РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА Том 107, № 4-5, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Юбилей	
Юбилей академика Льва Гиршевича Магазаника	401
Обзоры	
Каналоблокаторы ионотропных рецепторов глутамата Д. Б. Тихонов	403
Структуры натриевых и кальциевых каналов с лигандами Б. С. Жоров	417
Фотохромная модуляция Цис-петельных рецептор-управляемых каналов П. Д. Брежестовский, Д. Н. Пономарева	436
Холинергическая модуляция секреции ацетилхолина в нервно-мышечном соединении Э. А. Бухараева, А. И. Скоринкин	458
Роль нейро-кардиального соединения в симпатической регуляции сердца Ю. Г. Одношивкина, А. М. Петров	474
Синаптические дисфункции при эпилепсии А. В. Зайцев, Д. В. Амахин, А. В. Дёмина, М. В. Захарова, Ю. Л. Ергина, Т. Ю. Постникова, Г. П. Диеспиров, Л. Г. Магазаник	492
Глюкокортикоидная регуляция глутаматергического синапса: механизмы стресс-зависимой нейропластичности <i>Н. В. Гуляева</i>	518
Влияние диеты как фактора экспозома на работу головного мозга А. А. Федотова, А. Б. Тяглик, А. В. Семьянов	533
Методические статьи	
Применение метода экспансионной микроскопии в нейробиологии К. З. Деревцова, Е. И. Пчицкая, А. В. Раковская, И. Б. Безпрозванный	568
Экспериментальные статьи	
Искусственный пептидный лиганд калиевого канала K _V 1.1 с высокой селективностью В. М. Табакмахер, А. И. Кузьменков, А. М. Гиголаев, Э. Л. Пиньейро-Жуниор,	
С. Пеньёр, Р. Г. Ефремов, Я. Титгат, А. А. Василевский	584
Функциональная оценка периферической холинергической нейротрансмиссии у крыс с фетальным вальпроатным синдромом <i>А. Ю. Архипов, Д. В. Самигуллин, И. И. Семина, А. И. Маломуж</i>	605
Изучение роли С-концевого внутриклеточного домена на функционирование ионного канала ASIC3	
Д. И. Осмаков, Ю. В. Королькова, К. И. Лубова, Е. Е. Малеева, Я. А. Андреев, С. А. Козлов	616

Роль рианодиновых и IP ₃ -рецепторов в генерации кальциевых ответов, вызываемых трициклическими антидепрессантами в нейронах	
неокортекса крысы	(20)
С. И. Боиков, Д. А. Сиоаров, 1. В. Карелина, Н. Н. Шестакова, С. М. Антонов	629
Ингибитор гистондеацитилаз усиливает долговременную синаптическую потенциацию в нейронах виноградной улитки	
Д. Е. Колотова, А. Ю. Малышев, П. М. Балабан	641
Взаимодействие механизмов угнетения квантового выделения ацетилхолина при активации ваниллоидных (TRPV1) и пуриновых рецепторов	
в нервно-мышечном синапсе мыши	
А. Ю. Архипов, Н. В. Жиляков, А. И. Маломуж, Д. В. Самигуллин	647

Anniversary

Anniversary of Academician Lev Girshevich Magazanik	401
Reviews	
Channel Blockers of Ionotropic Glutamate Receptors D. B. Tikhonov	403
Structures of Sodium and Calcium Channels with Ligands B. S. Zhorov	417
Photochromic Modulation of Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channels P. D. Bregestovski and D. N. Ponomareva	436
Cholinergic Modulation of Acetylcholine Secretion at the Neuromuscular Junction <i>E. A. Bukharaeva and A. I. Skorinkin</i>	458
The Role of Neuro-Cardiac Junction in the Sympathetic Regulation of Heart <i>Yu. G. Odnoshivkina and A. M. Petrov</i>	474
Synaptic Dysfunction in Epilepsy A. V. Zaitsev, D. V. Amakhin, A. V. Dyomina, M. V. Zakharova, J. L. Ergina, T. Y. Postnikova, G. P. Diespirov, and L. G. Magazanik	492
Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity <i>N. V. Gulyaeva</i>	518
Effect of Diet as a Factor of Exposome on Brain Function A. A. Fedotova, A. B. Tiaglik, and A. V. Semyanov	533
Methodical Articles	
Applying of the Expansion Microscopy Method in Neurobiology K. Z. Derevtsova, E. I. Pchitskaya, A. V. Rakovskaya, and I. B. Bezprozvanny	568
Experimental Articles	
Artificial Peptide Ligand of Potassium Channel K _V 1.1 with High Selectivity V. M. Tabakmakher, A. I. Kuzmenkov, A. M. Gigolaev, E. L. Pinheiro-Junior, S. Peigneur, R. G. Efremov, J. Tytgat, and A. A. Vassilevski	584
Functional Assessment of Peripheral Cholinergic Neurotransmission in Rats with Fetal Valproate Syndrome	(05
A. Y. Arkhipov, D. V. Samigullin, I. I. Semina, and A. I. Malomouzh Investigation of the Role of the C-Terminal Intracellular Domain	605
for ASIC3 Ion Channel Functioning D. I. Osmakov, Yu. V. Korolkova, K. I. Lubova, E. E. Maleeva, Ya. A. Andreev, and S. A. Kozlov	616
The Role of Ryanodine and IP ₃ -Receptors in Calcium Responses to Tricyclic Antidepressants in Rat Neocortical Neurons <i>S. I. Boikov, D. A. Sibarov, T. V. Karelina, N. N. Shestakova, and S. M. Antonov</i>	629
Histone Deacytylase Inhibitor Enhances Long-Term Synaptic Potentiation in the Neurons of a Grape SnailD. E. Kolotova, A. Yu. Malyshev, and P. M. Balaban	641
Interaction of the Mechanisms of Suppression of the Acetylcholine Quantal Release at the Activation of Vanilloid (TRPVI) and Purine Receptors in the Mouse Neuromuscular Junction	
A. Yu. Arkhipov, N. V. Zhilyakov, A. I. Malomouzh, and D. V. Samigullin	647

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 401-402

= ЮБИЛЕЙ =

ЮБИЛЕЙ АКАДЕМИКА ЛЬВА ГИРШЕВИЧА МАГАЗАНИКА



Академик Лев Гиршевич Магазаник — ведущий отечественный нейрофизиолог, связавший свою научную жизнь с Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. Он и его сотрудники внесли весомый вклад в изучение механизмов синаптической передачи. В апреле 2021 г. Льву Гиршевичу исполняется 90 лет, и он по-прежнему бодр и полон сил.

Наука привлекала Льва Гиршевича всегда. Еще в школьные годы он побеждал на химических олимпиадах. Окончив школу с медалью в 1949 г., он поступил в 1-й Ленинградский Медицинский институт им. И.П. Павлова и на первом же курсе пришел на кафедру органической химии к чл.-корр. Н.В. Хромову-Борисову, где постигал азы химического синтеза. Затем, уже на кафедре биохимии, выполнил свою первую исследовательскую работу, опубликованную в научном журнале. В течение последних трех лет студенчества приобщился к главной проблеме молекулярной физиологии – синаптической передаче в нервной системе – на кафедре физиолога и фармаколога профессора М.Я. Михельсона. По окончании Института с красным дипломом получил распределение в качестве главного врача маленькой туберкулезной больницы в сельском поселке Куркийоки, где проработал больше двух лет.

Вся дальнейшая научная деятельность Л.Г. Магазаника неразрывно связана с Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. Когда в 1956 г. под руководством академика Л.А. Орбели в Ленинграде был создан этот но-

вый академический Институт, профессор М.Я. Михельсон пригласил своего бывшего студента в новую лабораторию в качестве старшего лаборанта с высшим образованием. Основной задачей организованной М.Я. Михельсоном лаборатории сравнительной фармакологии и биохимии медиаторных систем было применение биологически активных веществ в качестве инструментов исследования процессов синаптической передачи.

Молекулярные процессы холинергической передачи стали предметом изучения Л.Г. Магазаника и темой кандидатской диссертации, защита которой состоялась в 1960 г. Анализ молекулярных механизмов синаптической передачи потребовал существенного расширения методических приемов, в том числе использования микроэлектродной техники для регистрации и анализа электрической активности мышечных и нервных клеток. Научная группа (позднее преобразованная в лабораторию), созданная под руководством Л.Г. Магазаника в 1970 г., активно включилась в решение этих задач. Исследования, проведенные с серией новых веществ в лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН, привели к открытию новых молекулярных механизмов их действия на холинергическую передачу. Этот цикл работ был в 1989 г. удостоен Государственной премии СССР.

В 1990-е годы научные интересы Л.Г. Магазаника смещаются в сторону изучения глутаматергической передачи. Усилия лаборатории в этот период направлены на исследование особенностей молекулярной структуры и функций основных подтипов глутаматных рецепторов. В результате были разработаны принципы молекулярного дизайна селективных каналоблокаторов ионотропных рецепторов глутамата и предложены новые высокоэффективные соединения, которые в настоящее время широко используются во всем мире. Сейчас научные интересы академика Л.Г. Магазаника лежат в области изучения патофизиологических механизмов эпилепсии, связанных с нарушениями синаптической передачи.

Академик Л.Г. Магазаник пользуется большим авторитетом во всем мире, он работал в научных лабораториях университетов Парижа (1990–1991), Женевы (1993), Ноттингема (1994–1995) и Мюнхена (1998), его соавторы – исследователи более чем из десятка стран. Л.Г. Магазаник – профессор медицинского факультета СПбГУ, его лекции по физиологии студенты очень ценят и никогда не пропускают. Под его руководством защищено 3 докторские и 13 кандидатских диссертаций. Эрудиция, интеллект и широта взглядов Льва Гиршевича вдохновляет всех, кто с ним общается.

Научные и педагогические заслуги Л.Г. Магазаника получили достойную оценку. Л.Г. Магазаник является почетным профессором Казанского медицинского университета (2001), награжден орденом Дружбы (2002) и премией имени Л.А. Орбели (2016). С 2016 г. является академиком РАН.

Коллектив Института, редакция Журнала, друзья и коллеги сердечно поздравляют Льва Гиршевича с юбилеем, желают ему здоровья и дальнейших успехов. А авторы этого тематического выпуска "Биофизика синаптических процессов" посвящают свои статьи нашему дорогому юбиляру! РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 403-416

= обзоры ==

КАНАЛОБЛОКАТОРЫ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА

© 2021 г. Д. Б. Тихонов*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: denistikhonov2002@yahoo.com

> Поступила в редакцию 15.01.2021 г. После доработки 26.01.2021 г. Принята к публикации 26.01.2021 г.

Глутаматергическая передача отвечает за большинство возбуждающих синаптических процессов ЦНС позвоночных. Глутаматергические синапсы участвуют в подавляющем большинстве физиологических и патологических процессов, и их модуляция оказывает непосредственное влияние практически на все функции мозга. Неудивительно, что разработка и исследования действия препаратов, способных воздействовать на глутаматергический синапс, являлась и является одной из приоритетных задач нейрофармакологии. Дать даже краткий обзор по этой комплексной проблеме — задача, не решаемая в рамках одной статьи, поэтому в обзоре представлены данные только по одной из тем, а именно по лигандам ионотропных рецепторов глутамата, которые непосредственно блокируют ионные поры этих каналов.

Ключевые слова: синаптическая передача, ионотропные рецепоры, блокада канала, лиганд-рецепторные взаимодействия

DOI: 10.31857/S0869813921040142

СТРОЕНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Семейство ионотропных рецепторов глутамата делится на три основных подтипа по названию избирательных агонистов, это NMDA-рецепторы, активируемые N-метил-D-аспарагиновой кислотой, AMPA-рецепторы, активируемые α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислотой и каинатные рецепторы, активируемые каиновой кислотой [1]. Все эти типы глутаматных рецепторов представляют из себя тетрамеры, состоящие из гомологичных субъединиц. Особенностью NMDA-рецепторов является высокая проницаемость для кальция и блокада поры канала магнием, что обуславливает особую роль NMDA-рецепторов в процессах синаптической пластичности [2]. Каналообразующий домен функционального тетрамера образован всеми четырьмя субъединицами, окружающими ионную пору. Этот домен гомологичен и структурно подобен каналов (рис. 1а), в которое входят также калиевые каналы, потенциал-управляемые натриевые и кальциевые каналы, каналы TRP-рецепторов и каналы, управляемые циклическими нуклеотидами [3].

Пространственная организация ионных каналов глутаматных рецепторов (рис. 1b, с) интенсивно изучалась на протяжении трех последних десятилетий. В 90-е годы 20-го века развитие представлений об их строении было связано с мо-



Рис. 1. Принципиальное строение ионтропных рецепторов глутамата. (а) трансмембранная укладка субъединиц потенциал-управляемых каналов (слева) и каналов глутаматных рецепторов (справа). Консервативный каналообразующий мотив спираль–петля–спираль показан серым цветом. (b) и (c) строение каналообразующего домена глутаматного рецептора. (b) вид в плоскости мембраны, (c) "боковая" проекция, параллельная оси канала. Показано расположение трансмембранных спиралей, ворот канала, селективного фильтра и N/Q/R сайта.

лекулярно-биологическими подходами. Была установлена тетрамерная организация, трансмембранная топология субъединиц, выявлены каналообразующие сегменты и конкретные остатки, формирующие селективный фильтр каналов, который играет ключевую роль и в связывании каналоблокаторов [4–11]. К концу десятилетия была окончательно верифицирована концепция структурной гомологии каналов глутаматных рецепторов и других членов семейства Р-loop каналов [12]. Каналообразующая часть каждой субъединицы состоит из двух трансмембранных альфа-спиралей (М1 и М3), между которыми расположена внутримембранная М2 петля (P-loop), N-концевая часть которой также имеет спиральное строение, а С-концевая часть образует селективный фильтр. Наиболее важным является позиция вблизи изгиба M2 сегмента (рис. 1с). Данную позицию называют "N/Q/R" сайтом. Каналы NMDA-рецепторов имеют в этом сайте остаток аспарагина (N), который и отвечает за высокую проницаемость для кальция и чувствительность к магнию. Свойства АМРА и каинатных каналов зависят от субъединичного состава: в части субъединиц остаток глутамина (Q) определяет умеренную проводимость и кальциевую проницаемость, а присутствие субъединиц, содержащих остаток аргинина (R), резко уменьшает проводимость и кальциевую проницаемость [1].

В 2000-е годы публикация рентгеновских структур калиевых каналов [13] открыла возможность для широкого использования гомологического моделирования всех каналов P-loop семейства и, в частности, каналов глутаматных рецепторов [14–17]. Использование этого подхода заключается не только в непосредственном построении молекулярных моделей с использованием структур калиевых каналов в качестве структурного шаблона, но, в более широком смысле, в интерпретации разнообразных данных о каналах глутаматных рецепторов с точки зрения вероятных сходств и различий с уже известными структурами. Активно обсуждался вопрос о том, насколько велики различия в структурных деталях между калиевыми каналами и каналами глутаматных рецепторов, несмотря на принципиальную общность пространственной архитектуры. Наличие ряда консервативных остатков в гомологичных положениях указывало на то, что каналы глутаматных рецепторов должны быть весьма близки по строению к калиевым каналам. Однако ряд косвенных данных указывал на значительные различия [18–21].

Первые структуры глутаматных рецепторов [22–25] свидетельствовали в пользу предположения об их существенных структурных особенностях. Однако технические трудности препятствовали высокому разрешению структур, особенно с области M2 петли и входящего в нее селективного фильтра. Усовершенствование методик, применение криоэлектронной микроскопии и исследования комплексов AMPA-каналов со вспомогательными субъединицами (старгазин и др.) постепенно привели к появлению более точных и надежных структур [26–28], которые оказались гораздо ближе к калиевым каналам, чем предполагалось в более ранних работах. Так, в первых структурах отклонения С-альфа атомов в M2- и M3-спиралях от гомологичных им атомов в калиевых каналах составляло 3–5 Å и достигало 10 Å в области селективного фильтра. А для структур, полученных в последних работах, соответствующие значения лежат в пределах 1–3 Å [3]. Таким образом, в настоящее время можно считать доказанным, что каналам, несмотря на функциональные различия.

Детали структурных перестроек, связанных с активацией каналов, также крайне важны для исследований действия блокаторов [29]. Открытие калиевых каналов происходит за счет излома спиралей, гомологичных M3-сегментам глутаматных рецепторов в области консервативного остатка глицина [30]. Хотя рецепторы глутамата не имеют остатка глицина в гомологичном положении, многочисленные работы с использованием точечных мутаций свидетельствовали, что перестройки в M3-сегменте играют ключевую роль [31–34]. В то же время ряд данных указывал на роль селективного фильтра в активации каналов глутаматных рецепторов [35]. У других представителей семейства P-loop каналов селективный фильтр обычно участвует в медленной инактивации [36, 37], однако есть и примеры "двойных ворот" [38]. Несмотря на то, что в ряде недавних структур [39, 40] были зафиксированы конформационные изменения в M3-сегменте и селективном фильтре [40], ассоциированные с активаций каналов АМРА-рецепторов, вопрос о конкретных механизмах остается открытым.

БЛОКАТОРЫ КАНАЛОВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

В настоящее время известно множество блокаторов каналов NMDA-рецепторов. Некоторые представители этого семейства представлены на рис. 2. Наиболее известны MK-801, фенциклидин, кетамин и мемантин [41, 42]. Все эти соединения имеют гидрофобное или ароматическое ядро и протонируемую аминогруппу. Трехмерные структуры также весьма сходны, их можно представить как конус, в вершине которого расположен положительный заряд аминогруппы (рис. 2). Данная общая структура активных NMDA-блокаторов подтверждается рядом структурно-функциональных исследований [43, 44]. Множество других соединений сходной структуры также являются активными блокаторами NMDA-каналов [45]. Такая общность подразумевает строение сайта связывания в виде гидрофобной воронки, в узкой части которой находятся катионофильные полярные или заряженные группы [46]. Поликатионные соединения с вытянутой пространственной структурой также блокируют NMDA-каналы [47–49], но их активность не превосходит активность монокатионов.

Катионные блокаторы, связывающиеся внутри поры канала, находятся под воздействием мембранного поля. При входе в пору с наружной стороны, связывание катионных блокаторов усиливается за счет воздействия поля, чем глубже в поле сайт связывания, тем выше потенциалозависимость связывания, которую принято выражать величиной δ , безразмерной долей мембранного поля, которую пересекает заряд блокатора между наружной поверхностью и сайтом связывания [50]. Особо сильную потенциалозависимость имеет блокада ионами магния в силу их удвоенного заряда. В результате вольт-амперная характеристика NMDA-активируемых токов в присутствии физиологических концентраций магния имеет участок "отрицательного сопротивления", то есть при потенциалах -30 мВ и ниже ток ослабляется при гиперполяризации за счет блокады ионами магния [51, 52]. Именно этот эффект определяет специфическую роль NMDA-рецепторов в процессах синаптической передачи и синаптической пластичности. Поскольку органические блокаторы связываются в канале с тем же сайтом, они конкурируют за связывание с магнием. Это приводит к тому, что активность и потенциалозависимость действия блокаторов, измеренные в безмагниевой среде, не соответствуют тому, что наблюдается в физиологических условиях [53-55].

Еще одна сложность, выявляющаяся при изучении действия блокаторов NMDA-каналов, состоит в их неоднозначном взаимодействии с воротным механизмом канала. Поскольку сайт связывания находится в глубине канала в области селективного фильтра (N/Q/R сайт), доступ с наружной стороны возможен только в состоянии, когда канал открыт. Внутренняя полость между селективным фильтром и воротами достаточно велика, чтобы канал мог закрыться, когда блокатор находится в нутри. Молекула блокатора, таким образом, оказывается в "ловушке" (trapping) и не может покинуть канал, пока он не откроется снова. Действительно, ряд блокаторов, таких как MK-801, кетамин и фенциклидин, действуют по механизму "ловушки" [41]. Однако и для блокаторов этого типа наблюдается влияние на воротный механизм [56]. Есть совершенно другой тип взаимодействия, при ко-



Рис. 2. Пространственные структуры типичных блокаторов NMDA-каналов. Для каждой молекулы даны две проекции. Стрелками показан поворот структур. Мемантин, MK-801 и фенциклидин в одной из проекций имеют конусообразную форму с аминогруппой в вершине. У 9-аминоакридина плоская структура за счет сопряженных ароматических колец.

тором связывание блокатора препятствует закрытию ворот. Такой механизм получил название "foot-in-the-door". К таким "неловушковым" блокаторам относятся тетраалкиламмониевые соединения больших размеров [57], которые просто стерически не помещаются в полость закрытого канала. Длинные дикатионные блокаторы, терминальные группы которых не могут пройти внутрь селективного фильтра, также препятствуют закрытию ворот [58]. Наиболее интересным представляется "неловушковый" механизм действия 9-аминоакридина, такрина и ряда их производных [59–62]. Их стерический размер не превосходит размеров классических ловушковых блокаторов, но они имеют плоскую структуру из сопряженных ароматических колец. Возможно, такие молекулы связываются с каналом в виде димеров, образуемых за счет стекинг взаимодействия. Описаны и промежуточные случаи "частичной ловушки", когда связывание блокатора затрудняет закрытие канала, но не препятствует ему полностью [63]. Классическим представителем этой группы является мемантин [64]. Блокаторы "foot-in-the-door" имеют важную особенность действия. За счет того, что блокированный канал не может перейти в закрытое состояние, равновесие между закрытыми и открытыми каналами в реакции активации смещается в сторону открытых каналов. Этот эффект снижает действие блокаторов, определяемое по уменьшению ионных токов. Данный компенсаторный эффект тем меньше, чем больше каналов уже открыто, то есть ингибирование токов усиливается при увеличении концентрации агониста.

