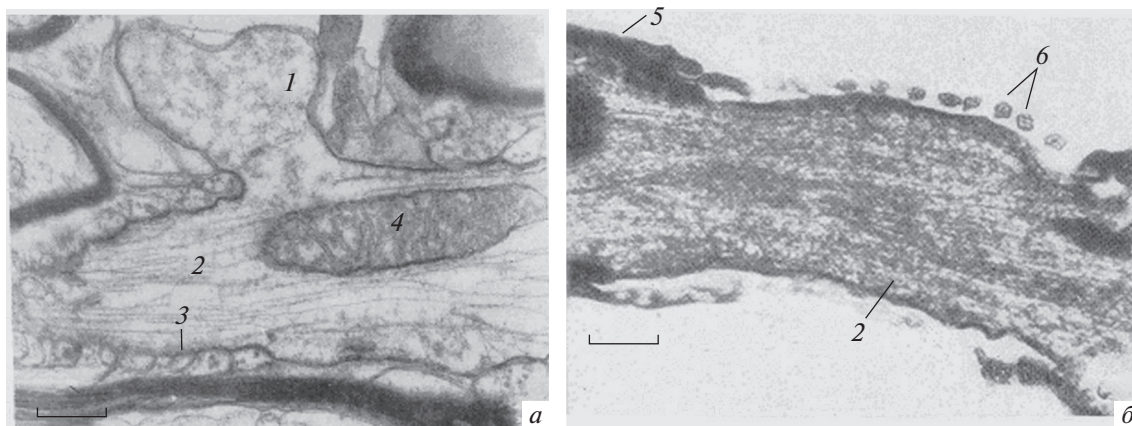


Рис. 3. Варианты ультраструктур интранодальных щелей и структуры аксонов перехватов Ранвье.

a – Экструзия жидкой фракции аксоплазмы, позволяющая предположить ее возможное сдавление в щели перехвата паранодальными петлями; *б* – микротубулярный аксональный тяж при возможном расширении щели перехвата, удлинении безглиальной части аксона и растяжении выступающей жидкой фракции аксоплазмы от центра щели по бокам к сегментам миелина; 1 – хлопьевидный материал жидкой фракции; 2 – микротубулярный аксиальный тяж; 3 – глиальные паранодальные мембранные петли перехвата; 4 – митохондрия; 5 – терминальные отростки шванновской клетки; 6 – периаксональные микроворсинки терминальных отростков глиоцита. Электронная микроскопия, увеличение 40000×. Масштабные полосы: 3.2 (*a*), 3.1 мкм (*б*).

ной” с двух сторон паранодальными петлями смежных миелиновых волокон (рис. 3*a*). Указанное обстоятельство предполагает возможность временного сближения и расхождения миелиновых оболочек, а главное, временных колебаний площади аксолеммы и плотности распределения на ней Na^+ - и K^+ -каналов. При этом не исключены гипотетическое влияние сократимости терминалей соседних миелиновых оболочек и отрыв групп глиальных пластин от компактного комплекса миелина.

Статика электронной микроскопии раскрывает широкие просторы для гипотетических представлений о динамике морфологической физиологии, однако истинная динамика структуры перехватов может быть реализована только при изучении живых нервных волокон и реальной изменчивости перехватов *in vivo*.

Реальная морфологическая физиология изменчивой структуры живых перехватов. Длительные наблюдения за живыми перехватами свидетельствуют о том, что их структура в разные промежутки времени постоянно находится в процессах обратимых изменений. Весьма вероятно, что тщательное и осторожное препарирование одиночных миелиновых волокон по методу Тасаки [30] является неконтролируемым механическим воздействием на нерв, приводящим к определенным микроскопическим изменениям щели перехвата, а нередко и к едва заметному расщеплению компактного слоистого миелина конуса перехвата

(рис. 4). По-видимому, это никак не сказывается на электрических параметрах нервного волокна в условиях контролируемого воздействия на мембрану электрическим током, позволяющим задать необходимый уровень “поддерживаемого” потенциала покоя [31–33]. Поэтому такие картины можно принимать за условную норму, представляющую собой интактный контрольный образец (рис. 1). При этом у многих соседних волокон во время механического препарирования развиваются более значительные изменения, так что их перехваты можно выстроить в ряд возрастающей степени альтерации при физическом воздействии (рис. 4*a–4z*). Начало изменений перехватов живых волокон в световом микроскопе проявляется в виде расширения щели перехвата (рис. 5*a*). Этот процесс сопровождается расщеплением миелина конусов перехвата и их визуальным исчезновением (рис. 5*б*). Отделяющиеся от компактного миелина комплексы ламелл смещаются внутрь аксоплазмы и в сторону от щели перехвата. Они принимают S-образную форму, оставаясь закрепленными у контактов с аксолеммой, но отщепленными от компактного миелина. Адгезия и расщепление ламелл миелина отражают два противоположных процесса: мембранные отщепления мелких слоев и повторное их слияние в новые крупные комплексы, способные организовывать структуру вторичного миелинового конуса такого же диаметра, как аксиальный тяж в щели перехвата (рис. 5*в*). Одновременно в аксоплазме в области луковицы перехвата начинает

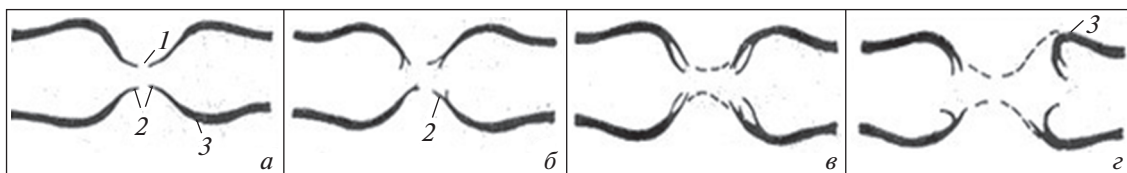


Рис. 4. Схемы вариантов структуры перехватов Ранвье, полученных в результате препарирования по методике Тасаки [30]. *a* – Нормальная структура перехвата; *б* – расслоение миелина в области конусов перехвата; *в* – расширение щели перехвата и потеря видимости перехвата в результате увеличения диссоциации пластин миелина; *г* – перехват с деформированными луковичами и расслоением в них миелина; 1 – щель перехвата; 2 – миелиновые конусы; 3 – луковича перехвата с расслоениями компактного миелина.

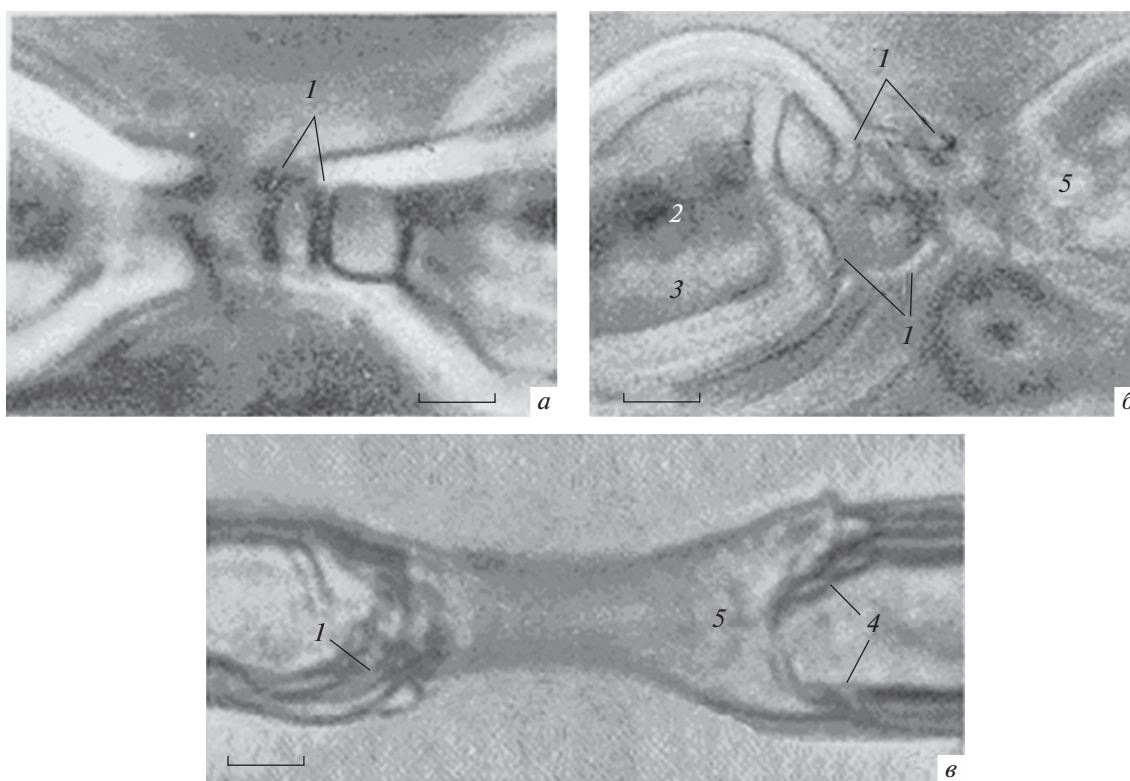


Рис. 5. Морфологические функционально значимые эффекты спонтанной аутоальтерации перехвата в растворе Рингера. *a* – Первичное расщепление компактного миелина перехвата (3 ч 40 мин переживания); *б* – выраженное кольцевидное расслоение компактного миелина конца луковичы, появление признаков диссоциации аксоплазмы на две фракции: жидкую и твердую; *в* – деструктуризация компактного миелина конуса в результате массового расщепления слоев миелина; 1 – комплексы ламелл миелина, отщепленного в области конуса; 2 – аксиальный тяж; 3 – жидкая фракция аксоплазмы; 4 – вторичный миелиновый конус; 5 – снижение контрастности структур в результате массового расщепления ламелл миелина. Прижизненная микроскопия. Об. Ph. 40. Ок. 20. Масштабные полосы: 5,4 (*a*), 5,4 (*б*), 4,1 мкм (*в*).

появляться продольная тень оптически более плотной продольной осевой структуры, равной по диаметру аксиальному тяжу перехвата (рис. 5б), свидетельствуя о диссоциации аксоплазмы на две фракции: на более жидкую периферическую и на белковый агрегированный пучок, являющийся продолжением аксиального тяжа и агрегатов микротрубочек в щели перехвата. На этом этапе паранодальная аксоплазма превращается в ис-

тонченный аксиальный тяж. Важно отметить, что в работах, описывающих цитоскелет аксоплазмы, не отмечена такая явная перестройка цитоскелета микротрубочек [26, 34]. Образование аксонального тяжа при патологии не замечают и другие авторы [35]. Существенно, что его не видел и Ramon у Cajal на своих препаратах [36]. В результате указанных альтераций весь освободившийся объем жидкой аксоплазмы занят набухшими парано-

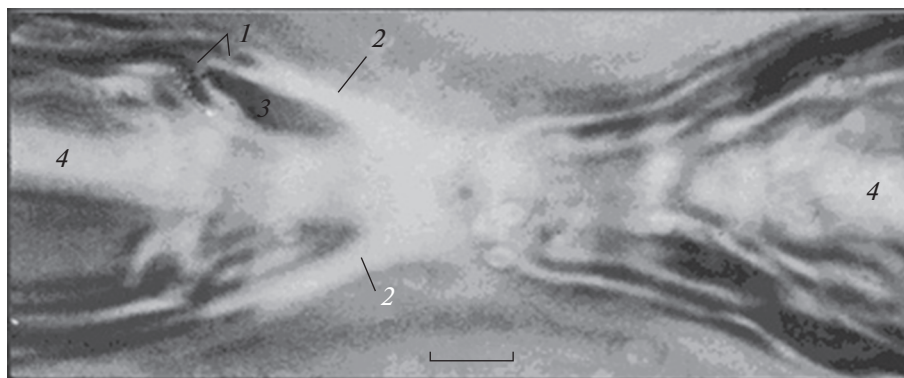


Рис. 6. Перехват Ранвье живого миелинового волокна, переживающего в гипотоническом растворе Рингера в течение 3 ч. 1 – Расслоение компактного миелина; 2 – светорассеяние ламелл компактного миелина при их массовой дезинтеграции; 3 – набухшая полость в области расщепления миелинового конуса, напоминающая цистерну набухшей насечки Шмидта–Лантермана; 4 – формирующийся аксиальный тяж. Прижизненная микроскопия. Об. Ph. 40, Ок. 20. Масштабная полоска: 4,6 мкм.