Таким образом, действие блокаторов NMDA каналов определяется не только их сродством, но и рядом тонких характеристик механизма действия, которые по-разному проявляются в экспериментах разных типов, а также в физиологических и патологических условиях.

БЛОКАТОРЫ КАНАЛОВ АМРА- И КАИНАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Ионные каналы рецепторов АМРА- и каинатного типов резко отличаются от NMDA-каналов по чувствительности к каналоблокаторам. Кальций-непроницаемые каналы, в состав которых входят субъединицы, имеющие остаток аргинина в селективном фильтре, практически не блокируются органическими катионами. Известные блокаторы этих каналов электронейтральны, как, например, пентобарбитал [65, 66]. Это неудивительно, поскольку боковая цепь аргинина заряжена положительно и отталкивает катионные частицы. Однако и каналы, в селективном фильтре которых содержатся остатки глутамина, также не блокируются большинством активных блокаторов NMDA-каналов. Это относится прежде всего к соединениям, имеющим компактное пространственное строение. Напротив, соединения с удлиненной пространственной структурой (рис. 3), такие как полиамины, полиамин-содержащие токсины и дикатионные аналоги блокаторов NMDA-каналов являются эффективными АМРА-блокаторами [45-47, 67, 68]. Очевидно, что сайт связывания блокаторов в каналах АМРА-рецепторов отличается от аналогичного сайта в каналах NMDA-рецепторов. Гидрофобный и катион-связывающий компоненты пространственно разнесены [46]. Поэтому наиболее эффективны те соединения, у которых гидрофобная "голова" и терминальная аминогруппы расположены на определенном расстоянии.

Блокаторы каналов АМРА- и каинатных рецепторов действуют по механизму "ловушки", то есть остаются в полости после закрытия. Однако у них есть своя особенность. Просвет канала в АМРА- и каинатных рецепторах существенно шире, чем в каналах NMDA-рецепторов. Поэтому многие блокаторы могут проходить канал насквозь, то есть после связывания они могут диссоциировать как наружу, так и вовнутрь клетки [69–71]. Такое проваливание приводит к ряду интересных феноменов. Во-первых, потенциалозависимость блокирующего действия становится немонотонной. При потенциале покоя и при гиперполяризации электрическое поле мембраны проталкивает молекулу блокатора внутрь, тем самым ослабляя связывание. Эффект проваливания сказывается и на механизме ловушки. При закрытии каналов выход блокатора наружу становится невозможным, но блокатор может покинуть сайт связывания за счет проникновения внутрь клетки. В результате, доля каналов, остающихся блокированными после и закрытия, уменьшается



Рис. 3. Пространственные структуры типичных блокаторов AMPA- и каинатных каналов. Все они имеют вытянутую форму, что позволяет им входить в селективный фильтр и взаимодействовать с пространственно разнесенными гидрофобной и катионсвязывающей частями.

со временем. Тот же самый эффект может приводить к зависимости блокирующего действия от концентрации агониста. За счет того, что доступ блокатора из наружной среды к сайту связывания возможен только в открытом состоянии, а диссоциация внутрь клетки сохраняется и в закрытом состоянии, блокирующее действие может усиливаться при полном открытии каналов высокими концентрациями агониста [72]. Конкретные величины эффектов сильно зависят от структур блокаторов. Очевидно, что сравнительно компактные молекулы проходят сквозь канал легче, и для них эффекты проваливания более выражены, чем для соединений с крупными гидрофобными группами.

Еще одной особенностью кальций-проницаемых AMPA- и каинатных каналов является блокада внутриклеточными полиаминами [73], в частности, эндогенным спермином, потенциалозависимое действие которого определяет эффект входного выпрямления. Вытянутые и тонкие молекулы полиаминов при действии изнутри клетки также могут проходить через канал.

В целом, как и в случае блокады NMDA-каналов, действие блокаторов на AMPA- и каинатные каналы зависят от деталей механизма действия и по-разному проявляются в разных условиях. Это создает значительные трудности при попытках предсказать действие блокаторов в сложных физиологических и патологических условиях *in vivo*, опираясь на результаты экспериментов *in vitro*. Необходимо учитывать, как активность зависит от мембранного потенциала и от паттерна активации канала.

СТРОЕНИЕ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ КАНАЛОБЛОКАТОРОВ

Существенные различия в действии блокаторов на подтипы глутаматных рецепторов порождают вопрос о соответствующих различиях в строении сайта связывания вблизи селективного фильтра. При общности архитектуры каналов эти различия порождаются, главным образом, остатками N/Q/R сайта, что было неоднократно подтверждено исследованиями с использованием точечных мутаций. На связывание блокаторов также влияют остатки в M3 спирали и ряд остатков в M2 петле. Однако



Рис. 4. Строение N/Q/R сайта и связывание каналоблокаторов. (а) и (b), остатки N/Q/R сайта в модели AMPA-канала и в криоэлектронной структуре (PDB код 6qkc). (c), гомологичные N/Q/R сайту остатки в кальциевом канале (PDB код 6kzp). Вид в плоскости мембраны. Во всех структурах наличествует циклическая организация водородных связей. d и е, сравнение связывания MK-801 в канале NMDA-рецептора (d) и IEM-1460 в канале AMPA-рецептора (e) в модели (серый цвет) и в современных экспериментальных структурах (черный цвет) их комплексов с каналами (PDB коды 5un1 и 6dm0). Вид параллельный оси канала (сбоку).

только для остатков N/Q/R сайта замены аминокислот приводят к изменениям в чувствительности, которые полностью или частично воспроизводят свойства каналов, для которых эти аминокислоты являются природными [74—76]. Почему присутствие остатка аспарагина обеспечивает чувствительность к компактным монокатионным блокаторам, а при замене на глутамин (который всего на одну метиленовую группу длиннее) эта чувствительность утрачивается? Почему более длинным остаткам глутамина соответствует более широкий просвет канала? Почему при более широком просвете канала в случае глутамина кальциевая проницаемость ниже?

Для решения этих парадоксов была предложена модель циклических водородных связей в N/Q/R сайте [14, 15, 77]. Согласно этой модели, терминальные аминогруппы боковых цепей в N/Q/R сайте образуют водородные связи со свободными карбонильными группами в соседней субъединице (рис. 4а). В этом случае более длинные боковые цепи остатков глутамина формируют цикл с большим диаметром, чем короткие остатки аспарагина. Ориентация карбонильных групп боковых цепей при этом оказывается различной. В случае остатков аспарагина они обращены в просвет канала и образуют катион-связывающее кольцо, обеспечивающее высокую кальциевую проницаемость и эффективное связывание аминогрупп блокаторов. А у остатков глутамина карбонильные группы боковых цепей ориентированы во вне поры и катион-связывающего кольца не образуют. Для эффективной блокады этих каналов необходимы более длинные молекулы с аминогруппой на конце. Эти аминогруппы проникают через достаточно широкий селективный фильтр и достигают более глубоких колец, которые, как и в калиевых каналах, образованы карбонильными группами главной цепи последующих остатков. На основании этих моделей были объяснены многие закономерности структурно-функциональных отношений в рядах каналоблокаторов [45, 78–80].

Проверка данной гипотезы могла бы быть осуществлена за счет структур высокого разрешения, получаемых методами ренгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. К сожалению, как уже упоминалось выше, даже современные структуры не дают точного ответа на вопрос о деталях строения N/Q/R сайта глутаматных рецепторов. Специфические водородные связи остатков в данном положении действительно обнаруживаются (рис. 4b, c) и в глутаматных каналах [27] и в других представителях семейства P-loop [81], но их точный характер продолжает оставаться предметом дискуссий и дальнейших структурных исследований. Что касается общих черт связывания каналоблокаторв, то в современных экспериментальных структурах [26, 82] они соответствуют более ранним предсказаниям, сделанным на основании анализа экспериментов с использованием точечных мутаций, структурно-функциональных отношений и их анализа при помощи компьютерного моделирования (рис. 4d, е).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная фармакология располагает достаточно большим набором блокаторов ионных каналов ионотропных рецепторов глутамата, характеристики действия которых надежно изучены. Тем не менее, большинство каналоблокаторов не нашли практического применения в медицине. Основная причина в том, что блокада глутаматных рецепторов, осуществляющих основную возбуждающую передачу в ЦНС, сильно влияет на нормальные нейрофизиологические процессы и, следовательно, вызывают неприемлемые побочные эффекты. Классический пример диссоциативные анестетики, являющиеся активными блокаторами NMDA-каналов. Одним из исключений является мемантин, который не вызывает серьезных побочных эффектов и используется для улучшения когнитивных способностей при болезни Альцгеймера и других нарушений [83]. Кетамин был первоначально разработан и использовался как анестетик, однако в последнее время считается перспективным как быстрый антидепрессант [84].

Несмотря на большое количество исследований остается неизвестным, какие особенности определяют специфику действия разных каналоблокаторов. Простой перенос данных, получаемых в экспериментах *in vitro*, на сложные переменные условия, в которых каналы глутаматных рецепторов работают *in vivo* в норме и патологии, не представляется возможным. Поэтому в последнее время значительное внимание исследователей уделяется изучению действия блокаторов каналов и иных лигандов в моделях различных состояний и процессов [53, 85–87], в том числе патологических. Данные исследования помогают выявить особенности действия фармакологическую толерантность и эффективность.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликты интересов, связанных с публикацией данной статьи, отсутствуют.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет государственного бюджета в рамках госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. 62(3): 405–496. https://doi.org/10.1124/pr.109.002451
- 2. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis SF (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. J. Gen. Physiol. 150(8): 1081–1105.
 - https://doi.org/10.1085/jgp.201812032
- 3. *Tikhonov D.B., Zhorov B.S.* (2020) The pore domain in glutamate-gated ion channels: Structure, drug binding and similarity with potassium channels. Bioch. Biophys. Biomembr. 1862(10): 183401.

https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183401

- Bennett J.A., Dingledine R. (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. Neuron. 14(2): 373–384. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90293-7
- 5. Hollmann M., Maron C., Heinemann S. (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. Neuron. 13(6): 1331–1343. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90419-7
- 6. *Kuner T., Wollmuth L.P., Karlin A., Seeburg P.H., Sakmann B.* (1996) Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. Neuron. 17(2): 343–352.

https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80165-8

- Laube B., Kuhse J., Betz H. (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. J. Neurosci. 18(8): 2954–2961. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-02954.1998
- Mano I., Teichberg V.I. (1998) A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptorchannel complex. Neuroreport. 9(2): 327–331. https://doi.org/10.1097/00001756-199801260-00027
- 9. Panchenko V.A., Glasser C.R., Mayer M.L. (2001) Structural similarities between glutamate receptor channels and K(+) channels examined by scanning mutagenesis. J. Gen. Physiol. 117(4): 345–360.
- https://doi.org/10.1085/jgp.117.4.345
- Rosenmund C., Stern-Bach Y., Stevens C.F. (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. Science. 280(5369): 1596–1599. https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1596
- Wo Z.G., Oswald R.E. (1995) Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. Trends Neurosci. 18(4): 161–168. https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93895-5
- 12. Zhorov B.S., Tikhonov D.B. (2004) Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. J. Neurochem. 88(4): 782–799. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02261.x
- Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A, Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. Science. 280(5360): 69–77. https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69
- Tikhonov D.B., Mellor J.R., Usherwood P.N., Magazanik L.G. (2002) Modeling of the pore domain of the GLUR1 channel: homology with K+ channel and binding of channel blockers. Biophys. J. 82(4): 1884–1893. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75538-0
- 15. *Tikhonov D.B.* (2007) Ion channels of glutamate receptors: structural modeling. Mol. Membr. Biol. 24(2): 135–147.
 - https://doi.org/10.1080/09687860601008806
- 16. Kaczor A.A., Kijkowska-Murak U.A., Kronbach C., Unverferth K., Matosiuk D. (2009) Modeling of glutamate GluR6 receptor and its interactions with novel noncompetitive antagonists.

J. Chem. Informat. Modeling. 49(4): 1094–1104. https://doi.org/10.1021/ci900033m

- Kaczor A.A., Kijkowska-Murak U.A., Matosiuk D. (2008) Theoretical studies on the structure and symmetry of the transmembrane region of glutamatergic GluR5 receptor. J. Med. Chem. 51(13): 3765–3776. https://doi.org/0.1021/jm7011694
- Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V., Wollmuth L.P. (2003) Different gating mechanisms in glutamate receptor and K⁺ channels. J. Neurosci. 23(20): 7559–7568. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-20-07559.2003
- Sobolevsky A.I., Rooney L., Wollmuth L.P. (2002) Staggering of subunits in NMDAR channels. Biophys. J. 83(6): 3304–3314. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75331-9
- 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. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00560-8
- Hoffmann J., Villmann C., Werner M., Hollmann M. (2006) Investigation via ion pore transplantation of the putative relationship between glutamate receptors and K⁺ channels. Mol. Cell. Neurosci. 33(4): 358–370. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.08.004
- 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. https://doi.org/10.1038/nature08624
- Yelshanskaya M.V., Li M., Sobolevsky A.I. (2014) Structure of an agonist-bound ionotropic glutamate receptor. Science. 345(6200): 1070–1074. https://doi.org/10.1126/science.1256508
- 24. Karakas E., Furukawa H. (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. Science. 344(6187): 992–997. https://doi.org/10.1126/science.1251915
- Durr K.L., Chen L., Stein R.A., De Zorzi R., Folea I.M., Walz T., McHaourab H.S., Gouaux E. (2014) Structure and dynamics of AMPA receptor GluA2 in resting, pre-open, and desensitized states. Cell. 158(4): 778–792. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.023
- 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 e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.027
- 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) https://doi.org/10.1126/science.aav9011
- Zhao Y., Chen S., Swensen A.C, Qian W.J., Gouaux E. (2019) Architecture and subunit arrangement of native AMPA receptors elucidated by cryo-EM. Science. 364(6438): 355–362. https://doi.org/10.1126/science.aaw8250
- Phillips M.B., Nigam A., Johnson J.W. (2020) Interplay between Gating and Block of Ligand-Gated Ion Channels. Brain Sci. 10(12). https://doi.org/10.3390/brainsci10120928
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. Nature. 417(6888): 523–526. https://doi.org/10.1038/417523a
- Chang H.R., Kuo C.C. (2008) The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. J. Neurosci. 28(7): 1546–1556. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3485-07.2008
- 32. Zuo J., De Jager P.L., Takahashi K.A., Jiang W., Linden D.J, Heintz N. (1997) Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. Nature. 388(6644): 769–773.
 - https://doi.org/10.1038/42009
- 33. Kashiwagi K., Masuko T., Nguyen C.D., Kuno T., Tanaka I., Igarashi K., Williams K. (2002) Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. Mol. Pharmacol. 61(3): 533–545. https://doi.org/10.1124/mol.61.3.533
- 34. Yuan H., Erreger K., Dravid S.M., Traynelis S.F. (2005) Conserved structural and functional control of N-methyl-D-aspartate receptor gating by transmembrane domain M3. J. Biol. Chem. 280(33): 29708–29716. https://doi.org/10.1074/jbc.M414215200
- 35. Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V., Wollmuth L.P. (2005) State-dependent changes in the electrostatic potential in the pore of a GluR channel. Biophys. J. 88(1): 235–242. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049411

- 36. Berneche S., Roux B. (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. Structure. 13(4): 591–600. https://doi.org/10.1016/j.str.2004.12.019
- Liu Y., Jurman M.E., Yellen G. (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K+ channel during gating. Neuron. 16(4):859–867. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80106-3
- Cao E., Liao M., Cheng Y., Julius D. (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. Nature. 504(7478): 113–118. https://doi.org/10.1038/nature12823
- 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 e1214.
 - https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.045
- 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. https://doi.org/10.1038/nature23479
- 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. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018396
- Bormann J. (1989) Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. Eur. J. Pharmacol. 166(3): 591–592. https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90385-3
- 43. Kroemer R.T., Koutsilieri E., Hecht P., Liedl K.R., Riederer P., Kornhuber J. (1998) Quantitative analysis of the structural requirements for blockade of the N-methyl-D-aspartate receptor at the phencyclidine binding site. J. Med. Chem. 41(3): 393–400. https://doi.org/10.1021/jm9704412
- 44. Manallack D.T., Wong M.G., Costa M., Andrews P.R., Beart P.M. (1998) Receptor site topographies for phencyclidine-like and sigma drugs: predictions from quantitative conformational, electrostatic potential, and radioreceptor analyses. Mol. Pharmacol. 34(6): 863–879.
- 45. Bolshakov K.V., Kim K.H., Potapjeva N.N., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Usherwood P.N.R., Mellor I.R., Magazanik L.G. (2005) Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors. Neuropharmacology. 49(2): 144–155. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.02.007
 - https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.02.007
- 46. Bolshakov K.V., Tikhonov D.B., Gmiro V.E, Magazanik L.G. (2000) Different arrangement of hydrophobic and nucleophilic components of channel binding sites in N-methyl-D-aspartate and AMPA receptors of rat brain is revealed by channel blockade. Neurosci. Lett. 291(2): 101–104. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01386-0
- Brackley P.T., Bell D.R., Choi S.K., Nakanishi K., Usherwood P.N. (1993) Selective antagonism of native and cloned kainate and NMDA receptors by polyamine-containing toxins. J. Pharmacol. Exp. Ther. 266(3): 1573–1580.
- Antonov S.M., Johnson J.W., Lukomskaya N.Y., Potapyeva N.N., Gmiro V.E., Magazanik L.G. (1995) Novel adamantane derivatives act as blockers of open ligand-gated channels and as anticonvulsants. Mol. Pharmacol. 47(3): 558–567.
- Bolshakov V., Gapon S.A., Magazanik L.G. (1991) Different types of glutamate receptors in isolated and identified neurones of the mollusc *Planorbarius corneus*. J. Physiol. 439: 15–35. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018654
- Tikhonov D.B., Magazanik L.G. (1998) Voltage dependence of open channel blockade: onset and offset rates. J. Membr. Biol. 161(1): 1–8. https://doi.org/10.1007/s002329900309
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature. 307(5950): 462–465. https://doi.org/10.1038/307462a0
- 52. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature. 309(5965): 261–263. https://doi.org/10.1038/309261a0
- Kotermanski S.E., Johnson J.W. (2009) Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. J. Neurosci. 29(9): 2774–2779. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3703-08.2009
- Nikolaev M.V., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. (2012) Influence of external magnesium ions on the NMDA receptor channel block by different types of organic cations. Neuropharmacology. 62(5–6): 2078–2085.
 - https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.029
- 55. Otton H.J., Lawson McLean A., Pannozzo M.A., Davies C.H., Wyllie D.J. (2011) Quantification of the Mg2+-induced potency shift of amantadine and memantine voltage-dependent block in human recombinant GluN1/GluN2A NMDARs. Neuropharmacology. 60(2–3): 388–396. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.008

- Blanpied T.A., Clarke R.J., Johnson J.W. (2005) Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. J. Neurosci. 25(13): 3312–3322. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4262-04.2005
- 57. Sobolevsky A.I, Koshelev S.G., Khodorov B.I. (1999) Probing of NMDA channels with fast blockers. J. Neurosci. 19(24): 10611–10626. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-24-10611.1999
- Antonov S.M., Johnson J.W. (1996) Voltage-dependent interaction of open-channel blocking molecules with gating of NMDA receptors in rat cortical neurons. J. Physiol. 493 (Pt 2): 425–445. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021394
- 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 (Pt 2): 367– 384.
 - https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020591
- Barygin O.I., Gmiro V.E., Kim K.K., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. (2009) Blockade of NMDA receptor channels by 9-aminoacridine and its derivatives. Neurosci. Lett. 451(1): 29–33. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.12.036
- Vorobjev V.S., Sharonova I.N. (1994) Tetrahydroaminoacridine blocks and prolongs NMDA receptor-mediated responses in a voltage-dependent manner. Eur. J. Pharmacol. 253(1–2): 1–8. https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90750-1
- Bolshakov K.V., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. (2003) Determinants of trapping block of N-methyl-D-aspartate receptor channels. J. Neurochem. 87(1): 56–65. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01956.x
- Mealing G.A., Lanthorn T.H., Small D.L., Murray R.J., Mattes K.C., Comas T.M., Morley P. (2001) Structural modifications to an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist result in large differences in trapping block. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297(3): 906–914.
- 64. 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. https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.1.309
- 65. Taverna F.A., Cameron B.R., Hampson D.L., Wang L.Y., MacDonald J.F. (1994) Sensitivity of AMPA receptors to pentobarbital. Eur. J. Pharmacol. 267(3): R3–5. https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90161-9
- 66. *Yamakura T., Sakimura K., Mishina M., Shimoji K.* (1995) The sensitivity of AMPA-selective glutamate receptor channels to pentobarbital is determined by a single amino acid residue of the alpha 2 subunit. FEBS Lett. 374(3): 412–414. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01163-9
- 67. *Tikhonov D.B., Samoilova M.V., Buldakova S.L., Gmiro V.E., Magazanik L.G.* (2000) Voltagedependent block of native AMPA receptor channels by dicationic compounds. Br. J. Pharmacol. 129(2): 265–274.
 - https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703043
- 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 (Pt 3): 655–663. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.655ba.x
- 69. *Bahring R., Bowie D., Benveniste M., Mayer M.L.* (1997) Permeation and block of rat GluR6 glutamate receptor channels by internal and external polyamines. J. Physiol. 502 (Pt 3): 575–589. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.575bj.x
- 70. Bahring R., Mayer M.L. (1998) An analysis of philanthotoxin block for recombinant rat GluR6(Q) glutamate receptor channels. J. Physiol. 509 (Pt 3): 635–650. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.635bm.x
- 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. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.014
- 72. Zaitsev A.V., Kim K.K., Fedorova I.M., Dorofeeva N.A., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. (2011) Specific mechanism of use-dependent channel block of calcium-permeable AMPA receptors provides activity-dependent inhibition of glutamatergic neurotransmission. J. Physiol. 589(7): 1587–1601.
- 73. *Bowie D.* (2018) Polyamine-mediated channel block of ionotropic glutamate receptors and its regulation by auxiliary proteins. J. Biol. Chem. 293(48): 18789–18802. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.204362
- Ferrer-Montiel A.V., Sun W., Montal M. (1995) Molecular design of the N-methyl-D-aspartate receptor binding site for phencyclidine and dizolcipine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(17): 8021–8025.
 - https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8021
- 75. Burnashev N., Schoepfer R., Monyer H., Ruppersberg J.P., Gunther W., Seeburg P.H., Sakmann B. (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA

```
receptor. Science. 257(5075): 1415–1419. https://doi.org/10.1126/science.1382314
```

- 76. Mori H., Masaki H., Yamakura T., Mishina M. (1992) Identification by mutagenesis of a Mg(2+)-block site of the NMDA receptor channel. Nature. 358(6388): 673–675. https://doi.org/10.1038/358673a0
- 77. Tikhonov D.B., Zhorov B.S., Magazanik L.G. (1999) Intersegment hydrogen bonds as possible structural determinants of the N/Q/R site in glutamate receptors. Biophys. J. 77(4): 1914–1926. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77033-5
- Nelson J.K., Frølund S.U., Tikhonov D.B., Kristensen A.S., Strømgaard K. (2009) Synthesis and biological activity of argiotoxin 636 and analogues: selective antagonists for ionotropic glutamate receptors. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 48(17): 3087–3091. https://doi.org/10.1002/anie.200805426
- 79. Andersen T.F., Tikhonov D.B., Bolcho U., Bolshakov K., Nelson J.K., Pluteanu F., Mellor I.R., Egebjerg J., Stromgaard K. (2006) Uncompetitive antagonism of AMPA receptors: Mechanistic insights from studies of polyamine toxin derivatives. J. Med. Chem. 49(18): 5414–5423. https://doi.org/10.1021/jm060606j
- Franzyk H., Grzeskowiak J.W., Tikhonov D.B., Jaroszewski J.W., Mellor I.R. (2014) The Effects of Conformational Constraints in the Polyamine Moiety of Philanthotoxins on AMPAR Inhibition. ChemMedChem. 9(8): 1725–1731. https://doi.org/10.1002/cmdc.201402109
- Zhao Y., Huang G., Wu Q., Wu K., Li R., Lei J., Pan X., Yan N. (2019) Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. Nature. 576(7787): 492–497. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1801-3
- 82. 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.
 - https://doi.org/10.1038/s41586-019-1801-3
- Alam S., Lingenfelter K.S., Bender A.M., Lindsley C.W. (2017) Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. ACS Chem. Neurosci. 8(9): 1823–1829. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00270
- Wei Y, Chang L., Hashimoto K. (2020) A historical review of antidepressant effects of ketamine and its enantiomers. Pharmacol. Biochem. Behav. 190: 172870. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172870
- Povysheva N.V., Johnson J.W. (2016) Effects of memantine on the excitation-inhibition balance in prefrontal cortex. Neurobiol. Disease. 96: 75–83. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.006
- Nikolaev M.V., Chizhov A.V., Tikhonov D.B. (2020) Molecular mechanisms of action determine inhibition of paroxysmal depolarizing shifts by NMDA receptor antagonists in rat cortical neurons. Neuropharmacology. 184: 108443. https://doi.org/
- Malkin S.L., Kim K.K., Tikhonov D.B., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2015) Statistical models suggest presence of two distinct subpopulations of miniature epscs in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. Neuroscience. 301: 508–519. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.034

Channel Blockers of Ionotropic Glutamate Receptors

D. B. Tikhonov*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia *e-mail: denistikhonov2002@yahoo.com

Glutamatergic transmission is responsible for the majority of excitatory synaptic processes in the central nervous system of vertebrates. Glutamatergic synapses are involved in the vast majority of physiological and pathological processes, and their modulation has a direct impact on almost all brain functions. It is not surprising that the development and research of drugs that can affect the glutamatergic synapses has been and is one of the priorities of neuropharmacology. To give even a brief overview of this complex problem is not a task that can be solved in a single article, so the review presents data on only one of the topics, namely, the ligands, which directly block the ion pores of glutamate-activated channels.

Keywords: synaptic transmission, ionotropic receptors, channel block, ligand-receptor interactions

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 417-435

= обзоры ==

СТРУКТУРЫ НАТРИЕВЫХ И КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ С ЛИГАНДАМИ

© 2021 г. Б. С. Жоров^{1, 2, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия ²McMaster University, Hamilton, Canada *E-mail: zhorov@mcmaster.ca

> Поступила в редакцию 08.01.2021 г. После доработки 25.01.2021 г. Принята к публикации 26.01.2021 г.

Натриевые и кальциевые каналы играют фундаментальную роль в физиологии электровозбудимых клеток. Эти каналы являются мишенями для разнообразных природных токсинов, синтетических лекарственных веществ и инсектицидов. Генетические мутации в натриевых и кальциевых каналах сопряжены с такими наследственными заболеваниями, как сердечные аритмии, эпилепсия, миотонии, повышенная или пониженная чувствительность к боли. Неудивительно, что создание селективных модуляторов натриевых и кальциевых каналов является важной задачей нейрофармакологии. В последние годы опубликованы кристаллические и крио-электронно-микроскопические структуры натриевых и кальциевых каналов и их комплексов с токсинами и лекарственными веществами. В этих работах предложено структурное объяснение многочисленным экспериментальным данным, накопленным в предыдущие десятилетия. В настоящем обзоре рассмотрены комплексы натриевых и кальциевых каналов с токсинами и лекарственными веществами. Описаны некоторые компьютерные модели таких комплексов. Обсуждается возможная роль токонесущих катионов и мест их связывания в действии некоторых лигандов.

Ключевые слова: агонисты, антагонисты, кристаллография, крио-ЭМ структуры, лиганд-рецепторные взаимодействия, молекулярные модели, токсины **DOI:** 10.31857/S0869813921040178

введение

Потенциал-зависимые натриевые и кальциевые каналы играют фундаментальную роль в физиологии электровозбудимых клеток. Вход ионов натрия обеспечивает восходящую фазу потенциала действия. Вход ионов кальция запускает различные процессы, включая высвобождение нейромедиаторов, секрецию гормонов, транскрипцию генов, и формирование памяти. Эти каналы являются мишенями для различных природных токсинов [1], лекарственных и наркотических веществ [2, 3] и инсектицидов [4]. Геном человека кодирует 9 изоформ натриевых каналов

Принятые сокращения: BTX – батрахотоксин; CavAb – кальций-селективный мутант канала NavAb; Cav1.x – кальциевые каналы L-типа; µCTX – µ-конотоксин; Nav1.x – потенциал-зависимые натриевые каналы эукариот; NavAb и NavMs – прокариотические натриевые каналы; NavPaS – натриевый канал таракана; PyR1, PyR2 – рецепторы пиретроидных инсектицидов; S₁, S₁₁, S₁₁₁ – сайты связывания токонесущих ионов во внешней поре каналов; STX – сакситоксин; TTX – тегродотоксин; VTD – вератридин; ПД – поровый домен; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; ЭМ – электронная микроскопия



Рис. 1. Сайты связывания лигандов натриевых и кальциевых каналов. (а) Топология каналов (оранжевые сегменты в ПЧД и голубые сегменты в ПД). Римские цифры обозначают повторы в каналах эукариот (субъединиц в каналах прокариот). Стрелки указывают места связывания лигандов натриевых и кальциевых (красный шрифт) каналов. (b) Вид сбоку канала NavAb без двух субъединиц. Красные кружки обозначают С=О группы на границе внешней поры. Спирали окрашены как на (а). (c) Вид модели (b) из цитоплазмы. На панели (c) субъединицы I, II, III и IV показаны, соответственно, розовым, желтым, зеленым и серым цветом. Такими же цветами показаны повторы I, II, III и IV на рис. 2–6.

(Nav1.x) и 10 изоформ кальциевых каналов (Cav1.x, Cav2.x, Cav3.x). Основной мишенью для лекарств и токсинов является α-субъединица, образованная полипептидной цепью из четырех гомологичных повторов (рис. 1a), создающих пору в мембране (рис. 1b, c), которая избирательно проницаема для соответствующих ионов. Каждый повтор содержит шесть трансмембранных спиральных сегментов (S1–S6), соединенных внеклеточными и внутриклеточными петлями. Внутренняя, выстилающая пору спираль (S6), наружная спираль (S5) и частично погруженная в мембрану внеклеточная петля (P) между S5 и S6 образуют сектор (четвертую часть) порового домена (ПД). P-петля содержит нисходящую (P1) и восходящую (P2) спирали. Заместители между P1 и P2 вносят вклад в селективный фильтр.

Трансмембранная топология α-субъединицы натриевых и α1-субъединицы кальциевых каналов идентична, и основные различия имеются во внеклеточной и цитоплазматических частях. В каждом повторе спирали S1–S4 образуют потенциал-чувствительный домен (ПЧД). Таким образом, α-субъединица имеет один ПД и четыре ПЧД. Непосредственно потенциал-чувствительными элементами являются спирали S4, содержащие положительно заряженные остатки аргинина или лизина. Селективный фильтр натриевых каналов образован заместителями Asp, Glu, Lys и Ala в повторах I, II, III и IV соответственно (кольцо DEKA). Второе, наружное кольцо EEDD образовано заместителями Glu, Glu, Asp и Asp в повторах I, II, III и IV соответственно. Селективный фильтр кальциевого канала образован четырьмя остатками глутамата (кольцо EEEE). Пора канала делится на две части, разделенные селективным фильтром: внешнюю пору, обращенную во внеклеточное пространство, и внутреннюю пору, которая в открытом канале соединена с цитоплазмой. Во внешней поре различают по крайней мере три сайта связывания токонесущих катионов: наружный сайт S_{II}, сайт S_{II} у селективного фильтра и сайт S_{III} на границе внешней и внутренней поры, образованный карбонильными группами основной цепи.

Натриевые и кальциевые каналы могут находиться в открытом, закрытом и нескольких инактивированных состояниях. В невозбужденной клетке мембрана гиперполяризована, спирали S4 электростатически притянуты к ее цитоплазме и ПД находится в закрытом состоянии. При деполяризации мембраны ПЧД переходят в энергетически предпочтительные состояния со спиралями S4, смещенными во внеклеточном направлении. Это смещение передается через линкеры S4–S5 (L45) к спиралям S5 и плотно прилегающим к ним спиралям S6. С-концевые половины последних расходятся так, что активационные ворота, образованные гидрофобными заместителями, открываются, и через пору внутрь клетки идет поток ионов. Через несколько миллисекунд после активации натриевый канал переходит в состояние быстрой инактивации благодаря тому, что трипептид IFM в цитоплазматическом линкере между повторами III и IV связывается с гидрофобными заместителями спиралей IIIS5, IIIS6, IVS5 и IVS6. Трипептид IFM не блокирует пору [5], но смещает спирали IIIS6 и IVS6 так, что активационные ворота закрываются. При длительной деполяризации мембраны (сотни миллисекунд) натриевый канал переходит в состояние медленной инактивации, которая происходит за счет конформационных изменений вблизи селективного фильтра [6]. У кальциевых каналов наблюдаются потенциал-зависимая [7] и кальций-зависимая [8] инактивация.

Архитектура потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов имеет много общего с калиевыми каналами, однако последние образованы четырьмя независимыми субъединицами. Все эти каналы относятся к суперсемейству Р-петлевых каналов, которое также включает ионотропные глутаматные рецепторы и другие тетрамерные каналы, имеющие общий фолдинг Р-петли. У всех этих каналов селективный фильтр находится в наружной поре между четырьмя Р-петлями.

В отсутствие трехмерных структур ионных каналов их взаимодействия с лекарствами и токсинами изучались с помощью таких методов, как анализ связи структура-активность лигандов, мутации белков и электрофизиологические измерения. Первая кристаллическая структура прокариотического калиевого канала KcsA, опубликованная в 1998 г. [9], показала общую архитектуру ПД у Р-петлевых каналов. За эту работу и последующие структурные исследования ионных каналов в 2003 г. Мак-Киннон получил Нобелевскую премию по химии. Первая кристаллическая структура бактериального потенциал-чувствительного канала NavAb опубликована в 2011 г. [10]. В 2015 г. опубликована первая крио-ЭМ структура эукариотического кальциевого канала [11]. За прошедшие четыре года опубликованы десятки кристаллических и крио-ЭМ структур Р-петлевых каналов с различными лекарственными веществами и токсинами. Ниже рассмотрены некоторые экспериментальные структуры и теоретическими модели натриевых и кальциевых каналов с лигандами.

1. НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ

1.1. Тетродотоксин. Механизм действия ТТХ и STX рассмотрен в ряде обзоров, например [12, 13]. Исследования взаимодействий мутантов канала и производных

TTX и STX позволили установить попарные контакты между химическими группами токсинов и заместителями в кольцах DEKA и EEDD внешней поры канала [14]. Используя эти данные, Lipkind и Fozzard предложили структурную модель рецепторов TTX и STX [15] за четыре года до публикации первой кристаллической структуры Р-петлевого канала KcsA [9]. В этой модели гуанидиновая группа TTX связывается с селективным фильтром, а гидроксильная группа образует Н-связь со вторым глутаматом кольца EEDD. При виде модели снаружи клетки повторы I, II, III и IV расположены по часовой стрелке. Это важное предсказание было подтверждено шесть лет спустя путем мутационного анализа парных взаимодействий остатков μ-конотоксина GIIIA и канала Nav1.4 [16]. Те же экспериментальные данные позднее были использованы для моделирования натриевых каналов с TTX и STX, основанного на кристаллических структурах калиевых каналов [17, 18]. При моделировании канала Nav1.4 с TTX, основанном на структуре канала NavAb, введены вставки-делеции в выровненные последовательности NavAb и Nav1.4 [19]. Сравнение с крио-ЭМ структурой канала NavPaS с TTX (рис. 2a) [11] показало, что модель [19] правильно предсказала общую ориентацию TTX в канале и конформации заместителей, образующих контакты с токсином [20].

1.2. µ-Конотоксины. Модель рецептора ТТХ [19] использована для докинга пептидных токсинов GIIIA, PIIIA и KIIIA в канал Nav1.4 [21]. При докинге GIIIA использованы энергии парных взаимодействий между заместителями канала и токсина [22, 23]. В модели GIIIA связывается с карбоксилатами кольца EEDD, которые в отсутствие токсина взаимодействуют с ионами натрия [24]. В модели [21] энергии парных взаимодействий GIIIA с Nav1.4, а также глубины погружения остатков GII-IA во внешнюю пору коррелируют с экспериментальными данными [25].

Некоторые нативные и мутантные μ-конотоксины не полностью блокируют ток [25–27]. Согласно модели [21], токсины полностью блокируют ток, если их остатки Arg и Lys образуют солевые мостики со всеми карбоксилатами кольца EEDD. Токсины с малым числом остатков Arg и Lys образуют солевые мостики не со всеми карбоксилами кольца EEDD, и ионы натрия могут проходить через внешнюю пору, хотя медленнее, чем в канале без токсина. Парадоксальны данные, что TTX и KIIIA могут одновременно связываться с натриевым каналом [28]. Согласно модели [21], TTX может "обойти" связанный в канале KIIIA и достичь рецептора во внешней поре.

Опубликованная в 2019 г. крио-ЭМ структура канала Nav1.2 с KIIIA [29] (рис. 2b) лишь частично подтвердила модель [21]. Правильно предсказано связывание токсина между внеклеточными петлями повторов I, II и III, путь для ионов натрия между токсином и повтором IV, глубина погружения токсина во внешнюю пору и ряд специфических контактов токсина и канала. Однако в модели и крио-ЭМ структуре ориентации токсина отличаются. Причина в разном фолдинге наружной части внешней поры каналов Nav1.2 и NavAb. Последний был шаблоном для построения модели Nav1.4. Близкое сходство модели TTX:Nav1.4 с крио-ЭМ структурой TTX:NavPaS объясняется идентичным фолдингом этих каналов на уровне колец DEKA и EEDD.

1.3. Пептидные токсины из яда пауков и скорпионов. Многие их этих токсинов связываются с внеклеточными петлями ПЧД, являясь тонкими инструментами исследований потенциал-чувствительных каналов. α-Токсины скорпионов [32–34], пауков [35, 36] и морских анемонов [37] замедляют инактивацию, тогда как β-токсины скорпионов фиксируют ПЧД-2 в активированном состоянии, замедляя деактивацию канала [38–40]. Мутационные и электрофизиологические исследования позволили построить модели, в которых α-токсин LqhII связывается в ПЧД-4 между внеклеточными петлями IVS1–S2 и IVS3–S4 [32], а β-токсин CssIV связывается между петлями IIS1–S2 и IIS3–S4 в ПЧД-4 и петлей IIIP2–S6 в ПД [34].



Рис. 2. Крио-ЭМ структуры натриевых каналов с токсинами. С=О группы на границе внешней поры показаны сферами. (а) Канал NavPaS с TTX [30]. С^{α} атомы боковых цепей могут отклоняться от линий, обозначающих основные цепи. (b) μ -Конотоксин KIIIA в канале Nav1.2 связан со многими заместителями, в том числе двумя карбоксилатами кольца EEDD [29]. (c) Гибридный канал NavPaS/Nav1.7 без токсина (красные цепи) и в комплексе с α -токсином скорпиона AaH2, стабилизирующем деактивированное состояние ПЧД-4, в котором спираль IVS4, смещена к цитоплазме. Один из аргининов в IVS4 показан сферами. (d) Канал NavPaS с паучьим токсином Dc1a, стабилизирующем активированное состояние ПЧД-2 [31].

В крио-ЭМ структуре гибридного канала hNav1.7/NavPaS с α-токсином из яда скорпиона AaH2 [41] последний связывается между внеклеточными петлями IVS1–S2, IVS3–S4 и IS5–P1, фиксируя ПЧД-4 в деактивированном состоянии (рис. 2с), которое энергетически невыгодно при отсутствии мембранного потенциала. Связывание токсина существенно смещает спираль IVS4 к цитоплазме (рис. 2с). При этом наблюдается значительное изменение геометрии петли IVS3–S4. Подобные перемещения спирали IIS4 видны при связывании гибридного канала NavAb/hNav1.7 с токсинами из яда пауков-птицеедов Pro-Tx2 [42] и m3-HwTx-IV [43], которые фиксируют ПЧД-2 в деактивированном состоянии.

В крио-ЭМ структуре канала NavPaS с паучьим токсином Dc1a [31] последний связывается между активированным ПЧД-2 и внеклеточной петлей IIIS5—P1, препятствуя деактивации канала и, таким образом, его нормальному гэйтингу (рис. 2d).

1.4. Низкомолекулярные блокаторы. Во внутренней поре связываются различные по структуре блокаторы, включая местные анестетики, противосудорожные и антиаритмические вещества. Катионные блокаторы включают лидокаин и объемные полужесткие молекулы, такие как кокаин и хинидин [44, 45]. Мутационный анализ показал, что рецептор этих веществ содержит фенилаланин в спирали IVS6 [46-48], остатки в спиралях IS6, IIIS6, IVS6 [49] и Р1 [50], а также в кольце DEKA. Типичные противосудорожные средства, например, фенитоин и карбамазепин – это электронейтральные молекулы с ароматическими и полярными группами [51]. Несмотря на принципиально разные химические структуры, катионные и электронейтральные вещества имеют общую область связывания во внутренней поре [44, 52] и сходные механизмы действия [53, 54]. Модели канала Nav1.4 с катионным лидокаином и электронейтральным бензокаином позволили предположить, что последний связывается с ионом натрия в поре, который не имеет прямых контактов с каналом [55]. Полностью гидратированный ион натрия в кольце из четырех карбонильных групп (C=O) на границе внешней поры виден в кристаллической структуре прокариотического канала NavMs [56, 57] (рис. 3а).

По результатам компьютерного докинга лигандов в основанную на NavMs модель Nav1.4 предложена схема общего рецептора катионных и электронейтральных блокатов, содержащая электроотрицательную и гидрофобную области (рис. 3b) [58]. Первая представляет собой вакантный сайт связывания иона натрия (S_{III}) а вторая образована фенилаланином в спирали IVS6 и другими гидрофобными группами внутренней поры. Аммониевая группа катионных блокаторов связывается с сайтом S_{III}, а полярные группы электронейтральных лигандов — с ионом натрия в сайте S_{III}. Связывание катионных лигандов с сайтом S_{III} показано в последующих расчетах методом молекулярной динамики [59, 60]. Аммониевая группа флекаинида в кристаллической структуре с каналом NavAb [61] и крио-ЭМ структуре с каналом hNav1.5 [62] также связывается с вакантным сайтом S_{III} (рис. 3c, d).

Другим примером электронейтральных блокаторов внутренней поры являются относительно новые инсектициды — метафлумизон, индоксакарб и его активный метаболит DCJW [63]. В модели открытого натриевого канала таракана эти соединения связываются во внутренней поре, взаимодействуют с ионом натрия в фокусе спиралей P1, выставляя ароматические группы в интерфейс III/IV [64]. Направляемый моделями мутагенез позволил выявить новые остатки, в том числе, специфичные для каналов насекомых [64].