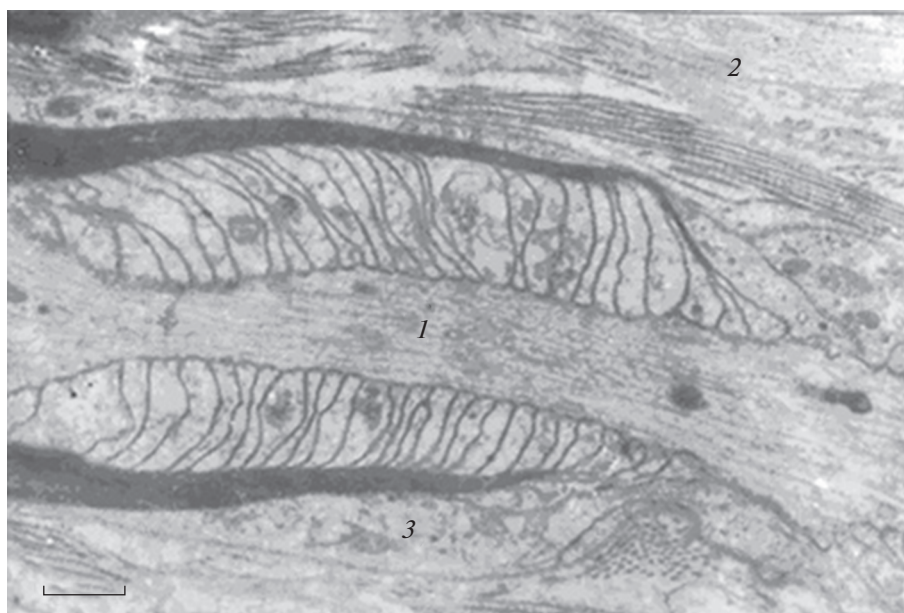


Рис. 7. Удлинение аксона (аксиального тяжа) при оккупации набухшими паранодальными петлями зоны бывшей жидкой фракции аксоплазмы. 1 – Аксиальный тяж; 2 – пучок соединительнотканых волокон эндоневрия; 3 – наружный слой шванновской аксоплазмы. Электронная микроскопия, увеличение 40000×. Масштабная полоска: 5,1 мкм.

дальними петлями. Между слоями расщепившегося миелина всегда наблюдаются обводненные фракции глиоплазмы (рис. 6). Полученные данные ставят вопрос, откуда у глиальных мембранных петель живых волокон берется вода для набухания конусов и лукович, содержащих петли паранодиума.

Новый класс общего метаболизма аксона и глии в морфологической физиологии перехватов. Известно, что набухание любых живых клеток всегда связано с водой внешней среды. Мы выполнили серию опытов с помещением изолирован-

ных нормальных миелиновых волокон лягушки в гипотонический раствор Рингера, разбавленный в 2 раза, надеясь увидеть набухание и увеличение общего диаметра всех частей живого миелинового волокна. В гипотоническом растворе в течение получаса идеальное, нормальное волокно (рис. 6) действительно обнаружило набухание в зоне паранодальных петель миелинового конуса (эта картина подобна набуханию в это же время всех насечек Шмидта–Лантермана). Удивительно, что при этом внешний диаметр всего живого волокна не увеличивался. Естественные оптические коле-

бания размеров живого волокна в среде гипотонического раствора Рингера не превышали $\pm 4\%$.

Под фазово-контрастным микроскопом у экспериментальных перехватов можно наблюдать глиальные, видимо заполненные глиоплазмой, “цистерны”, оккупирующие пространство, ранее занятое жидкой аксоплазмой и сдавленное набухшими паранодальными петлями (рис. 6). Такую альтерацию можно ошибочно принять за удлинение аксона [37] (рис. 7). Действительно, при своем расщеплении и рассеивании одиночные ламеллы теряют оптическую плотность и перестают быть четко видимыми в световом микроскопе (рис. 6); при этом контрастная граница оболочки представляется смещенной в сторону от щели перехвата.

Динамику живого перехвата с расширением щели можно наблюдать с помощью видеосъемки (рис. 8а). При такой съемке сегменты плотного миелина представляются расходящимися, расширяя щель перехвата и увеличивая площадь обнаженного аксиального тяжа. Однако данное представление является обманчивым: оно связано с диффузным рассеиванием контактных ламелл и потерей их видимости. В течение 40 мин отчетливо видно, как развивалось отделение целых ламеллярных комплексов компактного миелина (рис. 8б). При этом усиливалось расщепление компактного миелина и одновременно набухали насечки Шмидта–Лантермана, что принципиально важно. После замены гипотонического раствора на изотонический раствор Рингера структура конуса и измененной миелиновой луковицы перехвата полностью восстанавливалась (рис. 8б). На нескольких препаратах удалось отметить, что размер щели перехвата и всей структуры конусов восстанавливались лучше по сравнению с наблюдениями в начале эксперимента (рис. 8в). Возможность подобного “супернормального” восстановления скорости проведения предполагали Kanda и соавторы [2]. По-видимому, в данных опытах мы впервые наблюдали морфофизиологический эффект этого уникального физического явления. Комплекс живых волокон в гипотонической среде длительное время не набухает и не увеличивается в объеме. При этом нельзя не заметить значительного локального уменьшения объема аксона под паранодальной областью миелиновой оболочки. Диаметр аксона здесь выравнивается с толщиной его безмиелинового отдела, то есть аксиального тяжа в щели перехвата (рис. 6, 7 и 8а). Наряду с указанными альтерациями существенно увеличивается плотность распределения микротрубочек. Стоит подчеркнуть, что уменьшение степени дисперсности

белковых структур и их физическая агрегация высвобождает значительный объем связанной воды. Очевидно, что именно эта вода, уменьшая осмотическое давление аксоплазмы, проникает через мембраны и создает эффект набухания глиоплазмы паранодальных протоков петель перехвата. Такой физический эффект способен предотвратить общее набухание волокна за счет гипотоничности нейроплазмы волокна в перехвате и в насечках. Этот процесс легко обратим (рис. 8б, 8в).

Представлялось важным проверить данный эффект с помощью мочевины с высокой концентрацией (2 М), тоничность раствора которой в несколько раз превышает таковую у раствора Рингера. Как известно, мочевина способна вызывать денатурационные изменения структуры белка [38]. При этом трудно представить, что набухание паранодальных петель конуса и расслоение миелина (типичная реакция “гипотонического типа”) может возникнуть у перехвата под влиянием гипертонического раствора мочевины, во много раз превышающего тоничность раствора Рингера. Вопреки ожиданиям, опыты выявили, что при действии мочевины миелин конусов полностью разрыхлялся. При действии мочевины миелин конусов разрыхлялся. Эти конусы теряли отчетливость и лизировались. Щель перехвата быстро расширялась (рис. 9). В течение десятков секунд происходило расщепление миелина луковиц перехвата. Процесс происходил быстро, однако он следовал тем же этапам, что наблюдали 1) при переживании волокна, 2) после механического воздействия во время препарирования или 3) после действия гипотонического раствора Рингера. Таким образом, данный процесс был неспецифичным. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что они отражают неспецифические конформационные изменения белков (некробиоз). При быстром отмывании перехватов его структуру можно было восстановить (рис. 9а), хотя для этого требовалось продолжительное время (5–10 мин).

В прижизненных исследованиях впервые отмечена новая функция миелиновых волокон: многосторонняя физико-химическая нейроглиальная взаимная деятельность, в которой нейрит и глиоцит выступают как равноправные участники. Они образуют нейрит–глиоцит, отличающийся общей водной фракцией цитоплазмы в функционально важных структурах миелиновых волокон и регулирующий интегральный водный обмен с участием таких ключевых метаболитов, как глюкоза, аминокислоты и другие малые молекулы, а также возбудимость и электропроводимость. По-видимому, эта новая функция является уникальным примером еще неизученного метаболиче-

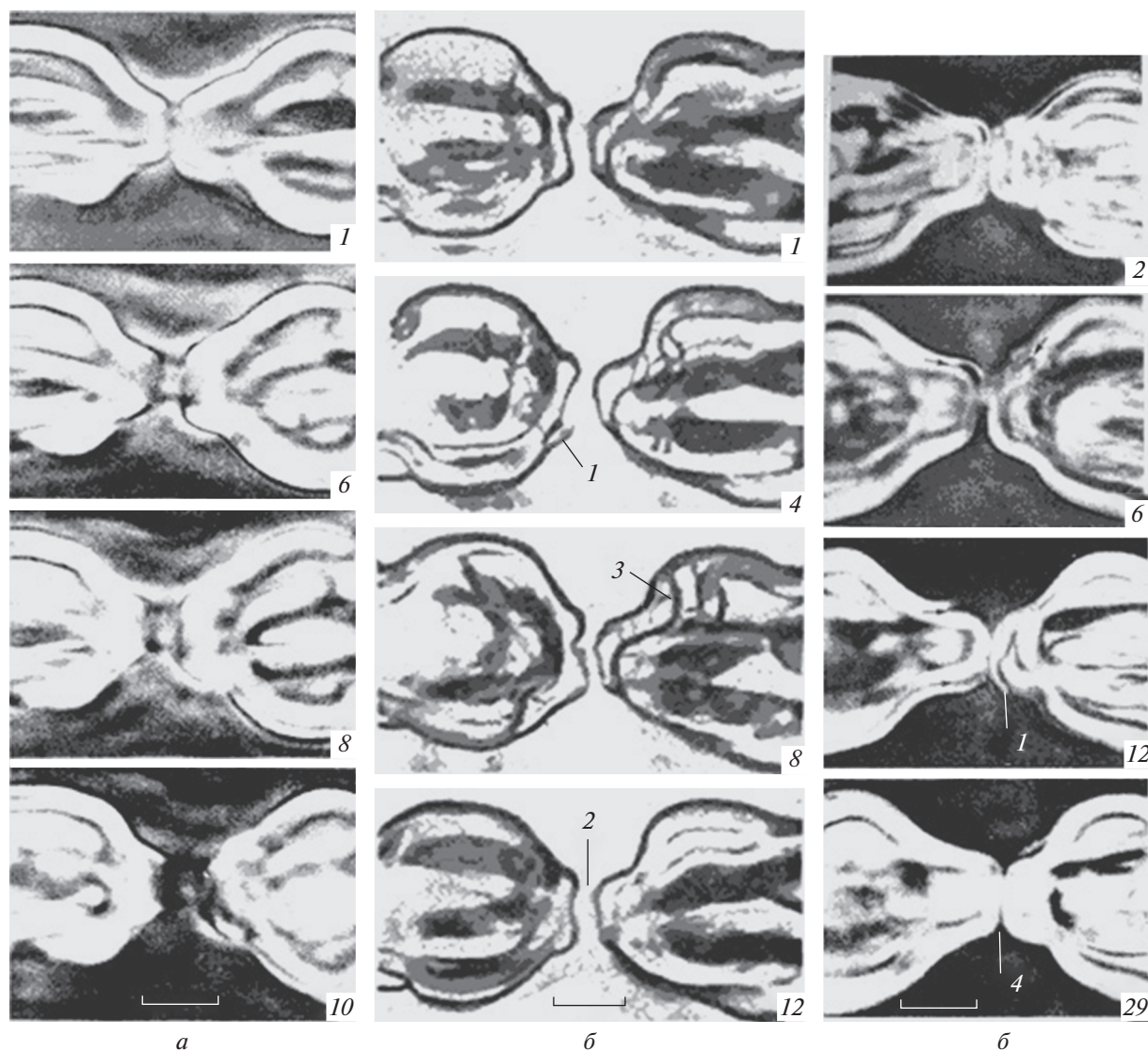


Рис. 8. Обратимая морфофизиологическая динамика перехвата Ранвье живого миелинового нервного волокна при воздействии гипотонического раствора, разбавленного в 2 раза, и его восстановление в растворе Рингера.

a – Динамика кажущегося расширения щели перехвата Ранвье при альтерации миелинового волокна в течение 30 мин; *б* – выраженное расслоение компактного миелина конуса и луковицы (циркулярное распространение групп отщепившихся пучков ламелл). Восстановление структуры в нормальном растворе Рингера через 40 мин; *в* – супервосстановление размеров щели и степени расщепления миелинового конуса; 1 – начало расщепления конуса миелина; 2 – восстановление размеров щели перехвата; 3 – циркулярное расщепление s-образного комплекса ламелл миелина; 4 – супервосстановление щели и компактности ламелл миелина конуса. В правом нижнем углу даны номера кадров цейтраферной съемки. Об. Ph. 40. Ок. 20. Масштабные полосы 3 мкм.

ского протеин-опосредованного нейроглиального межклеточного обмена цитоплазмы, которая существует наряду с обменом через щелевые межклеточные контакты. Таким образом, функционально малозначимые, не патологические, а парабактериальные воздействия на живые миелиновые нервные волокна могут помочь в объединении ряда функциональных процессов в перехватах Ранвье. Действительно, даже незначительное набухание глиоплазмы паранодальных петель должно

уменьшать локальное сопротивление миелиновой оболочки, отрицательно влияя на функцию проведения перехвата. Одновременно этот же процесс увеличивает сопротивление аксоплазмы суженного аксона и крупнодисперсной фракции агрегированных белковых микротрубочек, которая удлиняет аксиальный тяж и изменяет площадь и емкость аксолеммы. При этом сложно оценить изменения плотности распределения натриевых и калиевых каналов аксолеммы. Определенную роль

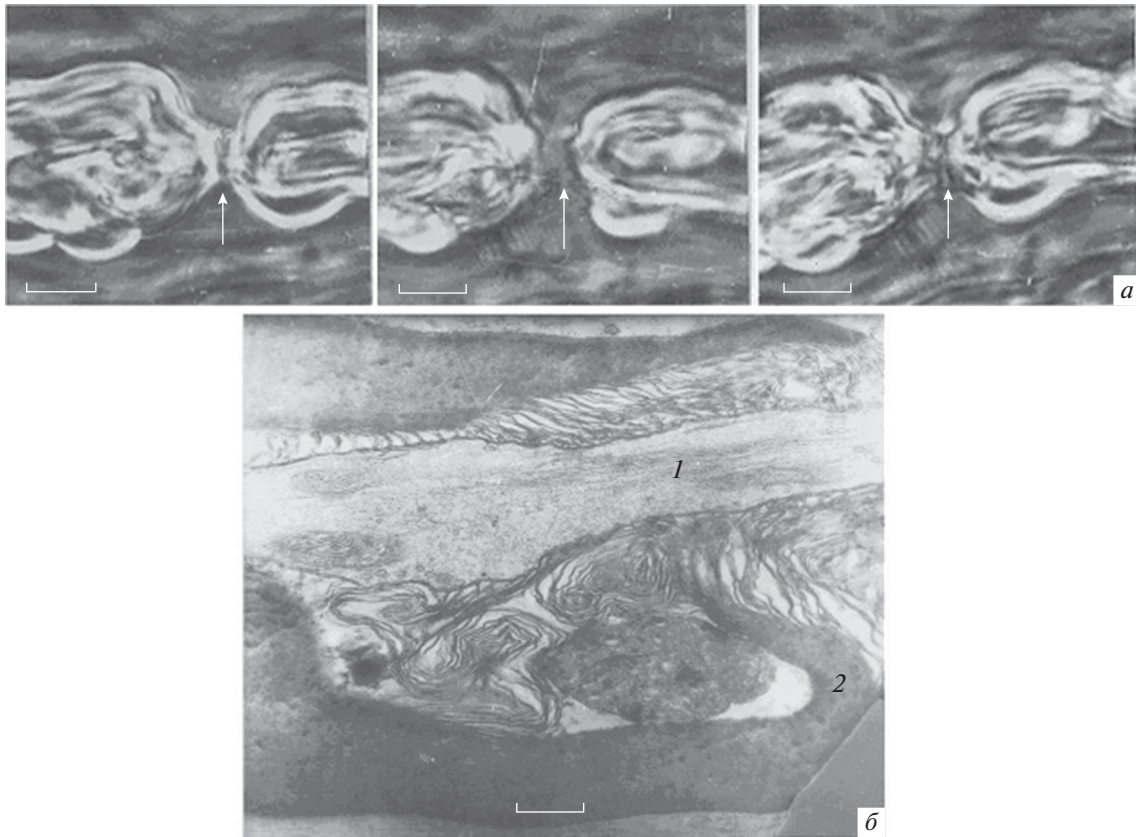


Рис. 9. Действие мочевины (2 М) на перехват Ранье живого волокна и восстановление его структуры после замены на раствор Рингера.

а – Расширение щели перехвата (стрелки) после воздействия мочевины (около 1.5 с) и восстановление ее размера через 6 мин; *б* – разрушение паранодальных петель и сужение аксона до размеров аксиального тяжа через 10 мин после воздействия мочевины; *1* – удлинение аксиального тяжа за счет сужения жидкой аксоплазмы; *2* – расслоение миелина и смещение ламеллярных комплексов в сторону от щели перехвата. *а* – световая микроскопия. Об. 40 Ph, Ок. 20; *б* – электронная микроскопия, увеличение 42000×. Масштабные полоски: 2.8 (*а*), 9.4 мкм (*б*).

при перераспределении этих каналов могут играть белки ТРААК и ТЕК-1, способствующие их перемещению [1, 2]. Моделирование нодальной геометрии показало, что увеличение видимой длины аксона в перехвате может замедлить проведение нервных импульсов [39]. В целом, как показано выше, вся морфологическая физиология в перехвате является интегрированной, так что геометрия аксона не может рассматриваться отдельно. Набухание паранодальных петель зависит от денатурации белка. Важно, что увеличение объема петель происходит одновременно с истончением и удлинением аксиального тяжа микротрубочек и с наблюдаемым под микроскопом расширением щели перехвата. Анализ процессов возбуждения и проведения перехвата может быть успешным только при интеграции синхронных исследований морфологических и физиологических процессов на одном и том же живом объекте.

Сравнительный анализ морфологических и физиологических характеристик перехватов Ранье. При одновременном сопоставлении прижизненных морфологических и физиологических свойств удается выявить определенное соответствие между динамикой структурных процессов и снижением максимальных значений натриевой и калиевой проводимости аксоплазмы. С этой целью мы провели исследование перехватов с помощью метода фиксации потенциала, в котором попытались выяснить, каким образом динамика строения перехватов, обусловленная механической травмой в процессе препарирования, влияет на натриевую и калиевую проводимости, а также на проводимость утечки [31]. Структурные и электрофизиологические характеристики сопоставляли прижизненно и одновременно на одних и тех же миелиновых волокнах *Rana ridibunda* с помощью фазово-контрастной микроскопии и регистрации ионных токов перехвата Ранье.

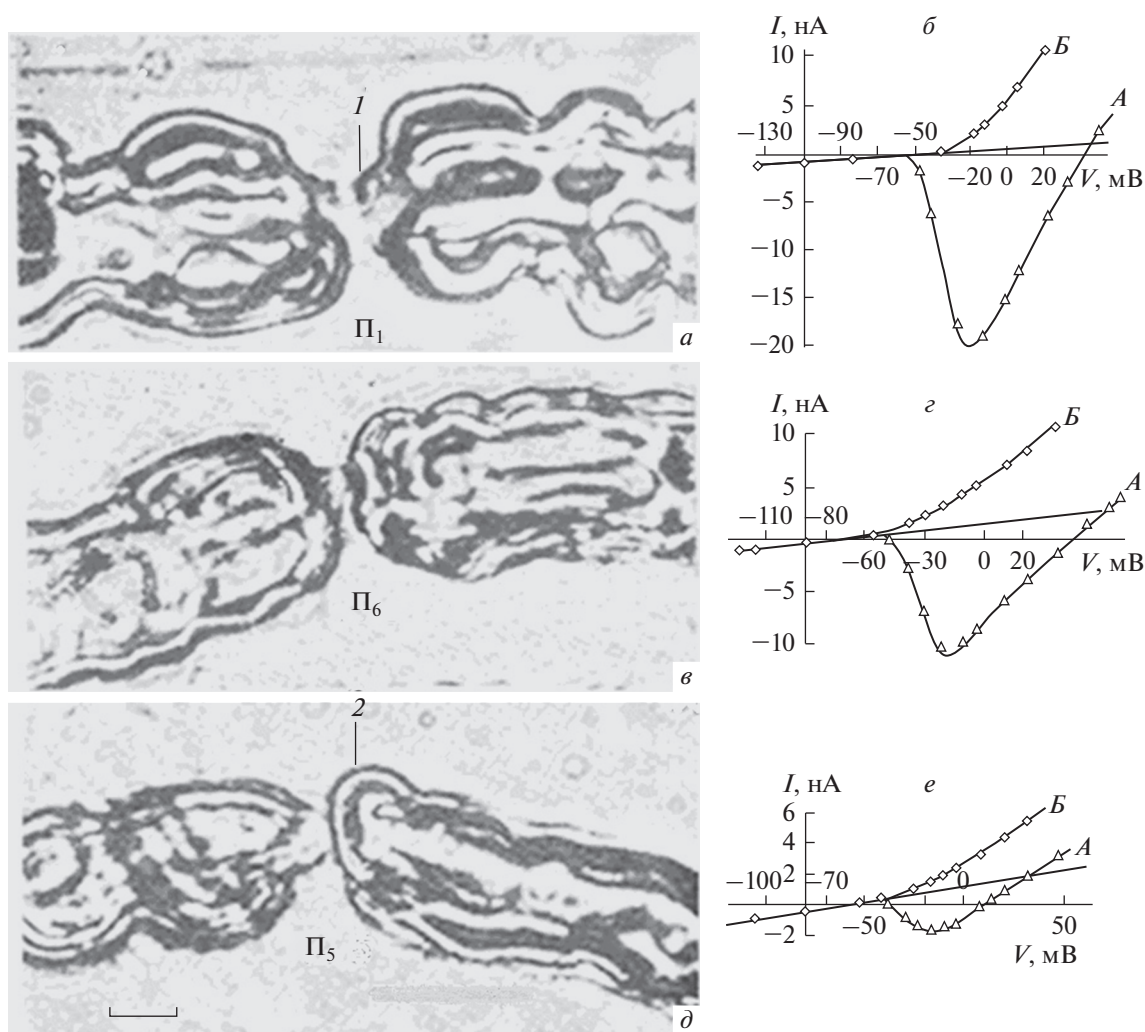


Рис. 10. Микрофотоснимки (*a, в, д*) и вольт-амперные характеристики (*б, з, е*) изолированных перехватов Ранвье. *A* – Пиковые значения ионного тока ($I_{Na} + I_L$); *B* – стационарное значение ионного тока ($I_K + I_L$). Кривые с треугольниками – пиковые значения ионного тока ($I_{Na} + I_L$), кривые с кружками – стационарные значения ионного тока ($I_K + I_L$). I_L – ток утечки; *I* – конус перехвата; *2* – деформированная луковица перехвата. Π_1, Π_5, Π_6 – номера опытов. Диаметр волокон: *a* – 11; *в* – 10; *д* – 7 мкм. Об. 40, Ок. 20. Масштабные полосы: 3 (*a, в*), 2,8 мкм (*д*).

На рис. 10 (справа) показаны вольт-амперные характеристики для натриевых и калиевых токов, а также для тока утечки. Соответствующие им перехваты Ранвье приведены на рис. 10 (слева). Электрофизиологические параметры даны в табл. 1. Оказалось, что перехваты Π_1 и Π_6 , отличавшиеся условно нормальной структурой, обладали удельными проводимостями мембраны g_{Na}/g_L и g_K/g_L в 11 и 17 раз больше (соответственно), чем перехват Π_5 с максимальными морфологическими изменениями. Из табл. 1 видно, что перехваты с потерей миелиновых конусов и частичным расщеплением пластин миелина луковицы волокна не генерировали потенциал действия (ПД). Выявлено четкое влияние морфофизиологических процессов перехвата на ионные

токи аксолеммы. На рис. 10 видны параллельные изменения пиковых значений натриевого тока и стационарного уровня калиевого тока индивидуальных перехватов Ранвье живых волокон. При этом перехваты Π_1 и Π_6 оказались способными генерировать ПД. Результаты экспериментов выявили несомненное соответствие между степенью морфологических изменений паранодальной области перехвата (обводнение и агрегация белка петель глиоплазмы, увеличение которых сдавливает аксоплазму, вызывая уменьшение ее диаметра и увеличение ее сопротивления) и величиной изменений его электрофизиологических характеристик. Кроме того, увеличивается и длина аксиального тяжа, не защищенного компактной миелиновой оболочкой. При незначительной ло-

Таблица 1. Физиологические и морфологические характеристики перехватов Ранвье

Волокна	g_{Na}/g_L	g_K/g_L	g_{Na}/g_K	g_L , нМо	ПД	Морфологическая характеристика перехвата
“Стандартное” [6, 8]	30	5.2	5.8	25	—	—
П ₁	31	19	1.6	12	Есть	Изменение конусов
П ₆	13	7	1.9	22	Есть	Изменение конусов
П ₂	8	5	1.6	24	Нет	Полное исчезновение конусов
П ₅	2.5	2.7	0.9	32	Нет	Повреждение лукович

кальной альтерации еще сохраняются миелиновые конусы. Повреждения лукович миелина даже с одной стороны перехвата соответствуют выраженному уменьшению натриевой и калиевой проводимости мембраны и сопровождаются элиминацией ПД (рис. 10).

Выше мы проанализировали влияние структурных изменений перехвата Ранвье на его электрофизиологические характеристики, однако нельзя исключить и обратного процесса, при котором изменения электрической активности перехвата влияют на его структуру. Для проверки такой возможности мы исследовали действие батрахотоксина, который радикально изменяет натриевые каналы перехватов, что ведет к персистентной деполяризации мембраны и к необратимой потере возбудимости [40–42]. Чтобы минимизировать механическое воздействие на перехват при выделении одиночного волокна, эксперименты проводили на живых и хорошо видимых перехватах, защищенных от механической травмы соседними нервными волокнами (рис. 11). Фотосъемка таких перехватов доказала отсутствие заметных изменений перехватов Ранвье в

течение 1.5 ч их переживания в растворе батрахотоксина (20 мкМ). Представляется возможным, что при механической травме стартовые неспецифические изменения перехватов начинаются не с модификации ионных каналов возбудимой мембраны, а с физиологических конформационных паранекротических альтераций белка аксоплазмы, вызывающих освобождение связанной воды протеинов аксоплазмы и обводнение ею глиоплазмы набухающих паранодальных петель конусов миелина.