В настоящее время отсутствуют экспериментальные подтверждения или опровержения модели связывания электронейтральных дигандов с ионом натрия в сайте S_{III}. Однако непрямое подтверждение этой концепции есть в работе [65], где отрицательно заряженные агонисты калиевых каналов связываются с ионом калия в месте, аналогичном сайту S_{III} в натриевых каналах.

1.5. Низкомолекулярные вещества в терапии натриевых каналопатий. Известны тысячи мутаций в каналах Nav1.x, которые связаны с различными заболеваниями [66, 67]. Такие мутации найдены во всех сегментах каналов [3, 11]. Для большинства мутаций атомные механизмы дисфункции канала неизвестны. При лечении многих каналопатий применяют лекарства [68, 69], в том числе описанные в разделе 1.4. Например, сердечные аритмии связаны с мутациями в канале Nav1.5. При лечении синдрома удлиненного интервала QT иногда используют блокаторы канала Nav1.5, включая ранолазин [70] и мексилетин [71]. Карбамазепин, фенитоин, ламотриджин и другие противосудорожные вещества, используемые при терапии



Рис. 3. Лиганды во внутренней поре натриевых каналов. (а) Кристаллическая структура (PDB ID:5hvx) прокариотического канала NavMs [57]. Ионы натрия показаны желтыми сферами. Один из ионов находится в электроотрицательном сайте S_{III} , образованном кольцом C=O групп на границе внешней поры. Боковые цепи заместителей T, V и F создают гидрофобную область во внутренней поре. (b) Схема связывания лигандов. Сайт S_{III} притягивает аммониевые группы катионных лигандов (верхний ряд) или ион натрия, который, в свою очередь, притягивает полярные группы электронейтральных лигандов (нижний ряд). Гидрофобная область во внутренней поре (серый прямоугольник) притягательна для гидрофобных групп лигандов. Воспроизведено с изменениями из [58]. (с) Модель связывания хинидина в канале Nav1.4 [58]. Аммониевая группа находится в сайте S_{III}, а гидрофобная группа связывается с фенилаланином в спирали IVS6. (d) Крио-ЭМ структура канала rNav1.5 с флекаинидом [62]. Аммониевая группа связывается в сайте S_{III}.

эпилептических синдромов, подавляют повышенную возбудимость нейронов, которая связана с дисфункцией нейрональных каналов Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 или Nav1.6. Эти же или подобные вещества применяют для лечения мигрени (мутации в Nav1.1), каналопатий скелетных мышц (мутации в Nav1.4), повышенной или пониженной чувствительности к боли (мутации в Nav1.7, Nav1.8 или Nav1.9). Экспериментальные структуры и модели комплексов каналов с лигандами используют при разработке лекарств на этапах поиска и оптимизации структур потенциальных кандидатов. Так, *in silico* скрининг миллионов химических структур [72] используют при отборе молекул для последующего экспериментальных лигандов (рис. 3b) означает, что модели каналов для компьютерного скрининга электронейтральных



Рис. 4. Модели открытого натриевого канала с агонистами. (а) Вид из цитоплазмы на батрахотоксин (BTX) во внутренней поре. Показаны только средние части спиралей S5 и S6. Полупрозрачные поверхности спиралей и BTX окрашены серым и желтым соответственно. Оранжевый ион натрия взаимодействует с атомами кислорода BTX и остатком серина в IS6. Первоначально опубликовано в [78] © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. (b) Вид сбоку на поровый домен с двумя молекулами пиретроида дельтаметрина в рецепторах PyR1 и PyR2. Каждый лиганд связывается между четырьмя спиралями (L45, S5 и две S6). Спираль IIS6 вносит вклад как в PyR1, так и в PyR2. Первоначально опубликовано в [84]; воспроизведено с разрешения ASPET.

молекул должны включать ионы, которые часто не видны в структурах низкого разрешения. Перепрофилирование известных лекарств — еще один подход к лечению каналопатий. Такие лекарства не нуждаются в дорогостоящих тестах на токсичность и другие побочные эффекты, а их структурную комплементарность к известным рецепторам в ионных каналах можно проверить на компьютерных моделях.

1.6. Стероидные и синтетические агонисты. Природный стероидный агонист (активатор) натриевых каналов, батрахотоксин (BTX), много лет используется в электрофизиологических исследованиях. Считалось, что объемная стероидная молекула связывается на границе раздела канал-липид и аллостерически активирует канал. Однако заместители, мутации которых влияют на действие ВТХ, были обнаружены во всех четырех спиралях S6, частично перекрываясь с рецептором местных анестетиков [73]. Согласно расчетам, ВТХ и другие стероидные агонисты натриевых каналов (вератридин и аконитин) могут связываться во внутренней поре, предотвращать закрытие активационных ворот, но не препятствовать ионам натрия проходить между гидрофильными группами агониста и канала [74]. Модель предсказала остатки, связывающие BTX в поре, и эксперименты подтвердили этот прогноз [75–77]. Позднее были обнаружены дополнительные остатки в спиралях S6, чувствительные к ВТХ, и была разработана модель [78], в которой подковообразный ВТХ связывается с остатками во всех четырех повторах (рис. 4а). Ионы натрия могут проходить через гидрофильную внутреннюю поверхность подковы, в то время как объемная молекула BTX препятствует закрытию активационных ворот. В этом смысле модель ВТХ в канале напоминает хирургический стент в кровеносном сосуде. Недавние эксперименты с ВТХ в прокариотическом натриевом канале позволили сделать аналогичные выводы [79]. Это свидетельствует о том, что относительно простые каналы прокариот могут быть полезны в исследованиях веществ, действующих на эукариотические каналы.

Вератридин (VTD) – токсичный стероидный алкалоид из семян некоторых растений – используется в электрофизиологических исследованиях. Мутации в спиралях IS6, IIIS6 и IVS6 влияют на действие VTD [80]. Эти данные использованы при построении модели, в которой VTD образует гидрофобные контакты с рядом заместителей в поре канала Nav1.4, включая F1579 в спирали IVS6 и F1236 (N-концевой сосед DEKA лизина), а ион натрия может проходить между полярными группами токсина и аспарагина N784 в спирали IIS6 [74]. Недавний мутационный и электрофизиологический анализ подтвердил связывание VTD в поре и образование контактов с F1579 и F1236. Упомянуто взаимодействие VTD с аспарагином N784, однако о мутирования этого остатка не сообщается. Такие данные были бы интересны, поскольку BTX блокирует канал Nav1.5 в котором гомологичный аспарагин замещен лизином [75].

Пиретроидные инсектициды (синтетические аналоги натуральных пиретринов, выделяемых из цветков ромашки пиретрума) являются избирательными агонистами натриевых каналов насекомых. Пиретроиды широко используют в борьбе с вредными членистоногими и комарами, переносящими малярию и лихорадку денге [81]. Интенсивное использование ДДТ (1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенилэтан)) и пиретроидов, привело к развитию устойчивости к этим инсектицидам у многих насекомых [4]. Этот факт стимулирует разработку новых инсектицидов. На основании экспериментальных данных построены модели натриевых каналов насекомых с двумя рецепторами пиретроидов (PyR1 и PyR2) в интерфейсах между липидами мембраны и повторами II/III и I/II соответственно [82–84]. Вероятно, для активации канала необходимо связывание лигандов как с PyR1, так и с PyR2 (рис. 4b). Также предложена модель связывания ДДТ в двух сайтах, которые перекрываются с PyR1 и PyR2 [85]. Направляемый моделями мутагенез позволил обнаружить новые остатки, чувствительные к пиретроидам и ДДТ [84, 85].

1.7. Пути доступа лигандов во внутреннюю пору. Многие лиганды попадают во внутреннюю пору натриевых каналов из цитоплазмы, и их эффект возрастает с числом и продолжительностью открытых состояний канала (частотно-зависимое действие). Однако такой путь исключен при тоническом блоке, когда уменьшенный ток наблюдается уже после первого импульса деполяризации мембраны. Анализ структурно-функциональных отношений местных анестетиков и родственных соединений позволил предположить, что некоторые соединения проникают в пору закрытого канала через гидрофобный путь, минуя цитоплазму [86]. Например, постоянно заряженные четвертичные соединения, которые не проходят сквозь мембрану, блокируют натриевые каналы сердца [87, 88]. На основании этих данных предложено, что гидрофобный путь проходит между спиралями IIIS6, IVS6 и IIIP [17]. "Протягивание" молекулы тетракаина между этими спиралями позволило построить модель тонического блока [89], при котором аммониевая группа лиганда блокирует ток, а его длинная часть остается в интерфейсе между спиралями IIIS6, IVS6 и IIIP (рис. 5a, b). В кристаллической структуре канала NavAb [10] видны широкие интерфейсы между спиралями P1 и двумя соседними спиралями S6, которые могут служить гидрофобным путем для лигандов. В последующих кристаллических структурах натриевых каналов прокариот видны молекулы физиологически активных веществ, которые частично [61] или почти полностью [90] находятся в таких интерфейсах (рис. 5c, d).

2. ЛИГАНДЫ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

Фенилалкиламины, бензотиазепины и дигидропиридины используют при лечении сердечно-сосудистых заболеваний и в физиологических исследованиях. Ранее выявлены аминокислотные остатки канала Cav1.2, мутации которых влияют на



Рис. 5. Гидрофобный путь доступа лигандов в натриевый канал проходит через интерфейсы между повторами (субъединицами). (a, b) Виды снаружи клетки (a) и со стороны мембраны (b) на модель канала Nav1.5 с тетракаином в интерфейсе между повторами III и IV [89]. (c) Вид снаружи клетки на кристаллическую структуру канала NavMs с четырьмя молекулами каннабидиола в интерфейсах между субъединицами [90]. (d) Вид со стороны мембраны на эту же структуру (три лиганда удалены для ясности). На (c) и (d) не показаны ионы натрия во внешней поре, которые видны в кристаллической структуре.

действие этих веществ [91, 92]. Эти данные использованы для построения моделей канала Cav1.2 с лигандами [93–98]. Однако точность моделей, основанных на кристаллических структурах калиевых каналов, ограничена.

Интересным парадоксом в действии дигидропиридинов является тот факт, что энантиомеры (R)-Вау к 8644 и (S)-Вау к 8644 блокируют и активируют кальциевый канал соответственно [99]. Докинг дигидропиридинов в модель канала Cav1.2 позволил предположить, что антагонисты и агонисты связываются в интерфейсе III/IV и выставляют в пору канала гидрофобную и гидрофильную группу соответственно [96]. Подобные ориентации гидрофобной и гидрофильной групп видны в крио-ЭМ структурах канала Cav1.1 с (R)-Вау к 8644 и (S)-Вау к 8644 (рис. 6а, b) [100]. Однако в моделях лиганды находятся дальше от оси поры, чем в крио-ЭМ структурах, и ориентация дигидропиридинового кольца в моделях и крио-ЭМ структурах отличается.

В кристаллах канала CavAb с дигидропиридиновыми антагонистами нимодипином (PDB ID: 5kmf) и амлодипином (PDB ID: 5kmd) лиганды связываются в интерфейсе между субъединицами, у N-концов спиралей P1 и S6, значительно сме-



Рис. 6. Вид снаружи клетки на крио-ЭМ структуры канала Cav1.1 с дигидропиридинами и верапамилом. (а) У антагониста (R)-Bay k 8644 (PDB: ID 7jpw) к поре приближена гидрофобная метокси группа. (b) У агонста (S)-Bay k 8644 (PDB ID: 7jpl) к поре приближена полярная нитро группа. У обоих лигандов эти группы не образуют контактов с аминокислотами, но могут воздействовать на вторую гидратную оболочку иона кальция во внутренней поре. (c, d) Аммониевые группы верапамила (c) и амлодипина (d) образуют солевые мостики с фосфатной группой липида (сиреневые углероды) у сайта S_{III}, где находится ион кальция (показан точками). Ближайшие к лигандам C=O группы сайта S_{III} также показаны точками для ясности.

щая ион кальция в сайте S_I по сравнению с положением в канале без дигидропиридинов [101]. Предполагается, что подобная деформация селективного фильтра объясняет аллостерический механизм модуляции кальциевых каналов дигидропиридинами [101].

Место связывания дигидропиридина UK59811 в канале CavAb зависит от его концентрации. При низкой концентрации UK59811 связывается там же, где другие антагонисты (PDB ID: 5kls). Однако при высокой концентрации UK59811 стерически блокирует пору, а его аммониевая группа находится у С-конца спирали P1 (PDB ID: 5klg), вблизи вакантного сайта S_{III}. Кристаллическая структура CavAb с эфонидипином (PDB: ID 6juh) [102] является другим примером стерического бло-

ка канала производным дигидропиридина. Однако в этом комплексе у сайта S_{III} находится сложноэфирная группа, что энергетически невыгодно, а ближайший ион кальция находится в сайте S_{II} . Не исключено, что при разрешении 3 Å ион кальция не виден в низкоафинном сайте S_{III} .

Подобная ситуация видна в кристаллической структуре канала CavAb с дилтиаземом (PDB ID: 6keb) [103], где лиганд стерически блокирует пору, но у сайта S_{III} находится его карбонильная группа, в то время как ближайший ион кальция виден в сайте S_{II}. В крио-ЭМ структуре канала Cav1.1 дилтиазем имеет существенно иную ориентацию, чем в CavAb. Его аммониевая группа находится на оси поры, ниже сайта S_{III} (PDB ID: 6jpb) [104], а выше сайта S_{III} виден ион кальция. Известно по меньшей мере четырнадцать заместителей, мутации которых влияют на связывание бензотиазепинов [97]. В крио-ЭМ структуре четыре из них находятся пределах 5 Å от дилтиазема, а в модели [97] таких заместителей восемь. Одно из отличий в положениях лиганда в модели [97] и крио-ЭМ структуре состоит в ориентации метоксифенильного фрагмента: в крио-ЭМ структуре он приближается со стороны поры к интерфейсу I/IV, а в модели он глубоко проникает в интерфейс III/IV, где находятся четыре аминокислотных заместителя, мутации которых влияют на действие дилтиазема и его аналогов. Вероятно, этот интерфейс является частью гидрофобного пути для четвертичных аналогов дилтиазема, которые не могут проходить в пору со стороны цитоплазмы. Модель канала Cav1.2, построенная на основании кристаллической структуры канала NavAb, в которой производные дилтиазема ориентированы как в работе [97], объясняет действие фоточувствительного блокатора кальциевого канала [105].

В кристалле кальциевого канала CavAb с бром-верапамилом [101] лиганд принимает "горизонтальную" ориентацию, аммониевая группа приближается к иону кальция в сайте S_{III} (что энергетически невыгодно), а нитрильная группа, являющаяся неотъемлимой частью многих фенилалкиламинов [94], не образует специфических контактов с каналом. Наблюдаемая в кристалле ориентация лиганда больше согласутся с моделью, в которой сайт S_{III} заселен не ионом кальция, а молекулой воды [106].

В крио-ЭМ структурах канала Cav1.1 с верапамилом [104] (PDB ID: 6jpa) в области сайта S_{III} находятся ион кальция и фосфатная группа липида, образующая солевой мостик с аммониевой группой верапамила (рис. 6с). Аналогичное взаиморасположение у сайта S_{III} иона кальция, фосфатной группы липида и аммониевой группы лиганда (рис. 6с) видно в крио-ЭМ структурах канала Cav3.1 с селективным блокатором Z944 [107] (PDB ID: 6kzp) и канала Cav1.1 с амлодипином [100] (рис. 6d; PDB ID: 5kmd). И хотя последняя структура получена в нанодисках, которые в определенной мере имитируют физиологические условия, маловероятно, что в живой клетке липиды могут проникать столь глубоко в пору канала и принимать непосредственное участие в блокаде тока. Такой сценарий не согласуется с многочисленными данными о связи структуры и активности лигандов кальциевых каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тетродотоксин, сакситоксин и пептидные токсины образуют множественные специфические контакты с каналами, и поэтому крио-ЭМ структуры, вероятно, близки таковым *in vivo*. Однако для низкомолекулярных лигандов возможны различные позы связывания [104]. Поэтому не исключены отличия экспериментальных структур и структур *in vivo*. Молекулы липидов и детергентов видны во многих кристаллических и крио-ЭМ структурах, однако в физиологических условиях связывание этих молекул в поре маловероятно: такие каналы не проводили бы ток.

Несмотря на сравнительно низкое разрешение и возможные артефакты, кристаллические и крио-ЭМ структуры значительно продвигают понимание механизмов действия лигандов в ионных каналах. Будущие структуры более высокого разрешения и основанные на них компьютерные модели лиганд-рецепторных комплексов будут способствовать созданию новых лекарственных веществ и инсектицидов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки в высшего образования для Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликты интересов, связанных с публикацией данной статьи, отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Stevens M., Peigneur S., Tytgat J.* (2011) Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. Front. Pharmacol. 2: 71. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00071
- Catterall W.A., Swanson T.M. (2015) Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. Mol. Pharmacol. 88: 141–150. https://doi.org/10.1124/mol.114.097659
- 3. *Catterall W.A.* (2014) Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 54: 317–338. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232
- 4. Silver K.S., Du Y., Nomura Y., Oliveira E.E., Salgado V.L., Zhorov B.S., Dong K. (2014) Voltage-Gated Sodium Channels as Insecticide Targets. Adv. In. Insect. Phys. 46: 389–433. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417010-0.00005-7
- 5. 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 beta1. Science. 362. https://doi.org/10.1126/science.aau2486
- Chatterjee S., Vyas R., Chalamalasetti S.V., Sahu I.D., Clatot J., Wan X., Lorigan G.A., Deschenes I., Chakrapani S. (2018) The voltage-gated sodium channel pore exhibits conformational flexibility during slow inactivation. J. Gen. Physiol.150: 1333–1347. https://doi.org/10.1085/jgp.201812118
- Stotz S.C., Jarvis S.E., Zamponi G.W. (2004) Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. J. Physiol. 554: 263–273. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047068
- Abderemane-Ali F., Findeisen F., Rossen N.D., Minor D.L., Jr. (2019) A Selectivity Filter Gate Controls Voltage-Gated Calcium Channel Calcium-Dependent Inactivation. Neuron. 101: 1134–1149 e1133. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.011
- 9. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science. 280: 69–77. https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69
- Payandeh J., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. Nature. 475: 353–358. https://doi.org/10.1038/nature10238
- 11. 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. 355. https://doi.org/10.1126/science.aal4326
- 12. *Moczydlowski E.G.* (2013) The molecular mystique of tetrodotoxin. Toxicon. 63: 165–183. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.026
- 13. Thottumkara A.P., Parsons W.H., Du Bois J. (2014) Saxitoxin. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53: 5760–5784.
 - https://doi.org/10.1002/anie.201308235
- 14. *Terlau H., Heinemann S.H., Stuhmer W., Pusch M., Conti F., Imoto K., Numa S.* (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. FEBS Lett. 293: 93–96. https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81159-6

- Lipkind G.M., Fozzard H.A. (1994) A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na+ channel. Biophys. J. 66: 1–13. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80746-5
- Dudley S.C., Jr., Chang N., Hall J., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J (2000) mu-conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na(+) channel predict a clockwise arrangement of the domains. J. Gen. Physiol. 116: 679–690. https://doi.org/10.1085/jgp.116.5.679
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2005) Modeling P-loops domain of sodium channel: homology with potassium channels and interaction with ligands. Biophys. J. 88: 184–197. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048173
- Lipkind G.M., Fozzard H.A. (2000) KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. Biochemistry. 39: 8161–8170. https://doi.org/10.1021/bi000486w
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2012) Architecture and pore block of eukaryotic voltage-gated sodium channels in view of NavAb bacterial sodium channel structure. Mol. Pharmacol. 82: 97–104. https://doi.org/10.1124/mol.112.078212
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2018) Predicting Structural Details of the Sodium Channel Pore Basing on Animal Toxin Studies. Front. Pharmacol. 9: 880. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00880
- 21. Korkosh V.S., Zhorov B.S., Tikhonov D.B. (2014) Folding similarity of the outer pore region in prokaryotic and eukaryotic sodium channels revealed by docking of conotoxins GIIIA, PIIIA, and KIIIA in a NavAb-based model of Nav1.4. J. Gen. Physiol. 144: 231–244. https://doi.org/10.1085/jgp.201411226
- 22. Choudhary G., Aliste M.P., Tieleman D.P., French R.J., Dudley S.C., Jr. (2007) Docking of muconotoxin GIIIA in the sodium channel outer vestibule. Channels (Austin). 1: 344–352. https://doi.org/10.4161/chan.5112
- Chang N.S, French R.J., Lipkind G.M., Fozzard H.A., Dudley S., Jr. (1998) Predominant interactions between mu-conotoxin Arg-13 and the skeletal muscle Na⁺ channel localized by mutant cycle analysis. Biochemistry. 37: 4407–4419. https://doi.org/10.1021/bi9724927
- 24. *Khan A., Romantseva L., Lam A., Lipkind G., Fozzard H.A.* (2002) Role of outer ring carboxylates of the rat skeletal muscle sodium channel pore in proton block. J. Physiol. 543: 71–84. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.021014
- McArthur J.R., Ostroumov V., Al-Sabi A., McMaster D., French R.J. (2011) Multiple, distributed interactions of mu-conotoxin PIIIA associated with broad targeting among voltage-gated sodium channels. Biochemistry. 50: 116–124. https://doi.org/10.1021/bi101316y
- Wilson M.J., Yoshikami D., Azam L., Gajewiak J., Olivera B.M., Bulaj G., Zhang M.M. (2011) mu-Conotoxins that differentially block sodium channels NaV1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 10302– 10307.