Разумеется, обсуждаемые предположения нуждаются в дополнительных исследованиях. В частности, остаются малопонятными роль и механизм появления аксоглиальных септированных контактов перехвата, отмеченных многими авторами [16], а также влияние нейрональной активности на структурную перестройку миелиновых волокон. В приведенных материалах мы попытались на живых нервных волокнах выявить ранние (пока еще непатологические) структурные и парабактериальные обратимые альтерации, а также их реверсирование. Были обнаружены взаимосвязанные, внутриволоконные, метаболические и

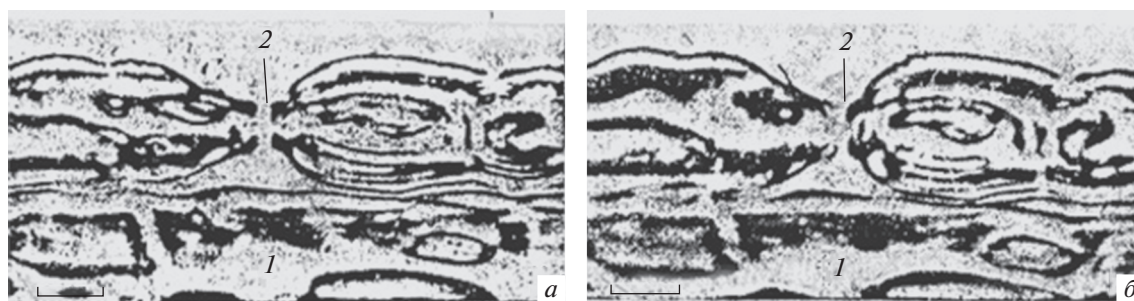


Рис. 11. Перехват Ранвье, инкубированный в присутствии батрахотоксина (20 мкМ) в течение 1.5 ч. *а* – Перехват до введения батрахотоксина; *б* – тот же перехват через 60 мин после экспозиции батрахотоксина; *1* – соседнее волокно, предохраняющее экспериментальный перехват от чрезмерного механического воздействия; *2* – неизменная щель перехвата. Прижизненная микроскопия. Об. 40 Ph, Ок. 20. Масштабные полоски: 2.7 мкм.

нейрит-глиальные процессы, которые, по-видимому, неразрывно связаны и с другими морфофизиологическими событиями, которые требуют отдельного анализа. Важно подчеркнуть, что изменения морфофизиологических свойств перехватов Ранвье связано с впервые выявленным интенсивным глиально-нейрональным взаимодействием, сопровождающимся разделением аксоплазмы на две фракции.

Предметом будущих морфологических исследований должны стать процесс набухания насечек Шмидта–Лантермана и появление белковых агрегатов (глиоаксональных септ) в перехватах Ранвье, играющих особую электрофизиологическую роль в сальтаторном проведении нервных импульсов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brohawn S.G., Wang W., Handler A., Campbell E.B., Schwarz J.R., MacKinnon R. 2019. The mechanosensitive ion channel TRAAK is localized to the mammalian node of Ranvier. *Elife*. **8**, e50403.
2. Kanda H., Ling J., Tonomura S., Noguchi K., Matalon S., Gu J.G. 2019. TREK-1 and TRAAK are principal K⁺ channels at the nodes of Ranvier for rapid action potential conduction on mammalian myelinated afferent nerves. *Neuron*. **104** (5), 960–971.
3. Cohen C.C.H., Popovic M.A., Klooster J., Weil M.T., Möbius W., Nave K.A., Kole M.H.P. 2020. Saltatory conduction along myelinated axons involves a periaxonal nanocircuit. *Cell*. **180** (2), 311–322.
4. Patel A., Rumsey J.W., Lorange C., Long C.J., Lee B., Tetard L., Lambert S., Hickman J.J. 2020. Myelination and node of ranvier formation in a human motoneuron-schwann cell serum-free coculture. *ACS Chem. Neurosci.* **11** (17), 2615–2623.
5. Zhang Y., Yuen S., Peles E., Salzer J.L. 2020. Accumulation of neurofascin at nodes of Ranvier is regulated by a paranodal switch. *J. Neurosci.* **40** (30), 5709–5723.
6. Rasband M.N., Peles E. 2021. Mechanisms of node of Ranvier assembly. *Nat. Rev. Neurosci.* **22** (1), 7–20.
7. Хачатрян А.А., Ерофеева Л.М., Кутвицкая С.А. 2014. Роль нейроглии в функционировании нервной системы. *Усп. совр. естеств.* **6**, 66–70.
8. Robertson J.D. 1959. Preliminary observations on the ultrastructure of nodes of Ranvier. *Z. Zellforsch.* **50**, 553–560.
9. Phillips D.D., Hibbs R.G., Ellison J.P., Shapiro H. 1972. An electron microscopic study of central and peripheral nodes of Ranvier. *J. Anat.* **111** (Pt 2), 229–238.
10. Rasband M.N. 2013. Cytoskeleton: Axons earn their stripes. *Curr. Biol.* **23** (5), 197–198.
11. Ghosh A., Sherman D.L., Brophy P.J. 2018. The axonal cytoskeleton and the assembly of nodes of Ranvier. *Neuroscientist*. **24** (2), 104–110.
12. Hirano A., Dembitzer H.M. 1967. A structural analysis of the myelin sheath in the central nervous system. *J. Cell. Biol.* **34** (2), 555–567.
13. Nualart-Marti A., Solsona C., Fields R.D. 2013. Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim. Biophys. Acta*. **1828** (1), 69–78.
14. Peters A. 1960. The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**, 431–446.
15. Metzuzals J. 1965. Ultrastructure of the nodes of Ranvier and their surrounding structures in the central nervous system. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **65**, 719–759.
16. Suminaite D., Lyons D.A., Livesey M.R. 2019. Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia*. **67** (11), 2050–2062.
17. Sotnikov O.S. 2016. *Properties of living axoplasm*. N.Y.: NOVA. 138 p.
18. Гиббс Дж.В. 1982. *Термодинамика. Статистическая механика*. М.: Наука. 584 с.
19. Сотников О.С., Скибо Г.Г., Кулешова Т.Ф. 1984. Ультраструктурные данные о синаптической, рецепторной и проводящей функциях перехватов Ранвье. *Нейрофизиология*. **16** (4), 546–549.
20. Malavasi E.L., Ghosh A., Booth D.G., Zagnoni M., Sherman D.L., Brophy P.J. 2021. Dynamic early clusters of nodal proteins contribute to node of Ranvier assembly during myelination of peripheral neurons. *Elife*. **10**, e68089.
21. Робертсон Дж. 1963. Молекулярная биология клеточных мембран. В кн.: *Молекулярная биология*. М.: Изд-во иностр. лит., с. 102–151.
22. Mercer E.H. 1959. An electron microscopic study of *Atoeba proteus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **150** (939), 216–232.
23. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. 1994. *Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: методическое руководство*. СПб.: Наука. 400 с.
24. Jarjour A.A., Velichkova A.N., Boyd A., Lord K.M., Torsney C., Henderson D.J., French-Constant C. 2020. The formation of paranodal spirals at the ends of CNS myelin sheaths requires the planar polarity protein Vangl2. *Glia*. **68** (9), 1840–1858.
25. Livingston R.B., Pfenniger K., Moor H., Akert K. 1973. Specialized paranodal and interparanodal glial-axonal

- junctions in the peripheral and central nervous system: A freeze-etching study. *Brain. Res.* **58** (1), 1–24.
26. Brivio V., Faivre-Sarrailh C., Peles E., Sherman D.L., Brophy P.J. 2017. Assembly of CNS nodes of Ranvier in myelinated nerves is promoted by the axon cytoskeleton. *Curr. Biol.* **27** (7), 1068–1073.
 27. Laatsch R.H., Cowan W.M. 1966. A structural specialization at nodes of Ranvier in the central nervous system. *Nature.* **210** (5037), 757–758.
 28. Rasband M.N. 2006. Neuron-glia interactions at the node of Ranvier. *Results Probl. Cell Differ.* **43**, 129–149.
 29. Peters A. 1966. The node of Ranvier in the central nervous system. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **51** (3), 229–236.
 30. Тасаки И. 1971. *Нервное возбуждение. Макромолекулярный подход.* М.: Мир. 219 с.
 31. Dodge F.A., Frankenhaeuser B. 1958. Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage clamp conditions. *J. Physiol.* **143** (1), 76–90.
 32. Mueller-Mohnssen H. 1961. Structural changes in Ranvier's nodes during electrical tone and during functional destruction. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **54**, 468–498.
 33. Сотников О.С. 1973. Дискуссионные вопросы об особых свойствах аксона на концах миелиновых сегментов. *Архив АГЭ.* **64** (3), 95–101.
 34. D'Este E., Kamin D., Balzarotti F., Hell S.W. 2017. Ultrastructural anatomy of nodes of Ranvier in the peripheral nervous system as revealed by STED microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114** (2), 191–199.
 35. Djannatian M., Timmler S., Arends M., Luckner M., Weil M.T., Alexopoulos I., Snaidero N., Schmid B., Misgeld T., Möbius W., Schifferer M., Peles E., Simons M. 2019. Two adhesive systems cooperatively regulate axon ensheathment and myelin growth in the CNS. *Nat. Commun.* **10** (1), 4794.
 36. Ramón y Cajal S. 1984. *The neuron and the glial cell.* Springfield, IL: Charles C. Thomas. 355 p.
 37. Vallat J.M., Magy L., Corcia P., Boulesteix J.M., Uncini A., Mathis S. 2020. Ultrastructural lesions of nodo-paranodopathies in peripheral neuropathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79** (3), 247–255.
 38. Guckeisen T., Hosseinpour S., Peukert W. 2021. Effect of pH and urea on the proteins secondary structure at the water/air interface and in solution. *J. Coll. Interface Sci.* **590**, 38–49.
 39. Arancibia-Cárcamo I.L., Ford M. C., Cossell L., Ishida K., Tohyama K., Attwell D. 2017. Node of Ranvier length as a potential regulator of myelinated axon conduction speed. *Elife.* **6**, e23329.
 40. Khodorov B.I., Peganov E.M., Revenko S.V., Shishkova L.D. 1975. Sodium currents in voltage clamped nerve fiber of frog under the combined action of batrachotoxin and procaine. *Brain Res.* **84** (3), 541–546.
 41. Ревенко С.В., Ходоров Б.И. 1977. Влияние батрахотоксина на селективность натриевых каналов в мембране миелинизированного нервного волокна. *Нейрофизиология.* **9** (3), 313–316.
 42. Khodorov B.I., Revenko S.V. 1979. Further analysis of the mechanisms of action of batrachotoxin on the membrane of myelinated nerve. *Neuroscience.* **4** (9), 1315–1330.

Physiology of Ranvier Nodes in Living Myelinated Fibers

O. S. Sotnikov¹, S. V. Revenko², *

¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Research Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia*

*e-mail: s_revenko@mail.ru

Fixed histological preparations cannot reveal dynamics of morphophysiological objects being merely the basis for hypothetic physiology. At the same time, vital microscopy of mobile and changing structures can be considered as a field of cell physiology. The present study is focused on revealing the features of this branch of neurophysiology in relation to nerve fibers. Importantly, preparation of live neurons isolated by the method of Tasaki inevitably produces mechanical alterations in Ranvier node structure of mostly unknown scale and importance. These alterations can be manifested by deformation or entire elimination of the cone-shaped myelinated regions of the node and/or fiber bulb, as well as by changes in the nodal gap. Similar alterations can emerge in the intact nerve fiber during a long-term survival in Ringer solution. According to electron microscopy, narrowing of the axon in hypotonic solutions is accompanied by swelling and increase of volume of neuroplasm in the paranodal loops in parallel with its expansion into the cone space previously occupied by the axoplasm. These processes are reversible, and they probably reflect a novel form of metabolic transmembrane neuron–glial exchange of glucose, amino acids, and other low-molecular weight compounds leading to the formation of integrated cytoplasm of the nerve fiber. The loss of clear boundary of the cone-shaped myelinated regions in the node and/or fiber bulb depends on a large-scale exfoliation of individual major dense lines of Robertson and flooding of the series of paranodal loops. Hypertonic (2 M) solution of urea, which cannot provoke swelling of the cytoplasm but can denature the proteins, induces similar alterations in

the nodes of Ranvier. Consequently, the described alterations are not associated with external osmotic changes but with the influence of nonspecific conformational rearrangements in axoplasmic proteins. Voltage clamp experiments revealed association between alterations in nodal structure and changes in sodium, potassium, and leakage conductivities. Exposure of Ranvier nodes to sodium channel modifier batrachotoxin revealed no structural alterations within 1 h. Thus, the mechanism triggering the changes in Ranvier nodes seems to be based not on the structural alterations of axolemmal proteins but on the conformational rearrangements of axoplasmic proteins.

Keywords: intravital Ranvier nodes, nodal reversible structural dynamics, axoglial metabolism of fiber cytoplasm, axoplasmic solid and fluid fractions, exfoliation of major dense lines

УДК 577.352.4

ИЗМЕНЕНИЯ pH В МАТРИКСЕ МИТОХОНДРИЙ И ЦИТОЗОЛЕ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЛУТАМАТОМ ДИСРЕГУЛЯЦИИ Ca²⁺-ГОМЕОСТАЗА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА КРЫСЫ

© 2022 г. А. М. Сурин^{a, b, *}, Л. Р. Горбачева^{c, d}, И. Г. Савинкова^c,
Р. Р. Шарипов^a, В. Г. Пинелис^b

^aНИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

^b«НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, 119991 Россия

^cРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, 117513 Россия

^dМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, 119234 Россия

*e-mail: surin_am@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2022 г.

После доработки 21.03.2022 г.

Принята к публикации 27.03.2022 г.

Воздействие высоких концентраций глутамата (Glu) на первичные культуры нейронов из мозга крысы приводит к сильной деполяризации митохондрий, развивающейся синхронно со вторичным подъемом внутриклеточной концентрации свободного Ca²⁺ (отсроченной кальциевой дисрегуляцией, ОКД). В данной работе одновременно с измерениями внутриклеточной концентрации свободного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) были измерены pH в матриксе митохондрий (pH_m) и цитозоле (pH_c) нейронов, при действии токсической дозы Glu (100 мкМ). Для этого в первичных культурах из гиппокампа новорожденных крыс была достигнута экспрессия pH-чувствительного зеленого белка mtYFP в митохондриях и pH-чувствительного красного белка mKate в цитозоле. Полученную нейрональную культуру нагружали Ca²⁺-индикатором Fura-FF и в тех нейронах, которые экспрессировали совместно mtYFP и mKate, одновременно измеряли [Ca²⁺]_i, pH_m и pH_c. Обнаружено, что во время первой фазы Ca²⁺-ответа на Glu, когда наблюдается частичная деполяризация митохондрий, происходит увеличение градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолом (ΔpH), которое компенсирует снижение электрического компонента митохондриального потенциала (ΔΨ_m), поддерживая тем самым постоянство электрохимического потенциала митохондрий. Развитие ОКД приводит к резкому снижению ΔΨ_m и ΔpH в соме нейронов, однако полного коллапса ΔpH не наблюдается. Это может означать, что ОКД не обусловлена неспецифической мегалпорой во внутренней мембране митохондрий (мРТР), как это принято считать. Либо часть митохондрий в соме нейронов сохраняет барьерные свойства внутренней мембраны и не формирует мРТР даже при развитии ОКД и достижении высокого Ca²⁺-плато.

Ключевые слова: глутамат, флуоресцентные белки, измерения pH, отсроченная кальциевая дисрегуляция, митохондрии, нейрональные культуры

DOI: 10.31857/S0233475522040089

ВВЕДЕНИЕ

Глутамат (Glu) — основной возбуждающий нейротрансмиттер в центральной нервной системе, контролирует различные клеточные и синаптические функции [1]. Glu принимает участие в развитии таких заболеваний, как эпилепсия и нейродегенеративные расстройства [2–5]. В области, окружающей зону поражения при че-

репно-мозговой травме и инсульте, Glu превращается в сильнейший нейротоксин [6–8].

Детальное изучение изменений внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ([Ca²⁺]_i) при действии Glu привело к открытию явления, названного отсроченной кальциевой дисрегуляцией (ОКД) [9, 10]. Динамика изменений [Ca²⁺]_i имеет сложный трехфазный характер и тесно связана с изменениями электрического

компонента трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) [11, 12]. В настоящее время считается, что митохондрии, как основной производитель АТФ и самое емкое внутриклеточное Ca^{2+} -депо, играют ведущую роль в развитии ОКД [11–15].

Применение флуоресцентного белкового АТФ-сенсора позволило обнаружить ряд ранее неизвестных особенностей воздействия Glu на нейроны в культуре [16]. Сопоставление кинетики изменений концентрации АТФ в цитозоле ($[\text{АТФ}]_c$) и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ показало, что падение $[\text{АТФ}]_c$ в каждом нейроне, экспрессировавшем АТФ-сенсор, всегда опережало развитие ОКД, которое начиналось при достижении $[\text{АТФ}]_c \sim 16\%$ от уровня в покоящихся нейронах. В фазе высокого $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -плато $[\text{АТФ}]_c$ опускалась до $\sim 10\%$ от уровня покоя. Эти величины в 4–6 раза ниже значений $[\text{АТФ}]_c$, полученных с помощью физико-химических или биохимических методов анализа в среднем по клеточной популяции [17–20]. Причина расхождения, по крайней мере отчасти, связана с АТФ, поступающим из глиальных клеток, 15–35% которых всегда присутствуют в нейрональных культурах [21]. Полностью подавить рост глиальных клеток не удастся, даже применяя цитостатик Ага-С при концентрациях, не убивающих нейроны (см., например, рис. 2А в [21] и Материалы и методы, первый абзац).

Стимуляция ионотропных глутаматных рецепторов при патологических процессах вызывает не только мощный вход Ca^{2+} , но и сильное закисление цитоплазмы и митохондрий, обусловленное работой Ca^{2+} -АТФ-аз и Na^+/H^+ -обменников плазмалеммы [22] и митохондриальным $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменом [23, 24]. В этой связи рН-зависимость сигналов флуоресцентных белковых сенсоров является не только недостатком, осложняющим интерпретацию сигналов [16], но может быть и достоинством, позволяющим использовать их в качестве рН-индикаторов в интересующем компартменте клетки, например, только в матриксе митохондрий или только в цитозоле [24–26].

Главные функциональные характеристики митохондрий, а именно, способность синтезировать АТФ, захватывать из цитоплазмы Ca^{2+} и другие катионы, транспортировать белки в матрикс, удерживать факторы апоптоза, обусловлены трансмембранным электрохимическим потенциалом их внутренней мембраны ($\Delta\mu_H$) [27, 28]. Этот важнейший интегральный показатель функционального состояния митохондрий определяется

суммой электрического трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) и трансмембранного градиента рН между матриксом митохондрий и цитозолем (ΔpH). Изменения $\Delta\Psi_m$ в нейронах во время первой фазы Ca^{2+} -ответа на нейротоксическое действие Glu и при развитии ОКД почти “зеркально” отражают изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [10, 11], тогда как относительно изменений ΔpH в индивидуальных нейронах, насколько нам известно, нет экспериментальных данных. Поэтому в данной работе одновременно с измерениями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ были измерены рН в матриксе митохондрий (pH_m) и цитозоле (pH_c) нейронов, подвергнутых токсическому воздействию Glu. Для этого в первичных культурах из гиппокампа новорожденных крыс экспрессировали рН-чувствительный зеленый белок mtYFP в митохондриях и рН-чувствительный красный белок mKate в цитозоле. Обнаружено, что во время первой фазы Ca^{2+} -ответов нейронов на глутамат происходит увеличение ΔpH , которое компенсирует, по крайней мере отчасти, снижение $\Delta\Psi_m$. При развитии ОКД и установлении высокого $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -плато ΔpH резко падает, однако полного коллапса ΔpH не происходит. Вероятно, развитие ОКД не обусловлено образованием неспецифической поры высокой проводимости, либо такая пора возникает не во всех митохондриях в some нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные нейрональные культуры из гиппокампа новорожденных крыс получали, как описано в [29]. Кратко, животных анестезировали, декапитировали, извлекали мозг и затем гиппокампы. Суспензию клеток (10^6 клеток/мл) получали, обрабатывая гиппокампы папаином (10 ед/мл), диссоциируя 15-кратным пипетированием, и отмывали от разрушенных клеток двукратным осаждением в центрифуге (1000 об/мин). Суспензию (200 мкл) переносили на покровные стекла, прикрепленные к лункам 35 мм пластиковых чашек Петри (MatTek, США). Стекла предварительно покрывали полиэтиленгликолем (10 мг/мл). Через час добавляли 1.5 мл нейробазальной среды, содержащей 2% Supplement B-27 и 0.5 мМ *L*-глутамин. Клетки содержали при 37°C в атмосфере 5% $\text{CO}_2/95\%$ воздуха при 100% влажности. На 3–4 день добавляли арабинозид С (Ага-С, 2 мкМ) для подавления роста глиальных клеток. Культуры использовали на 8–10 день после посева (3–4 день после трансфекции).

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с этическими принципами и норма-

тивными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, 2010), а также в соответствии с “Правилами надлежащей лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

Микрофлуориметрические измерения выполнены при температуре 27–29°C в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 D-глюкозы; pH 7.4 устанавливали, добавляя 20 мМ HEPES и дотитровывая 1 М HCl. Номинально бескальциевые растворы вместо CaCl₂ содержали 0.1 мМ EGTA и 2 мМ MgCl₂. Смену растворов осуществляли 2 × 2 мл заменой содержимого чашки с клетками за время не более 30 с.

Для измерения [Ca²⁺]_i клетки нагружали Fura-FF в форме ацетоксиметилового (AM) эфира (концентрация маточного раствора 2 мМ в ДМСО). Fura-FF/AM предварительно смешивали с неионным детергентом Pluronic F-127 (Molecular Probes, США) для предотвращения образования в буфере суспензий AM-эфиров индикаторов. Нагрузку проводили при температуре 25–26°C в указанном выше буфере в течение 40–50 мин. Концентрации Fura-FF/AM и Pluronic F-127 составляли соответственно 3–5 мкМ и 0.02%.

Для измерения pH митохондрий и цитозоля плазмиды, несущие гены соответствующих белков, доставляли в клетки, используя Lipofectamine-2000 (LF-2000). Плазмиду (2–3 мкг ДНК/100 мкл OptiMem) смешивали с LF-2000 (4–6 мкл/100 мкл OptiMem) и через 20 мин, когда завершалось образование комплекса ДНК с LF-2000, вносили смесь в клеточную культуру. Перед этим кондиционированную клеточную среду временно заменяли на Transfect Medium (200 мкл в лунке с клетками) и в каждую лунку вносили 50 мкл комплекса ДНК с LF-2000, после чего помещали клетки в CO₂-инкубатор. Через 2 ч удаляли Transfect Medium, ополаскивали клетки нейробазальной средой и возвращали клеткам ту кондиционную среду, в которой они находились перед трансфекцией. Калибровку pH-зависимости сигналов флуоресцентных белковых сенсоров в нейронах проводили как описано в [24] с небольшими изменениями в способе расчета, используя растворы с ионофорами, обеспечивающими выравнивание pH между буфером и внутриклеточной средой. Калибровочные растворы имели состав (мМ): 0.005 нигерицина, 0.001 FCCP, 134 глюконата калия, 1 MgCl₂, 20 HEPES. Для доведения pH использо-

вали 1 М растворы HCl или КОН. Для предотвращения работы митохондриальной АТФ-азы в прямом или реверсивном режиме, что могло потенциально повлиять на воспроизводимость калибровочных кривых, в калибровочные растворы добавляли олигомицин (2.5 мкг/мл).

В тех нейронах, которые экспрессировали одновременно mtYFP и mKate, выполняли измерения [Ca²⁺]_i, pH_m и pH_c. Флуоресцентно-микроскопические измерения проводили на установках, включающих инвертированный микроскоп Olympus IX-71, систему освещения Sutter Lambda 10-2 с ксеноновой лампой 175 Вт (Sutter Instruments) и CCD-камеру CoolSNAP HQ2 (Photometrics), управляемых через компьютерную программу MetaFluor (Molecular Devices, США). Возбуждающий свет от лампы проходил поочередно через светофильтры 340 ± 8 и 380 ± 8 нм для Fura-FF и через 485 ± 10 и 565 ± 15 нм соответственно для mtYFP и mKate и отражался на образец трехполосным зеркалом (максимумы отражения 300–400 нм, 485 ± 15 и 560 ± 20 нм; полосы пропускания 460 ± 20, 525 ± 20 и выше 580 нм). Для регистрации сигналов Fura-FF и mtYFP использовали один и тот же эмиссионный светофильтр 525 ± 15 нм. Для регистрации эмиссии mKate использовали пороговый светофильтр, имеющий пропускание 590–700 нм. Светофильтры и дихроичные зеркала производства Omega (США).