https://doi.org/10.1073/pnas.1107027108

- 27. Hui K., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J. (2002) Electrostatic and steric contributions to block of the skeletal muscle sodium channel by mu-conotoxin. J. Gen. Physiol. 119: 45–54. https://doi.org/10.1085/jgp.119.1.45
- Zhang M.M., McArthur J.R., Azam L., Bulaj G., Olivera B.M., French R.J., Yoshikami D. (2009) Synergistic and antagonistic interactions between tetrodotoxin and mu-conotoxin in blocking voltage-gated sodium channels. Channels (Austin). 3: 32–38. https://doi.org/10.4161/chan.3.1.7500
- Pan X., Li Z., Huang X., Huang G., Gao S., Shen H., Liu L., Lei J., Yan N. (2019) Molecular basis for pore blockade of human Na(+) channel Nav1.2 by the mu-conotoxin KIIIA. Science. 363 :1309–1313. https://doi.org/10.1126/science.aaw2999
- Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. (2019) Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins. Science. 363: 1303–1308. https://doi.org/10.1126/science.aaw2493
- Shen H., Li Z., Jiang Y., Pan X., Wu J., Cristofori-Armstrong B., Smith J.J., Chin Y.K.Y., Lei J., Zhou Q., King G.F., Yan N. (2018) Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. Science. 362. https://doi.org/10.1126/science.aau2596
- Wang J., Yarov-Yarovoy V., Kahn. R, Gordon D., Gurevitz M., Scheuer T., Catterall WA (2011) Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na+ channel voltage sensor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 15426–15431. https://doi.org/10.1073/pnas.1112320108
- 33. Zhang J.Z., Yarov-Yarovoy V., Scheuer T., Karbat I., Cohen L., Gordon D., Gurevitz M., Catterall W.A. (2011) Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domain II

of voltage-gated sodium channels. J. Biol. Chem. 286: 33641–33651. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282509

- 34. Zhang J.Z., Yarov-Yarovoy V., Scheuer T., Karbat I., Cohen L., Gordon D., Gurevitz M., Catterall W.A. (2012) Mapping the interaction site for a beta-scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na(+) channels. J. Biol. Chem. 287: 30719–30728. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.370742
- Bosmans F., Swartz K.J. (2010) Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins. Trends Pharmacol. Sci. 31:175–182. https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.007
- Minassian N.A., Gibbs A., Shih A.Y., Liu Y., Neff R.A., Sutton S.W., Mirzadegan T., Connor J., Fellows R., Husovsky M., Nelson S., Hunter M.J., Flinspach M., Wickenden A.D. (2014) Analysis of the structural and molecular basis of voltage-sensitive sodium channel inhibition by the spider toxin huwentoxin-IV (mu-TRTX-Hh2a). J. Biol. Chem. 288: 22707–22720. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.461392
- Xiao Y., Blumenthal K., Cummins T.R. (2014) Gating-pore currents demonstrate selective and specific modulation of individual sodium channel voltage-sensors by biological toxins. Mol. Pharmacol. 86: 159–167. https://doi.org/10.1124/mol.114.092338
- Thomsen W.J., Catterall W.A. (1989) Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 10161–10165. https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10161
- Rogers J.C., Qu Y., Tanada T.N., Scheuer T., Catterall W.A. (1996) Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3–S4 extracellular loop in domain IV of the Na+ channel alpha subunit. J. Biol. Chem. 271: 15950–15962. https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.15950
- Cestele S., Yarov-Yarovoy V., Qu Y., Sampieri F., Scheuer T., Catterall W.A. (2006) Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. J. Biol. Chem. 281: 21332–21344. https://doi.org/10.1074/jbc.M603814200
- Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., Llongueras J.P., Arthur C.P., Li Z.R., Jian Y., Martin-Eauclaire M.F., Bougis P.E., Ciferri C., Ahern C.A., Bosmans F., Hackos D.H., Rohou A., Payandeh J. (2019) Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels. Science. 363. https://doi.org/10.1126/science.aav8573
- 42. Xu H., Li T., Rohou A., Arthur C.P., Tzakoniati F., Wong E., Estevez A., Kugel C., Franke Y., Chen J., Ciferri C., Hackos D.H., Koth C.M., Payandeh J. (2019) Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin. Cell. 176:702–715 e714. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.018
- Wisedchaisri G., Tonggu L. Gamal El-Din T.M., McCord E., Zheng N., Catterall W.A. (2020) Structural Basis for High-Affinity Trapping of the NaV1.7 Channel in Its Resting State by Tarantula Toxin. Mol. Cell. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.039
- 44. Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T., Catterall W.A. (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. Proc. Natl. Acad. Sci.U S A. 93:9270–9275. https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9270
- 45. *O'Leary M.E., Chahine M.* (2002) Cocaine binds to a common site on open and inactivated human heart (Na(v)1.5) sodium channels. J. Physiol. 541: 701–716. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.016139
- 46. Yarov-Yarovoy V., McPhee J.C., Idsvoog D., Pate C., Scheuer T., Catterall W.A. (2002) Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na+ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. J. Biol. Chem. 277: 35393–35401. https://doi.org/10.1074/jbc.M206126200
- 47. *Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T., Catterall W.A.* (1994) Molecular determinants of state-dependent block of Na+ channels by local anesthetics. Science. 265: 1724–1728. https://doi.org/10.1126/science.8085162
- Ahern C.A., Eastwood A.L., Dougherty D.A., Horn R. (2008) Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. Circ. Res. 102: 86–94. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160663
- 49. *Mike A., Lukacs P.* (2010) The enigmatic drug binding site for sodium channel inhibitors. Curr. Mol. Pharmacol. 3: 129–144. https://doi.org/10.2174/1874467211003030129
- 50. Yamagishi T., Xiong W., Kondratiev A., Velez P., Mendez-Fitzwilliam A., Balser J.R., Marban E.,
- 50. Yamagishi T., Xiong W., Kondratiev A., Velez P., Mendez-Fitzwilliam A., Balser J.R., Marban E., Tomaselli G.F. (2009) Novel molecular determinants in the pore region of sodium channels

regulate local anesthetic binding. Mol. Pharmacol. 76: 861–871. https://doi.org/10.1124/mol.109.055863

- Liu G., Yarov-Yarovoy V., Nobbs M., Clare J.J., Scheuer T., Catterall W.A. (2003) Differential interactions of lamotrigine and related drugs with transmembrane segment IVS6 of voltagegated sodium channels. Neuropharmacology. 44: 413–422. https://doi.org/10.1016/c0028.3908(2020)000.8
 - https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00400-8
- 52. *Kuo C.C.* (1998) A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na⁺ channels. Mol. Pharmacol. 54: 712–721.
- 53. Catterall W.A. (1987) Common modes of drug action on Na⁺ channels: local anesthetics, antiarrhythmics and anticonvulsants. Trends Pharmacol. Sci. 8: 57–65. https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90011-3
- Catterall W.A. (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. J. Physiol. 590: 2577–2589. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204
- 55. *Tikhonov D.B., Bruhova I., Zhorov B.S.* (2006) Atomic determinants of state-dependent block of sodium channels by charged local anesthetics and benzocaine. FEBS Lett. 580: 6027–6032.
- https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.035
 56. Naylor C.E., Bagneris C., DeCaen P.G., Sula A., Scaglione A., Clapham D.E., Wallace B.A. (2016) Molecular basis of ion permeability in a voltage-gated sodium channel. EMBO J. 35: 820–830.

https://doi.org/10.15252/embj.201593285

- 57. Sula A., Booker J., Ng L.C., Naylor C.E., DeCaen P.G., Wallace B.A. (2017) The complete structure of an activated open sodium channel. Nat. Commun. 8: 14205. https://doi.org/10.1038/ncomms14205
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2017) Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. J. Gen. Physiol. 149:465–481. https://doi.org/10.1085/jgp.201611668
- 59. Nguyen P.T., DeMarco K.R., Vorobyov I., Clancy C.E., Yarov-Yarovoy V. (2019) Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 116: 2945–2954. https://doi.org/10.1073/pnas.1817446116
- Buyan A., Sun D., Corry B. (2018) Protonation state of inhibitors determines interaction sites within voltage-gated sodium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 115: E3135–E3144. https://doi.org/10.1073/pnas.1714131115
- 61. *Gamal El-Din T.M., Lenaeus M.J., Zheng N., Catterall W.A.* (2018) Fenestrations control resting-state block of a voltage-gated sodium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 115: 13111– 13116.

https://doi.org/10.1073/pnas.1814928115

- 62. 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: 122–134 e110. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.041
- Silver K., Dong K., Zhorov B.S. (2017) Molecular Mechanism of Action and Selectivity of Sodium Ch annel Blocker Insecticides. Curr. Med. Chem. 24: 2912–2924. https://doi.org/10.2174/0929867323666161216143844
- Zhang Y., Du Y., Jiang D., Behnke C., Nomura Y., Zhorov B.S., Dong K. (2016) The Receptor Site and Mechanism of Action of Sodium Channel Blocker Insecticides. J. Biol. Chem. 291: 20113–20124.

https://doi.org/10.1074/jbc.M116.742056

- 65. Schewe M., Sun H., Mert U., Mackenzie A., Pike A.C.W., Schulz F., Constantin C., Vowinkel K.S., Conrad L.J., Kiper A.K., Gonzalez W., Musinszki M., Tegtmeier M., Pryde D.C., Belabed H., Nazare M., de Groot B.L., Decher N., Fakler B., Carpenter E.P., Tucker S.J., Baukrowitz T. (2019) A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K(+) channels. Science. 363: 875–880. https://doi.org/10.1126/science.aav0569
- 66. Huang W., Liu M., Yan S.F., Yan N. (2017) Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels. Protein Cell. 8(6): 401–438. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0372-z
- 67. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M., Brown G.R., Chao C., Chitipiralla S., Gu B., Hart J., Hoffman D., Jang W., Karapetyan K., Katz K., Liu C., Maddipatla Z., Malheiro A., McDaniel K., Ovetsky M., Riley G., Zhou G., Holmes J.B., Kattman B.L., Maglott D.R. (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 46: D1062–D1067.

https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153

68. Imbrici P., Liantonio A., Camerino G.M., De Bellis M., Camerino C., Mele A., Giustino A., Pierno S., De Luca A., Tricarico D., Desaphy J.F., Conte D. (2016) Therapeutic Approaches to Ge-
netic Ion Channelopathies and Perspectives in Drug Discovery. Front. Pharmacol. 7: 121. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00121

- 69. *El-Sherif N., Boutjdir M.* (2015) Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies. Pharmacol. Ther. 155: 132–142.
 - https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.09.002
- Antzelevitch C., Burashnikov A., Sicouri S., Belardinelli L. (2011) Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. Heart Rhythm. 8: 1281–1290. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.03.045
- Zhu W., Mazzanti A., Voelker T.L., Hou P., Moreno J.D., Angsutararux P., Naegle K.M., Priori S.G., Silva J.R. (2019) Predicting Patient Response to the Antiarrhythmic Mexiletine Based on Genetic Variation. Circ. Res. 124: 539–552. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314050
- Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. (2012) ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. J. Chem. Inf. Model. 52: 1757–1768. https://doi.org/10.1021/ci3001277
- Wang S. Y., Wang G.K. (2003) Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. Cell Signal.15: 151–159. https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00085-2
- 74. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2005) Sodium channel activators: model of binding inside the pore and a possible mechanism of action. FEBS Lett. 579: 4207–4212. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.017
- Wang S.Y., Tikhonov D.B., Mitchell J., Zhorov B.S., Wang G.K. (2007) Irreversible block of cardiac mutant Na+ channels by batrachotoxin. Channels (Austin). 1: 179–188. https://doi.org/10.4161/chan.4437
- 76. Wang S.Y., Tikhonov D.B., Zhorov B.S., Mitchell J., Wang G.K. (2007) Serine-401 as a batrachotoxin- and local anesthetic-sensing residue in the human cardiac Na⁺ channel. Pflugers Arch. 454: 277–287. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0202-2
- Wang S. Y., Mitchell J., Tikhonov D.B., Zhorov B.S., Wang G.K (2006) How batrachotoxin modifies the sodium channel permeation pathway: computer modeling and site-directed mutagenesis. Mol. Pharmacol. 69: 788–795. https://doi.org/10.1124/mol.105.018200
- Du Y., Garden D.P., Wang L., Zhorov B.S., Dong K. (2011) Identification of new batrachotoxinsensing residues in segment IIIS6 of the sodium channel. J. Biol. Chem. 286: 13151–13160. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208496
- Finol-Urdaneta R.K., McArthur J.R., Goldschen-Ohm M.P., Gaudet R., Tikhonov D.B., Zhorov B.S., French R.J. (2019) Batrachotoxin acts as a stent to hold open homotetrameric prokaryotic voltage-gated sodium channels. J. Gen. Physiol. 151: 186–199. https://doi.org/10.1085/jgp.201812278
- Wang G.K., Wang S.Y. (2003) Veratridine block of rat skeletal muscle Nav1.4 sodium channels in the inner vestibule. J. Physiol. 548: 667–675. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035469
- Dong K., Du Y., Rinkevich F., Nomura Y., Xu P., Wang L., Silver K., Zhorov B.S. (2014) Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 50: 1–17. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012
- O'Reilly A.O., Khambay B.P., Williamson M.S., Field L.M., Wallace B.A., Davies T.G. (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochem. J. 396: 255–263. https://doi.org/10.1042/BJ20051925
- Du Y., Noming Y., Satar G., Hu Z., Nauen R., He S.Y., Zhorov B.S., Dong K. (2013) Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. Proc N.atl. Acad. Sci. U S A 110: 11785–11790.
 - https://doi.org/10.1073/pnas.1305118110
- Du Y., Nomura Y., Zhorov B.S., Dong K. (2015) Rotational symmetry of two pyrethroid receptor sites in the mosquito sodium channel. Mol. Pharmacol. 88: 273–280. https://doi.org/10.1124/mol.115.098707
- Du Y., Nomura Y., Zhorov B.S., Dong K. (2016) Evidence for Dual Binding Sites for 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) in Insect Sodium Channels. J. Biol. Chem. 291: 4638–4648. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678672
- Hille B. (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. J. Gen. Physiol. 69: 497–515. https://doi.org/10.1085/jgp.69.4.497

- Alpert L.A., Fozzard H.A., Hanck D.A. Makielski J.C. (1989) Is there a second external lidocaine binding site on mammalian cardiac cells? Am. J. Physiol. 257: H79–84. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.1.H79
- Qu Y., Rogers J., Tanada T., Scheuer T., Catterall W.A. (1995) Molecular determinants of drug access to the receptor site for antiarrhythmic drugs in the cardiac Na⁺ channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 92: 11839–11843. https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11839
- Bruhova I., Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2008) Access and binding of local anesthetics in the closed sodium channel. Mol. Pharmaco. 74: 1033–1045. https://doi.org/10.1124/mol.108.049759
- Sait L.G., Sula A., Ghovanloo M.R., Hollingworth D., Ruben P.C., Wallace B.A. (2020) Cannabidiol interactions with voltage-gated sodium channels. Elife. 9. 9: e58593. https://doi.org/10.7554/eLife.58593
- Hockerman G.H., Peterson B.Z., Johnson B.D., Catterall W.A. (1997) Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 361–396.
- 92. *Godfraind T.* (2017) Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. Front. Pharmacol. 8: 286.
 - https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286
- Cosconati S., Marinelli L., Lavecchia A., Novellino E. (2007) Characterizing the 1,4-dihydropyridines binding interactions in the L-type Ca²⁺ channel: model construction and docking calculations. J. Med. Chem. 50:1 504–1513. https://doi.org/10.1021/jm061245a
- Cheng R.C., Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2009) Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. J. Biol. Chem. 284: 28332–28342. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027326
- 95. Lipkind G.M., Fozzard H.A. (2003) Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca²⁺ channel. Mol. Pharmacol. 63: 499–511.
 - https://doi.org/10.1124/mol.63.3.499
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2009) Structural Model for Dihydropyridine Binding to L-type Calcium Channels. J. Biological Chemistry. 284: 9006–19017. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011296
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S. (2008) Molecular modeling of benzothiazepine binding in the L-type calcium channel. J. Biological Chemistry. 283: 17594–17604. https://doi.org/10.1074/jbc.M800141200
- 98. Li W., Shi G. (2019) How CaV1.2-bound verapamil blocks Ca(2+) influx into cardiomyocyte: Atomic level views. Pharmacol. Res. 139: 153–157. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.017
- Schramm M., Thomas G., Towart R., Franckowiak G. (1983) Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. Nature. 303: 535–537. https://doi.org/10.1038/303535a0
- 100. Gao S., Yan N. (2020) Structural Basis of the Modulation of the Voltage-Gated Calcium Ion Channel Cav 1.1 by Dihydropyridine Compounds*. Angew Chem Int. Ed. Engl. https://doi.org/10.1002/anie.202011793
- 101. Tang L., Gamal El-Din T.M., Swanson T.M., Pryde D.C., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. (2016) Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca(2+) channel by Ca(2+) antagonist drugs. Nature. 537:.117–121. https://doi.org/10.1038/nature19102
- 102. Xu F, Xiong W., Huang Y., Shen J., Zhou D., Tang L. (2019) Structural basis for efonidipine block of a voltage-gated Ca(2+) channel. Biochem. Biophys. Res. Commun. 513: 631–634. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.176
- 103. Tang L., Gamal El-Din T.M., Lenaeus M.J., Zheng N., Catterall W.A. (2019) Structural Basis for Diltiazem Block of a Voltage-Gated Ca(2+) Channel. Mol. Pharmacol. 96: 485–492. https://doi.org/10.1124/mol.119.117531
- 104. Zhao Y., Huang G., Wu J., Wu Q., Gao S., Yan Z., Lei J., Yan N. (2019) Molecular Basis for Ligand Modulation of a Mammalian Voltage-Gated Ca(2+) Channel. Cell. 177: 1495–1506 e1412. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.043
- 105. Fehrentz T., Huber F.M.E., Hartrampf N., Bruegmann T. Frank J.A., Fine N.H.F., Malan D., Danzl J.G., Tikhonov D.B., Sumser M., Sasse P., Hodson D.J., Zhorov B.S., Klocker N., Trauner D. (2018) Optical control of L-type Ca(2+) channels using a diltiazem photoswitch. Nat. Chem. Biol. 14:764–767.
 - https://doi.org/10.1038/s41589-018-0090-8
- 106. *Tikhonov D.B., Lin L., Yang D.S.C., Yuchi Z., Zhorov B.S.* (2020) Phenylalkylamines in calcium channels: computational analysis of experimental structures. J. Comput Aided. Mol. Des.

34: 1157-1169.

https://doi.org/10.1007/s10822-020-00330-0

107. Zhao Y., Huang G., Wu Q., Wu K., Li R., Lei J., Pan X., Yan N. (2019) Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. Nature. 576: 492–497. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1801-3

Structures of Sodium and Calcium Channels with Ligands

B. S. Zhorov^{*a*, *b*, *}

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
^bMcMaster University, Hamilton, Canada
*e-mail: zhorov@mcmaster.ca

Sodium and calcium channels play a fundamental role in the physiology of electroexcitable cells. These channels are targets for a variety of natural toxins, synthetic drugs and insecticides. Genetic mutations in sodium and calcium channels are associated with hereditary diseases such as cardiac arrhythmias, epilepsy, myotonia, increased or decreased sensitivity to pain. It is not surprising that the development of selective modulators of sodium and calcium channels is an important goal of neuropharmacology. In recent years, the crystal and cryo-electron microscopic structures of sodium and calcium channels and their complexes with toxins and drugs have been published. In these studies, a structural explanation was proposed for the numerous experimental data accumulated in previous decades. This review considers the complexes of sodium and calcium channels with toxins and drugs. Some computer models of such complexes are described. The possible role of current-carrying cations and their binding sites in the action of some ligands is discussed.

Keywords: agonists, antagonists, crystallography, cryo-EM structures, ligand-receptor interactions, molecular models, toxins

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 436-457

= обзоры ==

ФОТОХРОМНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЦИС-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОР-УПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ

© 2021 г. П. Д. Брежестовский^{1, 2, *}, Д. Н. Пономарева^{1, 2}

¹Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия ²Институт системных нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция *E-mail: pbreges@gmail.com

> Поступила в редакцию 19.01.2021 г. После доработки 31.01.2021 г. Принята к публикации 09.02.2021 г.

Благодаря успехам молекулярной и клеточной биологии, развитию химического синтеза и современных технологий, экспериментальная база современных исследований обогатились новыми направлениями, в которых свет играет ключевую роль как инструмент модуляции функций организмов. Одним из них является фотофармакология – направление, в котором используются химически синтезируемые светоуправляемые соединения, способные контролировать функции биологических молекул. При освещении определенными длинами световых волн эти фотохромные модуляторы переключаются между активной и неактивной формой и изменяют активность функционально важных белковых молекул – рецепторов, ионных каналов, ферментов и др. В данном обзоре кратко представлены соединения, модулирующие функции ионотропных Цис-петельных рецепторов ацетилхолина, ГАМК и глицина. Первым рецептор-управляемым каналом, для которого был открыт способ управления с помошью светоуправляемых молекул. является никотиновый рецептор ацетилхолина (нАХР). В 1970-х-80-х годах были созданы блокаторы и активаторы нАХР, состоящие из азобензола (светоуправляемого переключателя) и агонистов. В нынешнем тысячелетии создано новое поколение соединений, обеспечивающих светоуправляемый контроль активности нАХР. Прикрепляющиеся фотохромные лиганды состоят из малеимида для связывания с цистеиновыми группами аминокислот, фотопереключателя азобензола и лиганда для взаимодействия с рецептором. Новые фотохромы избирательно активируют или блокируют мышечные и нейрональные рецепторы и являются перспективными для изучения физиологической роли нАХР в нервной системе. Для светоуправляемого контроля активностью ГАМК-рецепторов создана обширная библиотека фотохромных соединений. Некоторые из них модулируют активность, взаимодействуя с активным центром рецептора, другие являются светоуправляемыми блокаторами хлор-избирательных ионных каналов. Недавно создано также два первых фотохромных модулятора активности глициновых рецепторов. В целом, фотофармакология является перспективным направлением, открывающим уникальные возможности для дистанционного управления физиологическими функциями, а также исследования процессов торможения и возбуждения в нейронных сетях и моделях нейрональных патологий.