Все реагенты фирмы Sigma (США). Флуоресцентный Ca²⁺-индикатор Fura-FF приобретен у Invitrogen (США). Плазмиды, кодирующие флуоресцентные белковые сенсоры, были любезно предоставлены Dr. R. Rizzuto (University of Ferrara, Италия) и проф. Д. Чудаковым (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Для обсчета флуоресцентных сигналов и построения графиков, а также для статистической обработки данных использовали программы MetaFluor Analyst, Excel, GraphPad Prism 6.1 и Origin 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение смеси двух плазмид, содержащих гены флуоресцентных белковых pH-сенсоров (имеющих разные спектры возбуждения и эмиссии), приводит к трансфекции как нейронов, так и астроцитов. Следует отметить, что трансфекция терминально дифференцированных клеток с применением Lipofectamine-2000 не очень высокая. В наших экспериментах доля трансфицированных нейронов в культурах гиппокампа новорожденных крыс обычно не превышала 0.1%. Эффективность трансфекции астроцитов была в

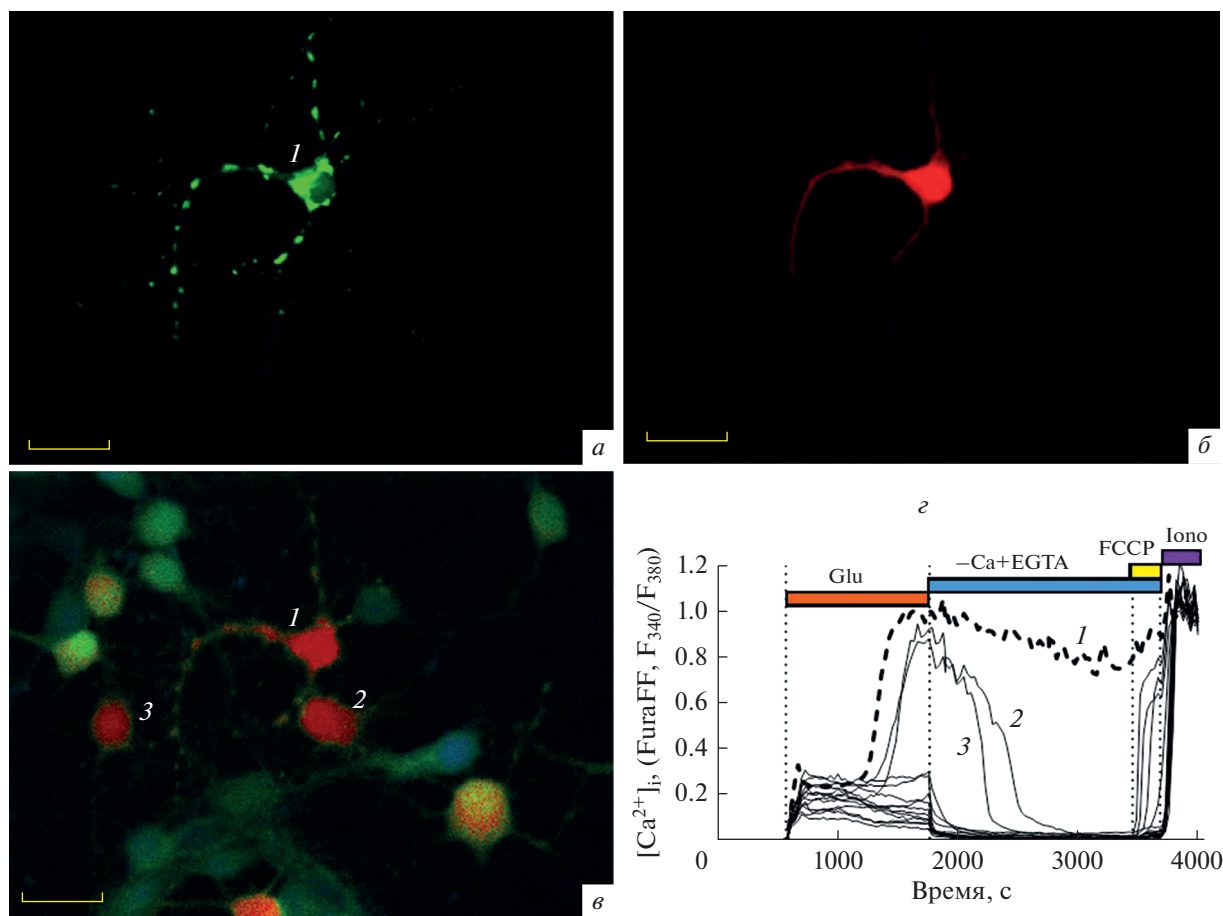


Рис. 1. Экспрессия одновременно двух флуоресцентных белков не изменяет характер Ca^{2+} -ответов на глутамат. Флуоресцентные изображения первичной культуры клеток гиппокампа крысы, экспрессирующих в одном из нейронов зеленый pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях (а) и красный pH-чувствительный белок mKate в цитозоле (б). На панели в приведено изображение всех клеток в поле наблюдения, нагруженных низкоаффинным флуоресцентным Ca^{2+} -индикатором Fura-FF. Графики изменений $[Ca^{2+}]_i$, индуцированные глутаматом (Glu, 100 мкМ в безмагниевоом буфере в присутствии 10 мкМ глицина), представлены на панели г; пунктиром выделен график изменений $[Ca^{2+}]_i$ в нейроне, экспрессировавшем одновременно mtYFP и mKate. Цифрами 1, 2 и 3 отмечены клетки, в которых за время действия Glu развилась ОКД. Изображение в соответствует 1770 с на панели г или 1170 с с момента добавления Glu. Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции см. Материалы и методы; объектив (40×/NA = 1.35 oil). Масштабный отрезок на панелях а, б, в соответствует 20 мкм.

3–5 раз выше. Соотношение флуоресцентных сигналов может значительно различаться как между индивидуальными клетками, так и в каждой трансфицированной клетке, если она экспрессирует более одного флуоресцентного белка. На рис. 1 и 2 представлены изображения нейронов, в митохондриях которых экспрессируется зеленый флуоресцентный белок mtYFP [24] (рис. 1а и 2а), а в цитозоле красный флуоресцентный белок mKate [30] (рис. 1б и 2б). При использовании объектива с относительно высоким увеличением и разрешением хорошо видно, что mtYFP заполняет часть перинуклеарного пространства в соме и в виде пунктиров расположен в дендритах и аксоне (рис. 1а). Аналогичный характер флуоресценции наблюдается при окрашивании нейронов митот-

рекерами [31] или митохондриальными потенциал-чувствительными зондами [21, 32].

В отличие от mtYFP, красный флуоресцентный белок mKate, не имеющий адресной пептидной последовательности, заполняет цитозоль и ядро (рис. 1б). В ядерной оболочке имеются поры, размер которых позволяет диффундировать из цитозоля в ядро и обратно молекулам размером до 20–40 кДа [33, 34], что согласуется с размером мономерных флуоресцентных белков, в частности mKate [30].

На рис. 1г, 3а, 3б показаны графики изменений $[Ca^{2+}]_i$ для группы нейронов, окрашенных Fura-FF (рис. 1в). Видно, что процедура трансфекции (см. Материалы и методы) не отменила

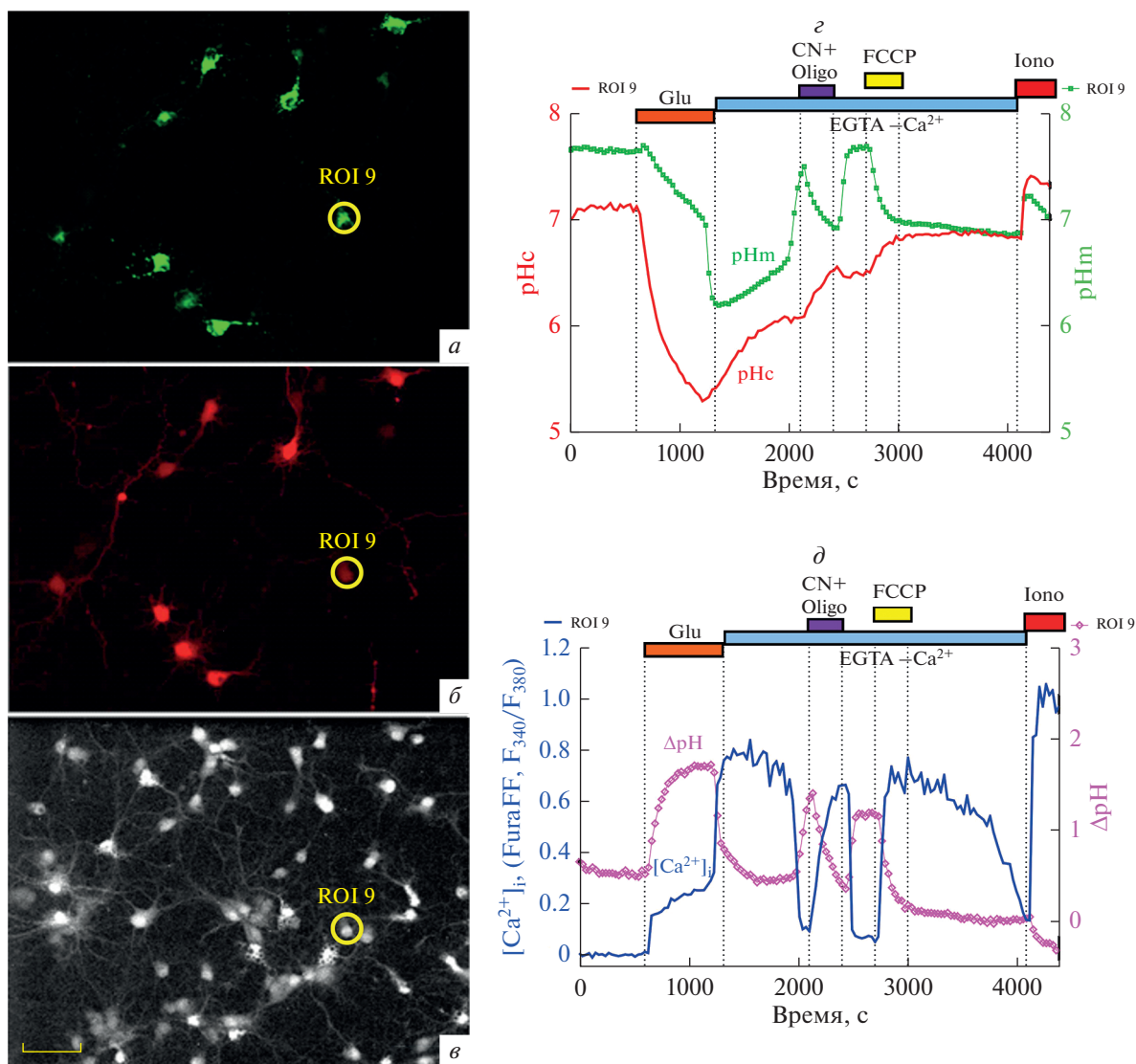


Рис. 2. Экспрессия одновременно двух флуоресцентных белков и окрашивание нейронов Ca^{2+} -индикатором позволяет сопоставить изменения pH в митохондриях и цитозоле (pH_m и pH_c) с изменениями $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Изображения гиппокампальных нейронов, (а) экспрессирующих зеленый pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях, (б) красный pH-чувствительный белок mKate в цитозоле и (в) нагруженных низкоаффинным Ca^{2+} -индикатором Fura-FF (возб. 340, 380, испуск. 525 нм). z – Графики изменений pH_m и pH_c одного из нейронов, показанных на изображениях (ROI 9; обведен кружком) при действии токсических доз глутамата (Glu), а также ингибитора дыхания цианида (CN, 3 мМ), ингибитора митохондриальной АТФ-азы олигомицина (Oligo, 2.5 мкг/мл) и протонифора FCCCP (1 мкМ). d – Графики изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолом (ΔpH) того же нейрона (ROI 9). Объектив $20\times/\text{NA} = 0.70$. Концентрация Glu и условия регистрации флуоресцентных сигналов как на рис. 1. Масштабный отрезок на панелях а, б, в соответствует 40 мкм.

индивидуальности ответов нейронов на Glu. Часть нейронов смогла противостоять токсическому действию Glu и в них не возникла ОКД (11 из 14 на рис. 1з). В трех нейронах развилась ОКД (обозначены цифрами 1, 2 и 3 на рис. 1в; их графики отмечены 1, 2 и 3 на рис. 1з), в том числе и в том, который экспрессировал mtYFP и mKate (рис. 1). Индивидуальность развития ОКД в нейронах в ответ на Glu хорошо документирована [11]. Если процедура трансфекции подобрана

корректно, то индивидуальность Ca^{2+} -ответов сохраняется даже в тех случаях, когда используют субъединичные флуоресцентные белковые сенсоры, молекулярная масса которых в 3 раза превышает массу mtYFP и mKate [16, 35].

Чтобы выяснить, как соотносятся изменения pH_m и pH_c с изменениями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в индивидуальных нейронах, клеточную культуру нагружали Fura-FF и выбирали участок, в котором находи-

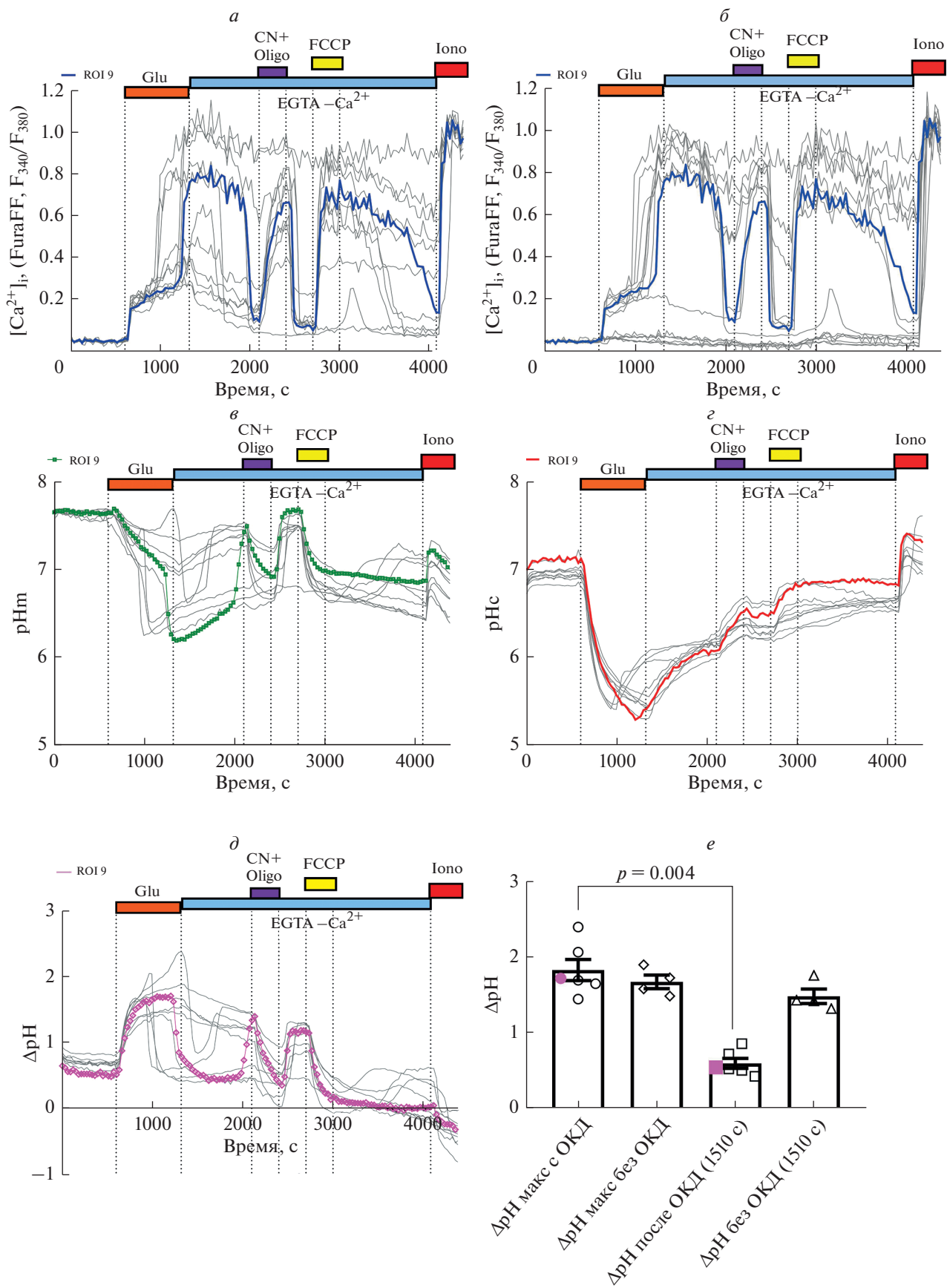


Рис. 3. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и pH в цитозоле (pH_c) и в матриксе митохондрий (pH_m) клеток гиппокампа крысы, изображения которых представлены на рис. 2. *а* – Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках, экспрессировавших одновременно флуоресцентные белковые pH-сенсоры в цитозоле (mKate) и митохондриях (mtYFP). *б* – Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках, не экспрессировавших mtYFP и mKate. *в* – Изменения сигналов mtYFP, (*г*) mKate и (*д*) ΔpH . *е* – Максимальные значения ΔpH во время действия Glu и через ~200 с после отмывки. Для сравнения сигналы одного из нейронов, приведенных на рис. 2 (ROI 9), выделены цветными линиями; сигналы остальных нейронов представлены серыми линиями. На панели *е* точки, соответствующие нейрону (ROI 9), отмечены цветными точками; столбики “ ΔpH макс с ОКД” и “ ΔpH макс без ОКД” соответствуют максимальным значениям ΔpH в каждом индивидуальном нейроне, не имевшем ОКД или во время первой фазы подъема $[Ca^{2+}]_i$, предшествующей ОКД в тех нейронах, где ОКД развилась; столбики “ ΔpH после ОКД (1510 с)” соответствуют значениям ΔpH при максимальном подъеме $[Ca^{2+}]_i$ в результате развития ОКД (примерно 1510 с на панелях *а–д*); “ ΔpH без ОКД (1510с)” – значения ΔpH в тех нейронах, в которых ОКД не произошла.

лось как можно больше нейронов, экспрессировавших одновременно mtYFP и mKate. Пример участка нейрональной культуры, в котором содержится группа таких нейронов, представлена на рис. 2*а*, 2*б*, 2*в*. Изменения pH_m , pH_c , их разности (ΔpH) и $[Ca^{2+}]_i$ в этих нейронах, а также в части клеток, не экспрессировавших белковые сенсоры, показаны на рис. 3.

Сразу после добавления Glu одновременно со скачком $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2*д*, 3*а*, 3*б*) происходило снижение pH_m и pH_c (рис. 2*г*, 3*в*, 3*г*). Динамика изменений pH_m и pH_c заметно различалась, что приводило к росту ΔpH . По мере стабилизации изменений $[Ca^{2+}]_i$ во время лаг-периода, предшествующего началу ОКД, стабилизировались также изменения ΔpH (рис. 2*д*, 3*д*).

Выполненные ранее нами [11, 36] и другими [37] исследования показали, что изменения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на токсическую концентрацию Glu имеют “зеркальный” характер относительно изменений $\Delta \Psi_m$. В момент добавления Glu происходит сравнительно небольшой скачок $[Ca^{2+}]_i$ от базального ~100 нМ [38] до нескольких микромолей/литр (первая фаза подъема $[Ca^{2+}]_i$) [11, 38, 39]. Этот небольшой подъем $[Ca^{2+}]_i$ стабилизируется на период от единиц до десятков минут и сопровождается снижением $\Delta \Psi_m$ на ~60 мВ [10, 32]. Это умеренное снижение $\Delta \Psi_m$ во время первой фазы Ca^{2+} -ответа на Glu компенсируется ростом ΔpH (рис. 2*д*, 3*д*, 3*е*).

При продолжительном действии Glu наступает вторая фаза изменений $[Ca^{2+}]_i$, названная ОКД, при которой $[Ca^{2+}]_i$ поднимается до десятков микромолей/литр [39]. Этот подъем осуществляется с лаг-периодом, индивидуальным для каждого нейрона (например, рис. 1*г* и 3*а*, 3*б*) и происходит всегда синхронно с сильным падением $\Delta \Psi_m$ [11, 29]. До конца не ясно, от чего в большей степени зависит вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ – происходит ли выброс Ca^{2+} из митохондрий одновременно с деполяризацией или же больше сказывается поступление Ca^{2+} извне. В развитие ОКД и стабилизацию $[Ca^{2+}]_i$ на уровне высокого плато

вовлечены, по-видимому, различающиеся процессы, поскольку удаление Ca^{2+} из буфера в самом начале ОКД быстро снижает $[Ca^{2+}]_i$, тогда как смена буфера на бескальциевый в фазе высокого $[Ca^{2+}]_i$ -плато влияет на $[Ca^{2+}]_i$ гораздо слабее [11, 36].

При возникновении ОКД происходило дополнительное снижение pH_m , тогда как падение pH_c замедлялось или даже сменялось его ростом (рис. 2*г*, 3*в*, 3*г*), в результате чего ΔpH быстро падала (рис. 2*д*). Обращает внимание то, что ΔpH уменьшался до ~0.5 единиц pH (рис. 2*д* и 3*д*, 3*е*), т.е. до уровня, наблюдаемого в покоящихся нейронах.

Отмывание Glu бескальциевым буфером приводило к снижению $[Ca^{2+}]_i$ в тех клетках, в которых не наступила ОКД (рис. 3*а*, 3*б*). Если в клетках развилась ОКД, то восстановление низкой $[Ca^{2+}]_i$ происходило с задержкой, а в некоторых не восстанавливалась за время измерений. Во время Ca^{2+} -плато происходило постепенное защелачивание матрикса, которое ускорялось в постглутаматный период при восстановлении низкой $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2*г* и 3*в*).

В цитозоле падение pH сменялось ростом при наступлении ОКД, а также при прекращении действия Glu (рис. 2*г* и 3*г*). Другими словами, в постглутаматный период происходило постепенное выравнивание градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолем, однако ни в одной из клеток за время действия Glu не наступило коллапса ΔpH (рис. 3*д*, 3*е*).

Добавление в постглутаматный период ингибитора комплекса IV дыхательной цепи цианида (NaCN, 3 мМ) в сочетании с ингибированием F_1F_0 АТФ-азы олигомицином (Oligo, 2.5 мкг/мл), вызывающее коллапс $\Delta \Psi_m$, быстро увеличивал $[Ca^{2+}]_i$ в результате мобилизации Ca^{2+} из митохондрий в цитозоль (рис. 2*д* и 3*а*, 3*б*). К подобному подъему $[Ca^{2+}]_i$ приводила замена цианида на ингибиторы комплексов I или III дыхательной цепи (соответственно, ротенон или антимицин А;

данные не показаны). Причиной роста $[Ca^{2+}]_i$ являлась, очевидно, ликвидация электрофоретической силы, удерживавшей Ca^{2+} в матриксе митохондрий [11, 13].

Цианид резко закислял матрикс и ускорял защелачивание цитозоля, сближая величины pH_m и pH_c (рис. 2г и 3в, 3е). Это указывает на то, что при остановке дыхательной цепи утечка протонов сквозь внутреннюю мембрану митохондрий способна ликвидировать ΔpH за несколько минут (рис. 2д и 3д).

Отмывание NaCN быстро понижало $[Ca^{2+}]_i$ в большинстве клеток (в 16 из 26), в которых Glu индуцировал подъем $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3а, 3б). Очевидно, в результате разблокирования комплекса IV дыхательной цепи происходило восстановление $\Delta\Psi_m$ и возобновление электрофоретического захвата Ca^{2+} митохондриями.

Отмывание цианида также быстро восстанавливало pH_m до уровня, предшествовавшего действию митохондриального яда (рис. 3в). Это наблюдение согласуется с тем, что дыхательная цепь возобновила выкачивание протонов из матрикса в цитозоль, повышая тем самым pH_m .

Протонофор FCCP (1 мкМ), добавленный через 5 мин после отмывания цианида, резко увеличивал $[Ca^{2+}]_i$ и уменьшал разницу между pH_m и pH_c (рис. 3). Напомним, что добавление FCCP часто используют как методический прием, чтобы вызвать коллапс $\Delta\Psi_m$ и проверить наличие Ca^{2+} в митохондриях [11, 13]. Скачок $[Ca^{2+}]_i$, индуцированный FCCP, согласуется с тем, что понижение $[Ca^{2+}]_i$ после удаления NaCN обусловлено именно поглощением Ca^{2+} митохондриями, а не откачиванием наружу.

Примечательно, что при отмывании FCCP часть клеток смогла начать понижение $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3а, 3б). В этих же нейронах происходило повышение ΔpH (рис. 3д). Это показывает, что даже после таких разнообразных воздействий, как токсические дозы глутамата и митохондриальные яды, клетки сохранили способность поддерживать функциональную активность митохондрий. Другими словами, процедура трансфекции и экспрессия чужеродных белков в цитозоле и в митохондриях не нарушила работоспособность нейронов, по крайней мере в течение ~2 ч в минимальном солевом буфере при температуре, близкой к комнатной.

Необходимо отметить, что часть клеток не реагировала ростом $[Ca^{2+}]_i$ на Glu и, соответственно, на митохондриальные яды в постглутаматный

период (рис. 3б). Эти клетки реагировали только на добавление Ca^{2+} -ионофора иономицина (Iono) на завершающей стадии эксперимента. Вероятно, эти нейроны не содержали ионотропных глутаматных рецепторов, либо были клетками глии. Отметим, что добавление иономицина в конце эксперимента для определения максимального сигнала Ca^{2+} -индикатора (Fura-FF), неизменно вызывало защелачивание митохондрий и цитозоля (рис. 3). Этот ионофор является Ca^{2+}/H^+ -обменником, поэтому перенос Ca^{2+} в цитозоль и затем в митохондрии сопровождается удалением протонов в буфер, т.е. повышением как pH_m , так и pH_c .

ОБСУЖДЕНИЕ

Одновременные измерения $[Ca^{2+}]_i$, pH_m и pH_c в одном и том же нейроне позволили обнаружить рост ΔpH , компенсирующий снижение $\Delta\Psi_m$ во время первой фазы Ca^{2+} -ответа на глутамат. За счет процессов дыхания и Ca^{2+}/H^+ -обмена между матриксом митохондрий и цитозолем умеренное снижение $\Delta\Psi_m$ на ~60 мВ во время первой фазы Ca^{2+} -ответа на Glu [10, 32] компенсируется ростом ΔpH на ~1 (рис. 2д, 3в, 3е). Согласно уравнению Нернста [13, 27, 28] такой рост ΔpH соответствует росту электрохимического потенциала митохондрий на ~60 мВ и происходит за счет Ca^{2+}/H^+ -обмена, осуществляемого совокупным действием Ca^{2+} -унипортера, протонных насосов дыхательной цепи (комплексов I, III и IV) и системой $Ca^{2+}/3Na^+$ - и Na^+/H^+ -обменников [13, 27, 28].

Недавно появились данные о том, что полость внутри крист внутренней мембраны митохондрий не является резервуаром для протонов, поступающих из межмембранного пространства и служащих "субстратом" для F_1F_0 -АТФ-азы ([40] и ссылки там). Предполагается, что плотная упаковка ферментов окислительного фосфорилирования в мембранах крист обеспечивает локальную кинетическую связь экструзии протонов дыхательной цепью с F_1F_0 -АТФ-азой, потребляющей эти протоны. В этом случае значения ΔpH , полученные в настоящей работе, завышены. На наш взгляд, истина где-то посередине и обмен протонами между цитозолем, межмембранным пространством митохондрий и внутренним пространством крист, соединенным с межмембранным пространством, существует, по крайней мере, при действии глутамата на нейроны. Иначе поступление Ca^{2+} в митохондрии не влияло бы на pH цитозоля ([16, 23, 24] и данное исследование).