Ключевые слова: фотофармакология, светоуправляемые молекулярные переключатели, никотиновые рецепторы ацетилхолина, ГАМК-рецепторы, глициновые рецепторы, синаптическая передача

DOI: 10.31857/S0869813921040051

Принятые сокращения: нАХР – никотиновый рецептор ацетилхолина, ГАМК – Гамма-аминомасляная кислота, ГАМК_АР – рецептор гамма-аминомасляной кислоты, ГлиР – глициновые рецепторы, 5-HT₃P – рецептор серотонина, ТМ домен – трансмембранный домен, Azo-Ch – азохолин, ЦНС – центральная нервная система, НЕК – эмбриональные клетки почек человека, УФ – ультрафиолет.

Направления многолетней и многоплановой деятельности Л.Г. Магазаника посвящены, в огромной степени, исследованию функций рецепторов, активируемых ацетилхолином и глутаматом – нейромедиаторами, осуществляющими быструю синаптическую передачу в нервной системе позвоночных. Многие работы прошлого столетия посвящены исследованию никотиновых рецепторов ацетилхолина: процессов десенситизации [1-3], анализу миниатюрных потенциалов, вызванных спонтанным выбросом квантов нейромедиатора и постсинаптических событий, вызванных стимуляцией нерва [4, 5], а также других функциональных свойств нервно-мышечных холинергических синапсов [6]. Эти работы вошли в классику синаптологии. В исследованиях последних лет много работ посвящено выяснению механизмов процессов, вызываемых действием глутамата — основного возбуждающего нейромедиатора в нервной системе позвоночных, а также изучению молекулярной организации и функциональных свойств ионотропных глутаматных рецепторов [7–12]. Данный обзор посвящен краткому описанию подходов, обеспечивающих с помощью света управление работой рецепторных белков и формируемых ими ионных каналов, осуществляющих быструю синаптическую передачу в нервной системе позвоночных: рецепторов, активируемых ацетилхолином, а также тормозных рецепторов ГАМК и глицина. Информация о фотохромных модуляторах глутаматных рецепторов частично изложена в недавних обзорах [13, 14].

Развитие химического синтеза, успехи молекулярной биологии и современных технологий обеспечили появление трех основных направлений, в которых главным инструментом является свет. Оказалось, что с помощью света можно исследовать функции клеток и клеточных ансамблей [15, 16], модулировать проводимость и кинетику ионных каналов [13, 17], измерять концентрации ионов [18, 19], внутриклеточных концентраций АТФ [20, 21], циклических нуклеотидов [22], активных форм кислорода [23, 24], а также контролировать поведение организмов [25, 26].

Одним из этих перспективных направлений является фотофармакология [27] – направление, в котором используются химически синтезируемые светоуправляемые (фотохромные) соединения, способные при действии определенных длин волн света избирательно усиливать или тормозить активность биологических молекул (рецепторов, ионных каналов, ферментов) в клетках организмов.

СВЕТОУПРАВЛЯЕМЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ

Основу химических светоуправляемых модуляторов биологических процессов составляют молекулярные переключатели — фотохромные молекулы, способные под действием света осуществлять конформационные преобразования, сопровождающиеся изменением спектральных свойств молекул. На рис. 1 представлены наиболее распространенные фотопереключатели, которые используются, в частности, для фоторегуляции функций биологических молекул: *азобензолы, диарилэтены и спиропираны*. При освещении определенными длинами волн, азобензолы подвергаются *цис-транс* изомеризации, в то время как у диарилэтенов и спиропиранов происходят превращения между открытыми и закрытыми формами.

Азобензолы (рис. 1а) были впервые описаны в 1834 г. [28], а столетие спустя, в 1937 г., Hartley опубликовал исследование влияния света на конфигурацию двойных связей N=N [29]. В настоящее время эти молекулы являются наиболее широко используемыми фотопереключателями в биологических исследованиях. Это связано с тем, что молекула азобензола: (i) удобна для синтеза при создании различных химических конструкций; (ii) имеет высокую стабильность; (iii) проявляет сильное увеличение дипольного момента при переходе из *транс*- в *цис*-конфигурацию (m = 2-3 деб); (iv) способна к быстрым переключениям между конформационными состояниями. Очень важным свойством является изменение длины молекулы при



Рис. 1. Часто используемые молекулярные фотопереключатели.

изомеризации. При видимом свете или в темноте молекула находится в *mpahc*-конфигурации и имеет длину примерно 9.0 Å. Облучение ультрафиолетом с длиной волны 350–380 нм вызывает *цис*-изомеризацию азобензола, приводящую к скручиванию молекулы и укорочению почти в 2 раза: до 5.5 Å [30, 31] (рис. 1а). Многие модуляторы активности рецептор-управляемых каналов построены на базе азобензола. Некоторые из них будут представлены ниже.

Диарилэтены (рис. 1b) — это класс соединений стильбенового типа, в которых орто-атомы водорода замещены для подавления необратимого окисления после фотоциклизации [32]. Наиболее часто используемые диарилэтены — это триметилтиофенмалеиновые ангидриды и диарилперфторциклопентены [32, 33]. При переключении света из диапазона видимого света к ультрафиолетовому происходит рециклизация от открытой к закрытой форме (рис. 1b) с небольшим изменением длины молекулы и дипольного момента. Важным качеством диарилэтенов является их высокая устойчивость к переключениям: циклы переходов из открытого в закрытое состояние могут повторяться сотни раз. С другой стороны, диарилэтены не идеальны для создания специализированных светопереключателей, поскольку их изомеризация сопровождается относительно небольшими изменениями молекулярной конформации и дипольного заряда.

Спиропираны (рис. 1с) — это фотохроматические молекулы, состоящие из двух гетероциклических функциональных групп в ортогональных плоскостях, связанных атомом углерода. Облучение спиропиранов УФ-светом с длиной волны 360— 380 нм приводит к разрыву связи СО, в результате структура исходной молекулы изменяется, и образуется планарная мероцианиновая форма (рис. 1с). Открытие кольца вызывает большое изменение дипольного момента (m = 7-15 деб). Из-за того, что две формы спиропиранов имеют сильно различающиеся свойства, эти молекулы нашли широкое применение в различных областях. Спиропираны используются в фотоуправляемом переносе аминокислот через бислойные мембраны, фотоконтроле ферментаивной активности, измерениях трансмембанных потенциалов [34].

В общем, в фотохромных молекулах фотоизомеризация основана либо на *цистранс*- переходах (например, в азобензене) или открытии/циклизации связи (например, в спиропиранах или диарилэтенах). В разных конформационных состояниях фотохромные молекулы имеют разные геометрические формы и полярности, что может быть идеальным для управления активностью биологических молекул.

ФОТОХРОМНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ И РЕЦЕПТОРОВ

Для создания избирательно действующего фотохромного соединения лиганд подсоединяется ковалентно к фотохрому. В результате химического синтеза создается молекула, способная изменять конфигурацию и положение агониста под действием света. Таким образом, фотохромные модуляторы ионных каналов и рецепторных белков представляют собой модульные лиганды, способные переключаться между активной и неактивной формой при освещении определенными длинами световых волн.

Фотохромные модуляторы можно разделить на два основных класса: (i) **растворимые фотохромные лиганды**, состоящие из фотопереключателя и лиганда, соединенных между собой линкером определенной длины и (ii) **прикрепляющиеся фотохромные лиганды** — соединения, состоящие из фотопереключателя, лиганда, линкера, а также молекулярного компонента, обеспечивающего ковалентное связывание с белком-мишенью [13, 35].

Каждый класс имеет свои преимущества и ограничения. Растворимые фотохромные лиганды удобны и просты для работы с эндогенными рецепторами, поскольку не требуют молекулярной модификации белков-мишеней. Прикрепляющиеся фотохромные лиганды позволяют контролировать активность молекул мишеней с очень высокой избирательностью благодаря необратимому ковалентному связыванию молекулы в участке, близко расположенном к сайту действия агонистов. Ковалентное связывание фотохромных лигандов, содержащих малеимид, осуществляется, как правило, с остатками цистеина. В редких случаях, в естественной молекуле белка-мишени, цистеины могут быть расположенными на удобном расстоянии от активной зоны действия агониста. Поэтому, в большинстве случаев, для эффективного действия привязывающихся фотохромных лигандов требуются генетические модификации.

В последние годы были созданы фотоуправляемые химические соединения, обеспечивающие модуляцию нескольких видов потенциал-зависимых ионных каналов [36–38]. Также получены и исследованы растворимые и прикрепляющиеся фотохромные лиганды некоторых нейрональных рецепторов: глутамата [39–41], допамина [42]; АТФ-активируемых РХ2 рецепторов [43]; никотиноновых рецепторов ацетилхолина [44]; рецепторов ГАМК [45–48] и рецепторов глицина [49, 50].

В данном обзоре будут кратко представлены фотохромные соединения, модулирующие функции ионотропных Цис-петельных рецепторов ацетилхолина, ГАМК и глицина.

ЦИС-ПЕТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Рецептор-управляемые Цис-петельные рецепторы (Cys-loop receptors) представляют собой трансмембранные белки, которые отвечают за быструю возбуждающую и тормозную синаптическую передачу в центральной и периферической нервной системе. К членам этого семейства позвоночных относятся никотиновые рецепторы ацетилхолина (нАХР), рецепторы серотонина (5-НТ₃Р), глицина (ГлиР) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК_АР и ГАМК_СР) [51].

Название "Цис-петельные рецепторы" это семейство получило из-за наличия во внеклеточном домене петли, формируемой 13 аминокислотами, заключенными между двумя цистеинами, остатки которых формируют дисульфидную связь [52, 53]. Члены этого семейства имеют общую структуру, состоящую из пяти субъединиц, формирующих центральную ионопроводящую пору. В каждой субъединице выделяют большой экстраклеточный N-концевой домен (примерно 200 аминокислот), четыре альфа-спиральных трансмембранных домена (ТМ1–ТМ4, около 20 аминокислот), соединенных петлями разной длины (цитоплазматическая петля, соединяющая ТМ3- и ТМ4-домены в разных субъединицах состоит из 80-270 аминокислотных остатков) и короткого внеклеточного С-домена (примерно 10 аминокислот) [54, 55]. Пять субъединиц, из которых состоит каждый рецептор, сориентированы таким образом, что их TM2-домены образуют ион-избирательный канал, а TM1, TM3 и TM4 окружают TM2 и взаимодействуют с липидами цитоплазматической мембраны. В нервной системе позвоночных ионные поры, формируемые TM2-доменами, являются избирательными либо для катионов (нАХР и 5-НТ₃Р), либо для анионов (ГАМКР и ГлиР). Эти свойства определяют их функциональную значимость в возбуждающих или тормозных синаптических процессах.

Большинство рецепторов являются гетеромерами, т.е. формируются из нескольких типов субъединиц. Они могут сочетаться в различных комбинациях, давая сложный набор рецепторов с различными физиологическими и фармакологическими свойствами.

РЕЦЕПТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНА

В нервной системе позвоночных идентифицировано 5 основных типов трансмембранных субъединиц: α , β , δ , γ и ϵ . Вместе с подтипами (α 1–10 и β 1–4) это подсемейство состоит из 17-ти субъединиц [56]. Комбинации этого множества субъединиц обеспечивают формирование большого количества нАХР, различающихся по своим свойствам и функциональным характеристикам, включая чувствительность к агонистам, проницаемость для кальция и кинетику десенситизации [57, 58].

На периферии мышечные нАХР локализуются на постсинаптических мембранах нервно-мышечных соединений, обеспечивая быстрое управление сократимостью мышц [1, 59]. Мышечные пентамерные рецепторы имеют состав (α 1)₂ β 1 $\gamma\delta$ или (α 1)₂ β 1 $\epsilon\delta$. Уровень экспрессии и субъединичный состав нАХР изменяется в процессе развития скелетных мышц. Рецепторы эмбрионального типа состоят из субъединиц (α 1)₂ β 1 $\gamma\delta$, а по мере развития организма субъединица γ заменяется на ϵ , формируя нАХР взрослого типа, (α 1)₂ β 1 $\epsilon\delta$ [60, 61]. Нейрональные нАХР могут формировать гетеромерные макромолекулярные блоки, состоящие из α и β ($\alpha 2 - \alpha 10$ и $\beta 2 - \beta 4$) субъединиц, а также могут быть гомопентамерами, формируемыми $\alpha 7 - \alpha 9$ -субъединицами, и $\alpha 9$ в комбинации с $\alpha 10$ субъединицей [62, 63].

В головном мозге нейрональные нАХР локализуются преимущественно в пресинаптических участках нервных окончаний, где они регулируют высвобождение нейромедиаторов в возбуждающих и тормозных синапсах [64]. Рецепторы экспрессируются также постсинаптически и участвуют во многих функциях мозга и регуляции поведения организмов, включая обучение и память, возбуждение, вознаграждение, моторный контроль болевую чувствительность, чувство голода и сон [65]. нАХР также являются мишенью для никотина, основного вызывающего привыкание агента, доставляемого сигаретным дымом [66]. Помимо значимой роли в физиопатологии никотиновой зависимости [67], нАХР связан с развитием многих неврологических заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, шизофрению, депрессию и эпилепсию [68].

Фотохромная модуляция нАХ рецепторов

Никотиновый рецептор ацетилхолина является первым каналом, для которого был открыт способ управления с помощью светоуправляемых молекул. Более 50 лет тому назад в лаборатории Nachmansohn было показано, что химическое соединение Azo-CCh, состоящее из азобензола и карбахолина, негидролизуемого холинэстеразой агониста нАХР, а также Azo-PTA – соединения, представляющего азобензол и фенилтриметиламмоний (табл. 1), являются светоуправляемыми модуляторами активности нАХ рецепторов. Оба соединения оказались обратимыми антагонистами. При этом *транс*-изомер (освещение видимым светом) был сильным блокатором, а при изомеризации в *цис*-конформацию, вызываемую ультрафиолетовым светом, ингибирование значительно ослаблялось [69]. Эксперименты были проведены на клетках электрического угря (*Elecrtophorus electricus*), содержащего нАХР мышечного типа с субъединичным составом $\alpha 2\beta\gamma\delta$ [70].

В последующие годы были синтезированы производные азобензола, которые взаимодействовали с нАХР [71]. Оказалось, что соединение Bis-Q (табл. 1) в *транс*-конфигурации является мощным агонистом нАХР, эффективная концентрация которого в 500 раз меньше, чем карбахолина. При этом *цис*-изомер проявлял низ-кую активность. Намного позднее было показано, что Bis-Q не активирует гомо-мерный α7 нАХР, экспрессируемый в клетках НЕК293 [72], указывая на избирательность этого фотохрома в отношении мышечного типа нАХР.

Красным выделены молекулярные участки агонистов, а синим – группа малеимида, обеспечивающая "заякоривание", т.е. связывание фотохрома с цистеиновыми группами аминокислот.

Недавно был синтезирован фотопереключаемый агонист, азохолин (Azo-Ch) (табл. 1), который проявлял свойства противоположные Bis-Q. Этот фотохром в *транс*-конфигурации (*транс*-Azo-Ch) оказался агонистом нейронального α7 нАХР, но не проявлял активности в отношении мышечного типа нАХР [72]. Таким образом, были созданы фотохромные переключатели, избирательно модулирующие активность мышечных и нейрональных АХ-рецепторов. Соединение Bis-Q является свето-индуцируемым агонистом гетеромерных нАХ, экспрессируемых в нервно-мышечных синапсах, а Azo-Ch – агонистом нейрональных α7-рецепторов АХ.

Прикрепляющиеся фотохромные модуляторы активности нАХР. Другое соединение – QBr (табл. 1) в *транс*-конфигурации вызывало небольшую деполяризацию мембраны клеток *Elecrtophorus electricus*. После обработки клеток дитиотреитолом, агентом, вызывающим восстановление дисульфидных (S–S) связей и образование

Фотохром	Структурная формула	Год	Действие	Ссылка
Azo-CCh		1969	Trans-aгонист нАХР	[69]
Azo-PTA		1969	Trans-aгонист нАХР	[69]
Bis-Q	$H \xrightarrow{H} N^{+} N^{-} N \xrightarrow{H} H$	1971	<i>Trans-</i> агонист мышечных нАХР	[71]
QBr	Br $N \neq N$ H H H	1971	Прикрепляющийся trans-aгонист нАХР	[71]
MAACh	$ \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{H}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{N}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{O}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}} \overset{V}{\underset{H}{\overset{V}{\overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}}} \overset{V}{\underset{H}{\overset{V}{\underset{H}{\longrightarrow}}} \overset{V}{\underset{H}{\overset{V}{\underset{V}{\underset{V}{\underset{V}{\underset{V}{\underset{V}{\underset{V}{V$	2012	Прикрепляющийся cis-агонист нАХР	[44]
MAHoCh		2012	Прикрепляющийся trans-aгонист нАХР	[44]
Azo-Ch		2015	Trans-aronuct α7 HAXP	[72]

Таблица 1. Фотохромные модуляторы никотиновых рецепторов ацетилхолина

свободных сульфгидрильных (SH) групп [73, 74], *транс*-QBr необратимо связывался с ними в участках, близко расположенных к сайту взаимодействия агонистов с рецептором. В *цис*-конфигурации QBr был неактивен, а в *транс*-конфигурации QBr вызывал слабую активацию ионных каналов нАХР и конкурировал с карбахолином, вызывая угнетение ответов на аппликацию этого агониста [71, 75, 76]. QBr и его аналоги, называемые прикрепляющимися агонистами, были успешно использованы для анализа кинетики открытия и закрытия каналов нАХР [76–79].

В нынешнем тысячелетии создано новое поколение соединений для эффективной светоуправляемой модуляции нАХР. Новые прикрепляющиеся фотохромы обычно состоят из малеимида – для связывания с цистеиновыми группами аминокислот, фотопереключателя азобензола и лиганда для взаимодействия с рецептором (см. MAACh, табл. 1).

На основе рентгеновской структуры АХ-связывающего белка в комплексе с карбахолином [80] и определения расстояний между аминокислотными остатками в белковых структурах, в β-субъединице нАХР было выявлено несколько положений аминокислот, близко расположенных к сайту связывания лиганда и представляющих потенциальные места для присоединения агонистов и антагонистов. Это позволило осуществить целенаправленную замену на цистеины аминокислот в местах β2- и β4-субъединиц нАХР, чтобы к ним могли привязываться светоуправляемые агонисты [44].

Были синтезированы фотохромы малеимид—азобензол—ацетилхолин (MAACh) и малеимид—азобензол—гомохолин (MAHoCh) (табл. 1). Действие фотохромов было исследовано на ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих мутантные субъединицы β 4 в составе гетеропентамера α 3 β 4, используя электрофизиологическую регистрацию ионных токов. В *mpaнc*-конфигурации прикрепляющийся фотохром MAACh был неактивен. При освещении УФ светом (380 нм), вызывающим *цис*-изомеризацию MAACh, регистрировали фотоактивируемый ток через нАХР-каналы, который прекращался при облучении светом 500 нм, возвращающим фотохром в *mpaнc*-конфигурацию. Прикрепляющийся MAHoCh обладал противоположным действием, проявляя свойства фотоуправляемого конкурентного антагониста. В *mpaнc*-конфигурации он был неактивен, а при *цис*-изомеризации, вызванной УФ (380 нм), ингибировал амплитуду ацетилхолин-активируемых токов.

Таким образом, было показано, что MAACh является *цис*-агонистом нAXP, а MAHoCh – *цис*-антагонистом нAXP [44]. Создание этих фотопереключателей является перспективным для изучения физиологической и патологической роли гетеромерных нAXP в мозге.

РЕЦЕПТОРЫ ГАМК

Ионотропные ГАМК-рецепторы являются основными рецепторами, обеспечивающими быструю тормозную синаптическую передачу в ЦНС позвоночных [81]. Выброс ГАМК из пресинаптических окончаний стимулируют открытие анион-избирательных ионных каналов. При низкой концентрации внутриклеточного хлора, наблюдаемой, как правило у взрослых млекопитающих, открытие ионных каналов приводит к гиперполяризации постсинаптической мембраны и снижению нейрональной активности [82].

Из клеток ЦНС млекопитающих было клонировано 19 субъединиц ГАМК-рецепторов (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ε , θ , π и ρ 1–3) [83]. Комбинаторная сборка пентамеров этих различных субъединиц обеспечивает потенциально огромную молекулярную гетерогенность подтипов рецепторов ГАМК. В ЦНС наиболее распространены рецепторы ГАМК_А, состоящие из субъединиц α 1, β 2 и γ 2 с определенной стехиометрией 2 α :/2 β /1 γ (~43% всех ГАМК_АР). В зависимости от субъединичного состава, подтипы рецепторов проявляют различные электрофизиологические и фармакологические свойства и модулируются множеством фармакологических препаратов, таких как бензодиазепины, барбитураты, нейроактивные стероиды, анестетики и судорожные средства [81]. Важными фармакологическими модуляторами ГАМК-рецепторов в экспериментальных исследованиях являются такие соединения, как агонист мусцимол, антаготисты — бикукуллин и габазин, блокатор хлорных каналов — пикротоксин, а также соединения из семейства бензодиазепинов и барбитуратов, которые потенцируют активность ГАМК_АР, связываясь с различными аллостерическими участками на субъединицах рецепторов.

В головном мозге 17–20% всех нейронов являются ГАМКергическими, которые взаимодействуют с огромным числом различных типов нейронов [84]. Рецепторы ГАМК_А модулируют тревогу, возбудимость мозга, мышечный тонус, бдительность, циркадные ритмы, обучение и память [81]. Нарушение их функционирования при-

водит к серьезным болезням, включая эпилепсию, депрессию, дисбаланс артериального давления, нарушение сна, шизофрению [83].

В качестве лекарственных средств используются прежде всего бензодиазепины, такие как алпразолам, клоназепам, диазепам и лоразепам, которые усиливают работу ГАМК_АР, стимулируя их тормозную активность. Эти соединения являются одними из наиболее часто назначаемых лекарств [85]. Например, диазепам в период с 1968 по 1982 г. был самым продаваемым препаратом в США [86].

Однако действие этих фармакологических соединений из-за неизбирательного действия на многие участки ЦНС имеет ряд побочных эффектов. Использование фотоуправляемых агонистов и антагонистов создает основу для более специфического контроля активности ГАМК-рецепторов.

Фотоуправляемая модуляция ГАМК-рецепторов

Несколько типов фотоуправляемых модуляторов активности ионотропных ГАМК-рецепторов было создано в последние годы. Одним из первых является соединение MPC088, созданное на основе пропофола и фотоизомеризуемой группы азобензола (табл. 2). Пропофол является липофильным анестетиком, который потенцирует ГАМК-рецепторы, а при высоких концентрациях способен их активировать, взаимодействуя с β-субъединицей [87, 88].

Используя электрофизиологическую регистрацию ионных токов в ооцитах *Хепориз laevis* экспрессирующих ГАМК_АР в субъединичной комбинации $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, было показано, что *транс*-МРС088 в низких концентрациях (1 мкМ) потенцирует ГАМК-индуцируемые токи. В дополнение к потенциации, *транс*-МРС088 при более высоких концентрациях функционировал как агонист, активируя ГАМК_А рецепторы. Сравнительный анализ концентрационных зависимостей показал, что *транс*-МРС088 примерно в 25 раз эффективнее, чем пропофол [46]. В *цис*-конформации, вызываемой УФ-освещением (380 нм), МРС088 мало влиял на амплитуду ГАМК-индуцированных токов. Действие фотохрома МРС088 было также протестировано на нейронах Пуркинье в срезах мозжечка, которые экспрессируют преимущественно $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ ГАМК-рецепторы [89]. Результаты подтвердили фотоуправляемую модуляцию ионных токов и активности потенциалов действия в клетках Пуркинье [46].

Таким образом, эти исследования показали, что MPC088 является светоуправляемым модулятором активности ГАМК_АР. Широкое распространение формируемых $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ субъединицами ГАМК_АР нейронов головного мозга предполагает, что созданный на основе пропофола MPC088 может быть важным фармакологическим инструментом в исследованиях нервных цепей ЦНС.

На основе пропофола было синтезировано еще одно фотоуправляемое соединение – AP2 (табл. 2), которое в *транс*-конфигурации вызывало потенцирование ГАМК-ергических токов, опосредованных α1β2γ2-ГАМК_А-рецепторами, экспрессируемыми в ооцитах *Xenopus* и НЕК-клетках, в то время как *цис*-AP2 при облучении УФ предотвращал развитие этого эффекта потенцирования [45].

Пропофол известен как анальгетик, седативное средство, а также лекарство, облегчающее эпилептические приступы, особенно у пациентов с лекарственно устойчивой эпилепсией. Однако пропофол не является высокоизбирательным ГАМК-модулирующим соединением. Он также действует на натриевые и кальциевые каналы и является антагонистом NMDA-рецепторов [91–93]. В силу низкой избирательности он обладает рядом побочных эффектов, таких как артериальная гипотензия, брадикардия, дыхательная недостаточность и в некоторых случаях может стимулировать судороги [90, 94].

Фотохром	Структурная формула	Год	Действие	Ссылка
MPC088	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} & & \\ $	2012	<i>Trans</i> -агонист α1β2γ2-ГАМК _А рецепторов экспрессирующихся в ооцитах ксенопуса, в клетках Пуркинье и сетчатки	[46]
AP2	HO N N N H	2012	<i>Trans</i> -агонист α β2γ2-ГАМК _А рецепторов экспрессирующихся в ооцитах ксенопуса и в НЕК-клетках	[45]
MAM-6	$\sum_{O}^{O} \sum_{H}^{O} \sum_{H}^{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{N_{$	2014	<i>Trans</i> -антагонист α1(T125C)β2γ2-GABA _A рецепторов экспрессирующихся в ооцитах ксенопуса	[95]
MAB-0	$\sum_{O}^{O} \underset{H}{\overset{O}{\overset{O}{\overset{O}{\overset{O}{\overset{O}{\overset{O}{\overset{O}{\overset$	2014	Сія-агонист мутантных α(СТ125С)β2γ2 рецепторов экспрессирующихся в НЕК-клетках	[95]
PAG-1C	$ \begin{array}{c} & H \\ & N $	2015	<i>Trans</i> - антагонист мутантных α1(T125C)β2γ2 ГАМК _А рецепторов экспрессирующихся в НЕК-клетках и нейронах гиппокампа	[96]
PAG-2A	$ \underset{O}{\overset{N}{\underset{H}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset$	2015	Сіз- антагонист мутантных α1(T125C)β2γ2 ГАМК _А рецепторов экспрессирующихся в НЕК-клетках	[96]
Azo-gabazine	NNH OH	2016	<i>Trans</i> -антагонист α1β2γ2-ГАМК _А рецепто- ров экспрессирующихся в НЕК-клетках.	[46]
Azo-NZ1		2018	<i>Trans</i> -блокатор каналов α1β2γ2-ГАМК _А и ρ2 ГАМК _С экспрессирую- щихся в СНО клетках и нейронах срезов гиппо- кампа.	[47]
dMPC1	$ \xrightarrow{Me}_{N = N} \xrightarrow{N_{N}}_{Me} \xrightarrow{N_{N}}_{Me} \xrightarrow{NH_{2}^{+}}_{NH_{2}^{-}} \xrightarrow{NH_{2}^{+}}_{NH_{2}^{-}} $	2018	<i>Trans</i> -антагонист α1β2γ2-ГАМК _А -рецепто- ров экспрессирующихся в НЕК-клетках	[99]

Таблица 2. Фотохромные модуляторы ГАМК рецепторов

Фотохром	Структурная формула	Год	Действие	Ссылка
Fulgazepam		2020	Аллостерический <i>cis</i> -потенциатор α1β2γ2-GABA _A -рецеторов экспрессирующихся в СНО клетках и в личин- ках зебра рыбки <i>in vivo</i>	[48]

Таблица 2. Окончание

Фотопереключаемые аналоги пропофола в сочетании с локальной оптической стимуляцией и соответствующим электрическим мониторингом могут создать в будущем способы снижения побочных эффектов при лечении эпилепсии за счет использования пространственно точных оптических средств, регулирующих модуляцию рецепторов. Фокусно направленное освещение может позволить пространственно ограниченное действие фотохромных модуляторов рецепторов в локальных областях эпилептических очагов.

Было сконструировано также несколько прикрепляющихся фотопереключателей, модулирующих активность ГАМК-рецепторов. МАМ-6 (табл. 2) состоит из **малеимида**, который обеспечивает ковалентное связывание фотохрома с SH группами, фотопереключателя **азобензена** и присоединенного к азобензену через углеродный ((CH2)₆) линкер **мусцимола**, последний является мощным селективным агонистом ГАМК_АР. Для обеспечения связывания фотохрома с аминокислотным участком, близким к активному центру ГАМК-рецептора, в альфа-субъединице была произведена точечная мутация α 1(T125C). Электрофизиологический анализ проводился на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих α 1(T125C)-субъединицей не вызывало активации ГАМК-рецепторов. Однако в *транс*-конфигурации (освещение 500 нм), МАМ-6 ингибировал амплитуду ГАМК-активируемых токов, связываясь с активным центром рецептора и блокируя действие нейромедиатора. В *цис*-конфигурации (освещение 380 нм), сайт связывания с агонистом освобождался и наблюдалось повышение амплитуды ГАМК-активируемых токов [95].

Другое соединение, малеимид-азобензол-4-гидроксибензиламин (МАВ-0), которое содержит нейтральный аналог мусцимола и не имеет углеродного линкера (табл. 2), было даже более эффективным светочувствительным ингибитором ГАМК_АР. После обработки МАВ-0 культивируемые нейроны гиппокампа, экспрессирующие α1(T125C)β2 ГАМК-рецепторы, эффективно модулировались светом [95].

Таким образом, соединения MAM-6 и MAB-0, созданные на основе мусцимола, проявляли свойства светоуправляемых *транс*-антагонистов ГАМК_AP. Однако слабая эффективность и низкая растворимость (<50 мМ) затрудняла их экспериментальное использование, особенно *in vivo*. Для повышения эффективности были созданы новые фотохромные модуляторы ГАМК_AP, где в качестве лиганда использовалась ГАМК или ее гуанидиниевые аналоги (серия РАG) (табл. 2) [96].

Соединения были исследованы *in vitro* на рецепторах, формируемых из разных α-ГАМК-субъединиц, а также *in vivo*. Было показано, что в темноте или при освещении видимым светом (480–560 нм) *транс*-изомеры не активны, а при УФ-освещении (380 нм), в *цис*-конфигурации фотохромы блокируют ГАМК-рецепторы, являясь антагонистами естественного нейромедиатора, выделяющегося из пресинаптических окончаний [96].

Еще один светоуправляемый антагонист ГАМК-рецепторов, азогабазин (табл. 2) [97], был создан путем объединения фотопереключателя азобензола с габазином,

высокоизбирательным конкурентным антагонистом ГАМК_AP [98]. Электрофизиологический анализ на культивируемых клетках НЕК293, экспрессирующих $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AP, показал, что азогабазин является одним из наиболее сильных антагонистов с IC₅₀ = 23 nM. Блокирующее действие проявлял *транс*-азогабазин (освещение 470 нм), в то время как *цис*-азогабазин (освещение 365 нм) был не эффективным. Таким образом, этот фотохром является мощным, высокоизбирательным и светоуправляемым антагонистом ГАМК_AP, представляющим большой интерес для исследования в различных экспериментальных моделях.

Фотохромные соединения, созданные на основе азобензола, не способны находиться длительное время в метастабильном состоянии при *mpaнc/цис*-изомеризации, что затрудняет их использование в некоторых экспериментальных моделях. Эта проблема была решена в недавней работе из лаборатории Kramer [99]. Было синтезировано соединение dMPC1 (табл. 2), которое позволяет двунаправленное управление рецепторами с помощью света с длиной волны 380 и 500 нм. На НЕК-клетках, экспрессирующих ГАМК_АР, было показано, что фотохром dMPC1 может на длительное время заблокировать рецепторы в активном или неактивном состоянии в темноте после короткого импульса света [99]. Таким образом, эта стратегия обеспечивает как быстрое, так и длительное манипулирование тормозной синаптической передачей, позволяя исследовать функции нейрональных сетей в широком диапазоне временных интервалов.

Как уже отмечалось, одним из наиболее используемых фармакологических соединений, усиливающих активность ионотропных ГАМК_АР, является диазепам, классическое соединение, вызывающее потенциацию ГАМК-рецепторов через аллостерический сайт и широко используемое для предотвращения эпилептических кризов [85, 86, 100–102]. В предположении получить управляемый светом потенцирующий агент, который будет аллостерически взаимодействовать с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_АР, было синтезировано соединение азобензол-нитразепам (Азо-NZ1), состоящее из фрагмента нитразепама, слитого с фотоизомеризуемой группой азобензола (табл. 2) [47]. Однако экспериментальный анализ на СНО-клетках, экспрессирующих в условиях культуры ткани рецепторы известного субъединичного состава, показал, что Azo-NZ1 является не потенциатором, а светоуправляемым антагонистом ГАМК-индуцируемых токов. *Транс*-Azo-NZ1 (освещение видимым светом 460-560 нм) блокировал анион-избирательные каналы гетеромерных ГАМК_AP ($\alpha 1/\beta 2/\gamma 2$), а также одного из подтипов гомомерных ГАМК_C (p2). Было показано, что *mpahc*-Azo-NZ1 взаимодействует с 2'-уровнем трансмембранного домена (TM2), формирующего анионную пору. В цис-конфигурации Azo-NZ1 освобождал пору, был неактивен и амплитуда ГАМК-активируемых токов восстанавливалась. Было также показано, что Azo-NZ1 модулирует светозависимым образом синаптические ГАМКергические токи в нейронах срезов гиппокампа мышей, вызывая их ингибирование в *транс*-конфигурации [47].

Таким образом, Azo-NZ1 проявляет свойства фотоуправляемого неконкурентного антагониста рецепторов GABA_A, взаимодействуя с аминокислотными остатками, формирующими анионный канал.

Другой фотохром, фульгазепам (Fulgazepam, табл. 2), созданный на базе диазепама и фульгимида (из семейства диарилитенов, рис. 1), оказался потенцирующим соединением. Электрофизиологический *in vitro* анализ на линии культивируемых клеток, гетерологически экспрессирующих $\alpha 1/\beta 2/\gamma 2$ субъединицы ГАМК_АР, показал, что аппликация фульгазепама (10 мкМ) в открытой форме (освещение видимым светом) практически не влияла на амплитуду токов, индуцируемых ГАМК (0.5 мкМ). Однако при УФ-освещении, переводящим фульгазепам в закрытую форму, наблюдалось повышение амплитуды ГАМК-индуцируемых токов в 200–300 раз. Анализ концентрационных зависимостей показал, что EC₅₀ для фульгазепама в закрытой форме составляет 13 мкМ [48].

Таким образом, создан новый фотоуправляемый потенциатор ГАМК_АР, обладающий уникальными свойствами: а) под действием соответствующих длин волн обеспечивается обратимое переключение соединения из открытого в закрытое состояние; б) оба состояния стабильны; в) в открытой форме соединение является нейтральным. Эти свойства указывают на потенциальную важность фульгазепама, как фотоуправляемого аллостерического потенциатора ГАМК-рецепторов.

В общем, "библиотека" фотохромных соединений, способных модулировать активность ГАМК-рецепторов, достаточно обширна и открывает большие возможности для анализа ГАМК-зависимых процессов торможения и возбуждения в нейронных сетях и моделях нейрональных патологий.

РЕЦЕПТОРЫ ГЛИЦИНА

Глициновые рецепторы (ГлиР), как и ионотропные ГАМКР формируют анионизбирательные ионные каналы и обеспечивают быстрое торможение в нервной системе млекопитающих. ГлиР экспрессируются преимущественно в спинном мозге и стволе мозга, а также во многих других областях нервной системы, включая сетчатку [103], гиппокамп [104–106], зубчатую фасцию [107], кору мозжечка [108], слуховое и вестибулярное ядра [109] и другие части головного мозга [104, 110, 111].

Из мозга млекопитающих выделено и клонировано четыре подтипа α -субъединиц ГлиР (α 1, α 2, α 3, α 4), которые на 90% гомологичны между собой [112, 113] и β -субъединицу, которая имеет 47% гомологии с α 1 [114]. Аналогичный набор субъединиц характерен для нервной системы зебра рыбки *Danio rerio* [115–117]. Субъединицы α 1, α 2 и α 3 могут формировать функциональные гомомерные ГлиР, а комбинации с β -субъединицей они формируют гетеромерные рецепторы. Однако β -субъединица не обладает способностью формировать функциональные гомомерные рецепторы [118, 119]. Субъединица β является наиболее распространенной по сравнению с другими субъединицами. Ее важным свойством является наличие в цитоплазматическом домене участка связывания с джеферином – арматурным белком, играющим ключевую роль в формировании синаптических кластеров [120–122]. Другими словами, эта субъединица обеспечивает синаптическую локализацию ГлиР.

Свойства гомомерных и гетеромерных рецепторов проявляют функциональные и фармакологические различия: проводимость одиночных каналов [119], действие блокаторов [123, 124], синаптическая и экстрасинаптическая экспрессия [125]. Субъединичный состав ГлиР меняется в процессе онтогенеза. В период эмбриогенеза и на ранних стадиях постнатального развития наиболее распространенной является α 2-субъединица, а в ЦНС взрослых млекопитающих преобладает α 1-субъединица [110, 126].

Фотохромные модуляторы рецепторов глицина

Недавно создано два первых фотохромных модулятора активности ГлиР [49, 50]. Оба соединения созданы на базе азобензола и диазепама (табл. 3).

Первое соединение — это описанный выше фотохром Azo-NZ1. Поскольку Azo-NZ1 является светоуправляемым блокатором хлор-избирательных каналов рецепторов ГАМК, то необходимо было выяснить, действует ли фотохром на другие типы анион-избирательных каналов, формируемых разными субъединицами ГлиР. В линиях культивируемых клеток, экспрессирующих рецепторы известного субъединичного состава, показано, что фотохром Azo-NZ1 оказывал слабый эффект на

Фотохром	Структурная формула	Год	Действие	Ссылка
Azo-NZ1		2018	<i>Trans</i> -блокатор каналов ГлиР α2 экспрессирующихся в СНО клетках и синапрических ГлиР в срезах неонатального мозга	[46]
Glight		2020	Trans-блокатор каналов α1β2γ2-ГАМК _A and p2 ГАМК _C рецепторов receptors экспрессирующихся в СНО клетках и синапрических ГлиР в срезах гиппокампа	[47]

Таблица 3. Фотохромные модуляторы рецепторов глицина

глицин-активируемые токи в клетках, экспрессирующих гомомерные α -ГлиР и гетеромерные ГлиР, формируемые $\alpha 1/\beta$ -субъединицами. С другой стороны, Azo-NZ1 вызывал сильное угнетение амплитуды глицин-активируемых токов в клетках, экспрессирующих гомомерные $\alpha 2$ -ГлиР и гетеромерные ГлиР, формируемые $\alpha 2/\beta$ -субъединицами. С помощью целенаправленного мутагенеза трансмембранного домена, формирующего анион-избирательную пору, был определен сайт взаимодействия Azo-NZ1 с ГлиР. В дополнение к анализу на ГАМК_AР, было показано, что в ГлиР аминокислота в положении 2' поры ионного канала имеет решающее значение для блокирующего действия Azo-NZ1 [49].

Результаты, полученные при гетерологической экспрессии ГлиР известного субъединичного состава, предполагают, что Azo-NZ1 может быть эффективным светоуправляемым модулятором активности глицинергических синапсов на ранних фазах постнатального развития, взаимодействуя с "неонатальными" рецепторами, формируемыми альфа2-субъединицами.

Эту гипотеза была проверена на мотонейронах гипоглоссального ядра срезов ствола мозга мышей, имеющих мощные глицинергические синаптические входы [127, 128]. Известно, что экспрессия подтипов ГлиР регулируется в процессе развития: при рождении и в первые постнатальные дни у грызунов преобладают альфа2субъединицы ГлиР, но в течение двух недель постнатальной жизни экспрессия альфа1-субъединицы резко увеличивается и на взрослых этапах становится преобладающей [110, 129, 130]. Сравнительный анализ вызванных постсинаптических глицинергических токов был проведен на мотонейронах гипоглоссального ядра срезов мозга мышей на разных стадиях постнатального развития. Было показано, что Azo-NZ1 в *транс*-конфигурации блокирует вызванные постсинаптические токи, опосредованные ГлиР, сформированными "неонатальными" альфа2-субъединицами, и мало влияет на токи, опосредованные рецепторами, сформированными "взрослыми" альфа1-субъединицами. Облучение ультрафиолетом, переводящее фотохром в *иис*-конфигурацию, устраняет действие Azo-NZ1 на "неонатальные" альфа2-ГлиР в срезах мозга. Эти результаты показывают, что Azo-NZ1 является светоуправляемым модулятором глицинергичесих синапсов неонатального мозга.

Второй фотохромный модулятор ГлиР, названный Glyght (табл. 3), синтезирован на основе 7-амино-нитразепама и 2-нитропиридина. Как и другие азобензольные производные бензодиазепина, Glyght при облучении УФ переходит в *цис*-конфигурацию, а при облучении синим или видимым светом — в *транс*-конфигурацию [50]. На мотонейронах гипоглоссального ядра срезов мозга неонатальных мышей показано, что в *транс*-конфигурации Glyght является "инертным", т.е. не оказывает влияния на вызванные глицинергические постсинаптические токи. Освещение УФ (*цис*-Glyght) приводило к снижению амплитуды токов. Анализ *in vivo* показал, что Glyght эффективно влияет на поведение зебра рыбок *Dario re-rio* [50].

Таким образом, фотохромные соединения Azo-NZ1 и Glyght являются модуляторами ГлиР, и их использование является перспективным для контроля тормозных процессов в нервной системе млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, представленные данные показывают, что фотофармакология является чрезвычайно перспективным направлением, открывающим уникальные возможности для дистанционной стимуляции нейронов. При этом, как правило, не требуются генетические манипуляции для создания высокоизбирательных светоуправляемых фармакологических препаратов, воздействующих на определенные участки мозга.

Одним из важных ограничений широкого использования азобензолов так же, как и других фотопереключателей, является необходимость освещения короткими длинами волн ультрафиолетового диапазона, которые могут вызывать отрицательное воздействие на функции биологических молекул. Однако в последние годы разрабатываются азобензольные переключатели в красном диапазоне световых волн [131].