Такая компенсация сохраняет (а возможно, даже увеличивает) способность митохондрий поддерживать необходимую скорость синтеза АТФ в условиях его повышенного потребления ионными насосами плазматической мембраны. При развитии ОКД этот компенсаторный эффект, если не исчезает, то значительно ослабевает, однако полного коллапса ΔpH не происходит, по крайней мере в начальный период ОКД. Это свидетельствует о том, что, если повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий вносит вклад в развитие ОКД и сильной митохондриальной деполяризации, то повышение этой проводимости едва ли является классической мегaporой (mitochondrial permeability transition pore, мРТР). В противном случае ΔpH стал бы равен нулю [14, 27, 28, 41]. Либо мРТР формируется не во всех митохондриях, локализованных в соме нейронов. В пользу отсутствия “классической” циклоспорин-А чувствительной поры, по крайней мере на начальном этапе ОКД, свидетельствует также то, что замена Ca^{2+} на Sr^{2+} , который препятствует мРТР [41, 42], не отменяла возникновения отсроченной “стронциевой дисрегуляции” [24, 43]. Более того, в присутствии Sr^{2+} и циклоспорина-А наблюдалось кратковременное увеличение градиента pH между матриксом и цитозолем, совпадающее с началом ОКД [24], чего не должно быть, если бы развитие ОКД было полностью обусловлено мРТР. Более детальный анализ формирования поры и ее структуры дан, например, в обзорах [44, 45], в том числе при нейродегенеративных заболеваниях [46].

Стоит также отметить, что меньшее снижение pH_m , чем pH_c во время первой фазы Ca^{2+} -ответа на Glu, препятствует сильному увеличению растворимости Ca^{2+} -фосфатных комплексов в матриксе митохондрий, предотвращая более значительное падение их Ca^{2+} -буферной емкости в условиях снижения $\Delta\Psi_m$ [46].

Деполяризация митохондрий в бескальциевом буфере в постглутаматный период, когда они накопили много Ca^{2+} , вызывает высвобождение Ca^{2+} в цитозоль, сопряженное с захватом митохондриями протонов. Возникающее закисление матрикса митохондрий вызывает, по-видимому, растворение Ca^{2+} -фосфатных комплексов [47] и дополнительное высвобождение Ca^{2+} из митохондрий, обеспечивая дополнительное поступление протонов в матрикс. Формально, подобный процесс работает по принципу положительной обратной связи, или “порочного круга” (*vicious cycle*). Эта гипотеза механизма развития ОКД, при которой одновременно происходит рост

$[Ca^{2+}]_i$, деполяризация митохондрий и закисление их матрикса, была предложена Борисом Израилевичем Ходоровым за несколько лет до описанных в данной работе результатов [11].

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена по плану Государственных заданий Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А19-119012590191-3 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FGfU-2022-0012.

Соответствие принципам этики. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным и в соответствии с Приказом Минздравоохранения России № 708н от 23.08.2010 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Y., Qin Z. 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. **15** (11), 1382–1402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>
2. Zhou Y., Danbolt N.C. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm.* **121** (8), 799–817. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
3. Gudiño-Cabrera G., Ureña-Guerrero M.E., Rivera-Cervantes M.C., Feria-Velasco A.I., Beas-Zárate C. 2014. Excitotoxicity triggered by neonatal monosodium glutamate treatment and blood–brain barrier function. *Arch. Med. Res.* **45** (8), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.014>
4. Jewett B.E., Thapa B. 2021. *Physiology, NMDA receptor*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
5. Zöllner J.P., Schmitt F.C., Rosenow F., Kohlhase K., Seiler A., Strzelczyk A., Stefan H. 2021. Seizures and epilepsy in patients with ischaemic stroke. *Neurol. Res. Pract.* **3** (1), 63. <https://doi.org/10.1186/S42466-021-00161-W>
6. Verkhratsky A., Kirchhoff F. 2007. NMDA receptors in glia. *Neuroscientist*. **13** (1), 28–37. <https://doi.org/10.1177/1073858406294270>
7. Gerkau N.J., Rakers C., Petzold G.C., Rose C.R. 2017. Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **95** (11), 2275–2285. <https://doi.org/10.1002/jnr.23995>

8. Huo Y., Feng X., Niu M., Wang L., Xie Y., Wang L., Ha J., Cheng X., Gao Z., Sun Y. 2021. Therapeutic time windows of compounds against NMDA receptors signaling pathways for ischemic stroke. *J. Neurosci. Res.* **99** (12), 3204–3221. <https://doi.org/10.1002/JNR.24937>
9. Tymianski M., Charlton M.P., Carlen P.L., Tator C.H. 1993. Secondary Ca^{2+} overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. *Brain Res.* **607** (1–2), 319–323. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91523-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91523-U)
10. Nicholls D.G., Ward M.W. 2000. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* **23** (4), 166–174. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01534-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01534-9)
11. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 279–351. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
12. Abramov A.Y., Duchen M.R. 2010. Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1800** (3), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.08.002>
13. Nicholls D.G., Budd S.L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80** (1), 315–360.
14. Duchen M.R. 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Arch.* **464** (1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0>
15. Plotegher N., Filadi R., Pizzo P., Duchen M.R. 2021. Excitotoxicity revisited: Mitochondria on the verge of a nervous breakdown. *Trends Neurosci.* **44** (5), 342–351. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2021.01.001>
16. Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Sharipov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. 2014. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry (Moscow).* **79** (2), 146–157. <https://doi.org/10.1134/S0006297914020084>
17. Budd S.L., Nicholls D.G. 1996. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca^{2+} homeostasis. *J. Neurochem.* **66** (1), 403–411. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.66010403.X>
18. Pinelis V.G., Bykova L.P., Bogachev A.P., Isaev N.K., Viktorov I.V., Khodorov B.I. 1997. Toxic effect of glutamate on cultured cerebellar granular cells reduces the intracellular level of ATP. The role of Ca^{2+} ions. *Bull. Exp. Biol. Med.* **123** (2), 162–164.
19. Ioudina M., Uemura E., Greenlee H.W. 2004. Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. *Brain Res.* **1004** (1–2), 188–192. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2003.12.046>
20. Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Y.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G. 2007. Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bull. Exp. Biol. Med.* **143** (4), 442–445. <https://doi.org/10.1007/S10517-007-0151-6>
21. Surin A.M., Khiroug S.S., Gorbacheva L.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G., Khiroug L. 2013. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 102. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00102>
22. Hwang S.-M., Koo N.-Y., Jin M., Davies A.J., Chun G.-S., Choi S.-Y., Kim J.-S., Park K. 2011. Intracellular acidification is associated with changes in free cytosolic calcium and inhibition of action potentials in rat trigeminal ganglion. *J. Biol. Chem.* **286** (3), 1719–1729.
23. Wang G.J., Randall R.D., Thayer S.A. 1994. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca^{2+} loads. *J. Neurophysiol.* **72** (6), 2563–2569. <https://doi.org/10.1152/JN.1994.72.6.2563>
24. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Brustovetsky N., Rizzuto R., Khodorov B.I. 2008. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca^{2+} deregulation. *Cell Calcium.* **43** (6), 602–614. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.10.005>
25. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90** (3), 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00038.2009>
26. Okumoto S. 2010. Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21** (1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.01.009>
27. Nicholls D.G., Ferguson S.J. 2013. *Bioenergetics*. 4th ed. Middletown, USA: Acad. Press. 434 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
28. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. 2011. *Мембранная биоэнергетика*. М.: Изд-во МГУ. 368 стр.
29. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2014. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов. *Патогенез*. **12** (4), 40–46.
30. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zaraisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods.* **4** (9), 741–746. <https://doi.org/10.1038/NMETH1083>
31. Buckman J.F., Hernandez H., Kress G.J., Votyakova T.V., Pal S., Reynolds I.J. 2001. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mi-

- tochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Methods*. **104** (2), 165–176.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00340-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00340-X)
32. Duchen M.R., Surin A., Jacobson J. 2003. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol.* **361**, 353–389.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61019-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61019-0)
 33. Keminer O., Peters R. 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* **77** (1), 217–228.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76883-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76883-9)
 34. Mattaj I.W., Englmeier L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.265>
 35. Brustovetsky N., Dubinsky J.M. 2000. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. *J. Neurosci.* **20** (1), 103–113.
 36. Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. 2018. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата. *Биол. мембраны*. **35** (5), 384–397.
 37. Ходоров Б.И., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., Юравичус А.И., Бородин А.В., Винская Н.П., Каспеков Л.Г., Пинелис В.Г. 2001. Митохондриальная деполяризация играет доминирующую роль в механизме нарушения нейронального кальциевого гомеостаза вызванного глутаматом. *Биол. мембраны*. **18** (6), 421–432.
 38. Abramov A.Y., Duchen M.R. 2008. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1777** (7–8), 953–964.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.017>
 39. Kiedrowski L. 1999. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: Relationships among plasma membrane potential, Na⁺/Ca²⁺ exchange, mitochondrial Ca²⁺ overload, and cytoplasmic concentrations of Ca²⁺, H⁺, and K⁺. *Mol. Pharmacol.* **56** (3), 619–632.
 40. Toth A., Meyrat A., Stoldt S., Santiago R., Wenzel D., Jakobs S., von Ballmoos C., Ott M. 2020. Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(5), 2412–2421.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1917968117>
 41. Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79** (4), 1127–1155.
<https://doi.org/10.1038/370621a0>
 42. Dubinin M.V., Adakeeva S.I., Samartsev V.N. 2013. Long-chain α,ω -dioic acids as inducers of cyclosporin A-insensitive nonspecific permeability of the inner membrane of liver mitochondria loaded with calcium or strontium ions. *Biochemistry (Moscow)*. **78** (4), 412–417.
<https://doi.org/10.1134/S000629791304010X>
 43. Вабниц А.В., Сторожевых Т., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2005. Открывание митохондриальной поры не является необходимым условием для деполяризации митохондрий нарушения кальциевой регуляции, вызываемых глутаматом в нейронах мозга. *Биол. мембраны*. **2** (4), 378–382.
 44. Bauer T.M., Murphy E. 2020. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ. Res.* **126** (2), 280–293.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306>
 45. Carinci M., Vezzani B., Patergnani S., Ludewig P., Lessmann K., Magnus T., Casetta I., Pugliatti M., Pinton P., Giorgi C. 2021. Different roles of mitochondria in cell death and inflammation: Focusing on mitochondrial quality control in ischemic stroke and reperfusion. *Biomedicines*. **9** (2), 1–28.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9020169>
 46. Abramov A.Y., Berezhnov A. V., Fedotova E.I., Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. 2017. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* **45** (4), 1025–1033.
<https://doi.org/10.1042/BST20170024>
 47. Chalmers S., Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278** (21), 19062–19070.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212661200>

pH Changes in the Mitochondrial Matrix and Cytosol during Glutamate Deregulation of Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Rat Hippocampal Neurons

A. M. Surin^{1, 2, *}, L. R. Gorbacheva^{3, 4}, I. G. Savinkova³,
 R. R. Sharipov¹, V. G. Pinelis²

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

²Scientific Center for Children's Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119991 Russia

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117513 Russia

⁴Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: surin_am@mail.ru

Application of glutamate (Glu) in high concentrations to the rat brain primary neuronal cultures leads to a secondary rise in the intracellular free Ca²⁺ concentration (delayed calcium deregulation, DCD), which de-

velops synchronously with a strong mitochondrial depolarization. In this work, pH in the mitochondrial matrix (pH_m) and cytosol (pH_c) was measured simultaneously with the intracellular concentration of free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) in the soma of cultured neurons exposed to a toxic concentration of Glu (100 μM). To this end, we performed the expression of the pH-sensitive fluorescence proteins, green mtYFP in the mitochondria and red mKate in the cytosol, in primary cultures from the hippocampus of newborn rats. To measure [Ca²⁺]_i simultaneously with pH_m, and pH_c neuronal cultures were loaded with low affinity Ca²⁺-sensitive indicator Fura-FF. It was found that during the first phase of the Ca²⁺-response to Glu, when only partial depolarization of mitochondria occurs, there is an increase in the pH gradient between the mitochondrial matrix and cytosol (ΔpH). The increase in ΔpH compensates for the decrease in the electrical mitochondrial potential (ΔΨ_m), maintaining a relatively constant electrochemical mitochondrial potential and maintaining ATP synthesis at least until DCD begins. The development of DCD led to a sharp decrease both in ΔΨ_m and ΔpH in the soma of neurons; however, a complete collapse of ΔpH was not observed. This probably means that DCD (1) is not caused by a nonspecific pore in the mitochondrial inner membrane (mPTP), as it is commonly thought, or (2) some of the mitochondria in the soma of neurons retain the barrier properties of the inner membrane and do not form mPTP even at high [Ca²⁺]_i plateau.

Keywords: glutamate, fluorescent proteins, pH measurements, delayed calcium deregulation, mitochondria, neuronal cultures