Использование света в качестве регулятора активности биологических молекул открывает возможности для точного пространственного и временного контроля активностью клеток, органов и целых организмов. Эти особенности являются важными для физиологического анализа функций нервной системы и, возможно, в будущем — обеспечения мощных и избирательных контролируемых светом терапевтических воздействий.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 18-15-00313.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, написание и редактирование статьи (П.Д.Б); работа с литературой, с текстом, создание таблиц, оформление списка литературы (Д.Н.П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Магазаник Л.Г. (1968) Механизм десенситизации постсинаптической мембраны мышечных волокон. Биофизика. 13(1): 199–202. [Magazanik L.G. (1968) On the mechanism of desensitization of the muscle fiber postsynaptic membrane. Biofizika. 13(1): 199–202 (In Russ)].
- Magazanik L.G., Nasledov G.A. (1970) Desensitization to acetylcholine of frog tonic muscle fibres. Nature. 226(5243): 370–371.
- 3. Magazanik L.G., Vyskocit F. (1975) The effect of temperature on desensitization kinetics at the post-synaptic membrane of the frog muscle fibre. J. Physiol. 249(2): 285–300.

- Magazanik L.G., Snetkov V.A., Giniatullin R.A., Khazipov R.N. (1990) Changes in the time course of miniature endplate currents induced by bath-applied acetylcholine. Neurosci. Lett. 113(3): 281–285.
- 5. *Giniatullin R.A., Magazanik L.G.* (1998) Desensitization of the post-synaptic membrane of neuromuscular synapses induced by spontaneous quantum secretion of mediator. Neurosci. Behav. Physiol. 28(4): 438–442.
- Magazanik L.G. (1976) Functional properties of postjunctional membrane. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16(1): 161–175.
- 7. *Magazanik L.G.* (2000) Blockade of ion channels as an approach to studying AMPA receptor subtypes. Neurosci. Behav. Physiol. 30(1): 27–35.
- Тихонов Д.Б., Магазаник Л.Г. (2008) Происхождение и молекулярная эволюция ионотропных рецепторов глутамата. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 94(9): 989– 1004. [*Tikhonov D.B., Magazanik L.G.* (2008) Origin and molecular evolution of ionotropic glutamate receptors. Russ. J. Physiol. 94(9): 989–1004 (In Russ)].
- Калеменев С.В., Зубарева О.Е., Лукомская Н.Я., Магазаник Л.Г. (2012) Нейропротекторное действие неконкурентных блокаторов NMDA-рецепторов ИЭМ-1957 и мемантина на модели фокальной ишемии мозга. Докл. Акад. наук. 443 (6): 750–750. [Kalemenev S.V., Zubareva O.E., Lukomskaya N.Y., Magazanik L.G. (2012) Neuroprotective effect of noncompetitive NMDA receptor antagonists IEM-1957 and memantine in experimental focal cerebral ischemia. Dokl. Biol. Sci. 443(1): 78–80 (In Russ)].
- Ватаев С.И., Оганесян Г.А., Лукомская Н.Я., Магазаник Л.Г. (2013) Влияние блокаторов каналов ионотропных глутаматных рецепторов на эффекты депривации сна у крыс. Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова. 99(5): 575–585. [Vataev S.I., Oganesian G.A., Lukomskaia N., Magazanik L.G. (2013) The action of ionotropic glutamate receptor channel blockers on effects of sleep deprivation in rats. Russ. J. Physiol. 99(5): 575–585 (In Russ)].
- Malkin S.L., Kim K.K., Tikhonov D.B., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2015) Statistical models suggest presence of two distinct subpopulations of miniature EPSCs in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. Neuroscience. 301: 508–519. https://doi.org/:10.1016/j.neuroscience.2015.06.034
- Чижов А.В., Амахин Д.В., Зайцев А.В., Магазаник Л.Г. (2018) АМРАR-опосредованные интериктальные разряды в нейронах энторинальной коры: эксперимент и модель. Докл. Акад. наук. 479(1): 103–106 [*Chizhov A.V., Amakhin D.V., Zaizev A.V., Magazanik L.G.* (2018) AMPAR-mediated interictal discharges in neurons of entorhinal cortex: experiment and model. Dokl. Biol. Sci. 479(1): 47–50 (In Russ)]. https://doi.org/:10.1134/S0012496618020011
- Bregestovski P, Maleeva G., Gorostiza P. (2018) Light-induced regulation of ligand-gated channel activity. Br. J. Pharmacol. 175(11): 1892–1902. https://doi.org/:10.1111/bph.14022
- Lin W.C., Tsai M.C., Rajappa R., Kramer R.H. (2018) Design of a highly bistable photoswitchable tethered ligand for rapid and sustained manipulation of neurotransmission. J. Am. Chem. Soc. 140(24): 7445–7448. https://doi.org/:10.1021/jacs.8b03942
- 15. *Deisseroth K.* (2011) Optogenetics. Nat. Methods. 8(1): 26–29. https://doi.org/:10.1038/nmeth.f.324
- Kim C.K., Adhikari A., Deisseroth K. (2017) Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. Nat. Rev. Neurosci. 18(4): 222–235. https://doi.org/:10.1038/nrn.2017.15
- Gorostiza P., Isacoff E. Y. (2008) Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling. Science. 322(5900): 395–399. https://doi.org/:10.1126/science.1166022
- Bregestovski P., Waseem T., Mukhtarov M. (2009) Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channel activity. Front. Mol. Neurosci. 2(15).
 - https://doi.org/:10.3389/neuro.02.015.2009
- Suzuki J., Kanemaru K., Iino M. (2016) Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. Biophys. J. 111(6): 1119–1131. https://doi.org/:10.1016/j.bpj.2016.04.054
- Imamura H., Nhat K.P.H., Togawa H., Saito K., Iino R., Kato-Yamada Y., Nagai T., Noji H. (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106(37): 15651–15656. https://doi.org/:10.1073/pnas.0904764106
- Berg J., Hung Y.P., Yellen G. (2009) A genetically encoded fluorescent reporter of ATP: ADP ratio. Nat. Methods. 6(2): 161–166. https://doi.org/:10.1038/nmeth.1288
- 22. Schumacher C.H., Körschen H.G., Nicol C., Gasser C., Seifert R. Schwärzel M., Möglich A. (2016) A fluorometric activity assay for light-regulated cyclic-nucleotide-monophosphate ac-

tuators. Methods. Mol. Biol. 1408: 93–105. https://doi.org/:10.1007/978-1-4939-3512-3 7

- 23. Wojtovich A.P., Foster T.H. (2014) Optogenetic control of ROS production. Redox. Biol. 2: 368–376.
 - https://doi.org/:10.1016/j.redox.2014.01.019
- 24. Bilan D.S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A.Y., Ermakova Y.G., Gadella T., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. (2013) HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. ACS Chem. Biol. 8(3): 535–542. https://doi.org/:10.1021/cb300625g
- Covington H.E., Lobo M.K., Maze I., Vialou V., Hyman J.M., Zaman S., LaPlant Q., Mouzon E., Ghose S., Tamminga C.A., Neve R.L., Deisseroth K., Nestler E.J. (2010) Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. J. Neurosci. 30(48): 16082–16090. https://doi.org/:10.1523/JNEUROSCI.1731-10.2010
- Haubensak W., Kunwar P.S., Cai H., Ciocchi S., Wall N.R., Ponnusamy R., Biag J., Dong H., Deisseroth K., Callaway E.M., Fanselow M.S., Lüthi A., Anderson D.J. (2010) Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. Nature. 468(7321): 270–276. https://doi.org/:10.1038/nature09553
- 27. Velema A., Szymanski W., Feringa B.L. (2014) Photopharmacology: beyond proof of principle. J. American. Chem. Soc. 136(6): 2178–2191. https://doi.org/:10.1021/ja413063e
- 28. Mitscherlich E. (1834) Uber das stickstoffbenzid. Ann. der Physik. 108(15): 225-227.
- 29. Hartley G.S. (1937) The cis-form of azobenzene. Nature. 140(3537): 281-281.
- Merino E., Ribagorda M. (2012) Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. Beilstein. J. Org. Chem. 8(1): 1071–1090. https://doi.org/:10.3762/bjoc.8.119
- Koshima H., Ojima N., Uchimoto H. (2009) Mechanical motion of azobenzene crystals upon photoirradiation. J. Am. Chem. Soc. 131(20): 6890–6891. https://doi.org/:10.1021/ja8098596
- 32. *Irie M.* (2000) Diarylethenes for memories and switches. Chem. Rev. 100(5): 1685–1716. https://doi.org/:10.1021/cr980069d
- Lubbe A.S., Szymanski W., Feringa B.L. (2017) Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function. Chem. Soc. Rev. 46(4): 1052–1079. https://doi.org/:10.1039/c6cs00461j
- 34. *Klajn R.* (2014) Spiropyran-based dynamic materials. Chem. Soc. Rev. 43(1): 148–184. https://doi.org/:10.1039/c3cs60181a.
- Lin W.C., Kramer R.H. (2018) Light-Switchable Ion Channels and Receptors for Optogenetic Interrogation of Neuronal Signaling. Bioconjug. Chem. 29(4): 861–869. https://doi.org/:10.1021/acs.bioconjchem.7b00803
- Fortin D.L., Dunn T.W., Fedorchak A., Allen D., Montpetit R., Banghart M.R., Trauner D., Adelman J.P., Kramer R.H. (2011) Optogenetic photochemical control of designer K+ channels in mammalian neurons. J. Neurophysiol. 106(1): 488–496. https://doi.org/:10.1152/jn.00251.2011
- Leippe P., Winter N., Sumser M.P., Trauner D. (2018) Optical control of a delayed rectifier and a two-pore potassium channel with a photoswitchable bupivacaine. ACS Chem. Neurosci. 9(12): 2886–2891. https://doi.org/:10.1021/acschemneuro.8b00279
- Trads J.B., Hüll K., Matsuura B.S., Laprell L., Fehrentz T., Görldt N., Kozek K.A., Weaver C.D., Klöcker N., Barber D.M., Trauner D. (2019) Sign inversion in photopharmacology: Incorporation of cyclic azobenzenes in photoswitchable potassium channel blockers and openers. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 58(43): 15421–15428. https://doi.org/:10.1002/anie.201905790
- Volgraf M., Gorostiza P., Numano R., Kramer R.H., Isacoff E.Y., Trauner D. (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. Nat. Chem. Biol. 2(1): 47–52. https://doi.org/:10.1038/nchembio756
- Gorostiza P., Volgraf M., Numano R., Szobota S., Trauner D., Isacoff E.Y. (2007) Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 104(26): 10865–10870. https://doi.org/:10.1073/pnas.0701274104
- Laprell L., Repak E., Franckevicius V., Hartrampf F., Terhag J., Hollmann M., Sumser M., Rebola N., DiGregorio D.A., Trauner D. (2015) Optical control of NMDA receptors with a diffusible photoswitch. Nat. Commun. 6(1): 1–11. https://doi.org/:10.1038/ncomms9076
- 42. Donthamsetti P.C., Winter N., Schönberger M., Levitz J., Stanley C., Javitch J.A., Isacoff E.Y., Trauner D. (2017) Optical control of dopamine receptors using a photoswitchable tethered in-

verse agonist. J. Am. Chem. Soc. 139(51): 18522–18535. https://doi.org/:10.1021/jacs.7b07659

- Lemoine D., Habermacher C., Martz A., Méry P.F., Bouquier N., Diverchy F., Taly A., Rassendren F., Specht A., Grutter T. (2013) Optical control of an ion channel gate. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110(51): 20813–20818. https://doi.org/:10.1073/pnas.1318715110
- 44. Tochitsky I., Banghart M.R., Mourot A., Yao J.Z., Gaub B., Kramer R.H., Trauner D. (2012) Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nat. Chem. 4(2): 105–111. https://doi.org/:10.1038/nchem.1234
- 45. Stein M., Middendorp S.J., Carta V., Pejo E., Raines D.E., Forman S.A., Sigel E., Trauner D. (2012) Azo-propofols: photochromic potentiators of GABAA receptors. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51(42): 10500–10504. https://doi.org/:10.1002/anie.201205475
- 46. Yue L., Pawlowski M., Dellal S.S., Xie A., Feng F., Otis T.S., Bruzik K.S., Qian H., Pepperberg D.R. (2012) Robust photoregulation of GABA A receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. Nat. Commun. 3(1): 1–12. https://doi.org/:10.1038/ncomms2094
- Maleeva G., Wutz D., Rustler K., Nin-Hill A., Rovira C., Petukhova E., Bautista-Barrufet A., Gomila-Juaneda A., Scholze P., Peiretti F., Alfonso-Prieto M., König B., Gorostiza P., Bregestovski P. (2019) A photoswitchable GABA receptor channel blocker. Br. J. Pharmacol. 176(15): 2661–267.
 - https://doi.org/:10.1111/bph.14689
- Rustler K., Maleeva G., Gomila A.M., Gorostiza P., Bregestovski P., König B. (2020) Optical Control of GABAA Receptors with a Fulgimide-Based Potentiator. Chemistry. 26(56): 12722–12727. https://doi.org/:10.1002/chem.202000710
- Maleeva G., Nin-Hill A., Rustler K., Petukhova E., Ponomareva D., Mukhametova E., Gomila-Juaneda A., Wutz D., Alfonso-Prieto M., König B., Gorostiza P., Bregestovski P. (2021) Subunit-specific photocontrol of glycine receptors by azobenzene-nitrazepam photoswitcher. eNeuro. 8(1). https://doi.org/:10.1523/ENEURO.0294-20.2020
- Gomila A.M., Rustler K., Maleeva G., Nin-Hill A., Wutz D., Bautista-Barrufet A., Rovira X., Bosch M., Mukhametova E., Petukhiva E., Ponomareva D., Mukhamedyarov M., Peiretti F., Alfonso-Prieto M., Rovira C., König B., Bregestovski P., Gorostiza P. (2020) Photocontrol of endogenous glycine receptors in vivo. Cell. Chem. Biol. 27(11): 1425–1433. https://doi.org/:10.1016/j.chembiol.2020.08.005
- Thompson A.J., Lester H.A., Lummis S.C. (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. Q Rev. Biophys 43(4): 449–499. https://doi.org/:10.1017/S0033583510000168
- Ortells M.O. Lunt G.G. (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. Trends. Neurosci. 18(3): 121–127. https://doi.org/:10.1016/0166-2236(95)93887-4
- 53. Karlin A., Akabas M.H. (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. Neuron. 15(6): 1231–1244.
- 54. Вульфиус Е.А. (2006) α7-Подтип нейрональных никотиновых рецепторов ацетилхолина: структура, свойства, распространение, функции. Биол. Мембр. 23(2): 111–118 [Vulfius C.A. (2006) α7-subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structure, properties, distribution, functions. Biol. Membr. 23(2): 111–118 (In Russ)].
- 55. Малеева Г.В., Брежестовский П.Д. (2014) Молекулярная физиология рецепторов глицина в нервной системе позвоночных. Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова 100(3): 274–300 [Maleeva G.V., Bregestovski P.D. (2014) Molecular physiology of glycine receptors in nervous system of vertebrates. Russ. J. Physiol. 100(3): 274–300 (In Russ)].
- Millar N.S., Gotti C. (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology 56(1): 237–246. https://doi.org/:10.1016/j.neuropharm.2008.07.041
- Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. Nat. Rev. Neurosci. 3(2): 102–114. https://doi.org/:10.1038/nrn731
- Changeux J. P. (2012) The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. J. Biol. Chem. 287(48): 40207–40215. https://doi.org/:10.1074/jbc.R112.407668
- Miledi R. (1960) Junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres. J. Physiol. 151(1): 24–30.
- Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B. (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. Nature. 321(6068): 406–411.

- Hall Z.W., Sanes J.R. (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. Cell. 72: 99–121.
- McGehee D.S., Role L.W. (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. Annu. Rev. Physiol. 57(1): 521–546.
- Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S.J. (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. FEBS J. 274(15): 3799–3845. https://doi.org/:10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x
- 64. Gotti C., Zoli M., Clementi F. (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. Trends. Pharmacol. Sci. 27(9): 482–491. https://doi.org/:10.1016/j.tips.2006.07.004
- Hogg R.C., Raggenbass M., Bertrand D. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 147: 1–46. https://doi.org/:10.1007/s10254-003-0005-1
- 66. *Benowitz N.L.* (2009) Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 49: 57–71. https://doi.org/:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742
- 67. Dani J.A., De Biasi M. (2013) Mesolimbic dopamine and habenulo-interpeduncular pathways in nicotine withdrawal. Cold. Spring. Harb. Perspect. Med. 3(6): a012138. https://doi.org/:10.1101/cshperspect.a012138
- Posadas I., López-Hernández B., Ceña V. (2013) Nicotinic receptors in neurodegeneration. Curr. Neuropharmacol. 11(3): 298–314. https://doi.org/:10.2174/1570159X11311030005
- Deal W.J., Erlanger B.F., Nachmansohn D. (1969) Photoregulation of biological activity by photochromic reagents, III. Photoregulation of bioelectricity by acetylcholine receptor inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 64(4): 1230–1234. https://doi.org/:10.1073/pnas.64.4.1230
- Conti-Tronconi B.M., Hunkapiller M.W., Lindstrom J.M., Raftery M.A. (1982) Subunit structure of the acetylcholine receptor from Electrophorus electricus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79(21): 6489–6493.
- 71. Bartels E., Wassermann N.H., Erlanger B.F. (1971) Photochromic activators of the acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 68(8): 1820–1823.
- Damijonaitis A., Broichhagen J., Urushima T., Hüll K., Nagpal J., Laprell L., Schönberger M., Woodmansee D.H., Rafiq A., Sumser M.P., Kummer W., Gottschalk A., Kummer W. (2015) Azo-Choline enables optical control of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in neural networks. ACS Chem. Neurosci. 6(5): 701–707.
 - https://doi.org/:10.1021/acschemneuro.5b00030
- 73. *Karlin A*. (1969) Chemical modification of the active site of the acetylcholine receptor. J. Gen. Physiol. 54(1): 245–264.
- Bregestovski P.D., Iljin V.I., Jurchenko O.P., Veprintsev B.N., Vulfius C.A. (1977) Acetylcholine receptor conformational transition on excitation masks disulphide bonds against reduction. Nature. 270(5632): 71–73.
- 75. *Sheridan R.E., Lester H.A.* (1982) Functional stoichiometry at the nicotinic receptor. The photon cross section for phase 1 corresponds to two bis-Q molecules per channel. J. Gen. Physiol. 80(4): 499–515.
- Lester H.A., Krouse M.E., Nass M.M., Wassermann N.H., Erlanger B.F. (1980) A covalently bound photoisomerisable agonist. Comparison with reversibly bound agonists at Electrophorus electroplaques. J. Gen. Physiol. 75(2): 207–232.
- 77. Lester H.A., Krouse M.E., Nass M.M., Wassermann N.H., Erlanger B.F. (1979) Light-activated drug confirms a mechanism of ion channel blockade. Nature. 280(5722): 509–510.
- Krouse M.E., Lester H.A., Wassermann N.H., Erlanger B.F. (1985) Rates and equilibria for a photoisomerizable antagonist at the acetylcholine receptor of Electrophorus electroplaques. J. Gen. Physiol. 86(2): 235–256.
- Chabala L.D., Gurney A.M., Lester H.A. (1986) Dose-response of acetylcholine receptor channels opened by a flash-activated agonist in voltage-clamped rat myoballs. J. Physiol. 371(1): 407–433.
- Celie P.H., van Rossum-Fikkert S.E., van Dijk W.J., Brejc K., Smit A.B., Sixma T.K. (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. Neuron. 41(6): 907–914. https://doi.org/:10.1016/s0896-6273(04)00115-1
- 81. *Sieghart W.* (1995) Structure and pharmacology of g-aminobutyric acid A receptor subtypes. Pharmacol. Rev. 47: 181–234.
- Knoflach F., Hernandez M.C., Bertrand D. (2016) GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. Biochem. Pharmacol. 115: 10–17. https://doi.org/:10.1016/j.bcp.2016.03.014

- Sieghart W., Sperk G. (2002) Subunit composition, distribution and function of GABAA receptor subtypes. Curr. Top. Med. Chem. 2(8): 795–816. https://doi.org/:10.2174/1568026023393507
- 84. Somogyi P., Tamas G., Lujan R., Buhl E.H. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. Brain. Res. Brain. Res. Rev. 26(2–3): 113–135.
- 85. Salzman C. (1998) Addiction to benzodiazepines. Psy. Quart. 69: 251–261.
- Calcaterra N.E., Barrow J.C. (2014) Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). ACS Chem. Neurosci. 5(4): 253–260. https://doi.org/:10.1021/cn5000056
- 87. Chang-Sheng S.C., Olcese R., Olsen R.W. (2003) A single M1 residue in the β2 subunit alters channel gating of GABAA receptor in anesthetic modulation and direct activation. J. Biol. Chem. 278(44): 42821–42828. https://doi.org/:10.1074/jbc.M306978200
- Bali M., Akabas M.H. (2004) Defining the propofol binding site location on the GABAA receptor. Mol. Pharmacol. 65(1): 68–76. https://doi.org/:10.1124/mol.65.1.68
- Wisden W., Korpi E.R., Bahn S. (1996) The cerebellum: a model system for studying GABAA receptor diversity. Neuropharmacology. 35(9–10): 1139–1160.
- Mäkelä J., Iivanainen M., Pieninkeroinen I.P., Waltimo O., Lahdensuu M. (1993) Seizures associated with propofol anesthesia. Epilepsia. 34(5): 832–835.
- Yamakura T., Sakimura K., Shimoji K., Mishina M. (1995) Effects of propofol on various AMPA-, kainate-and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in Xenopus oocytes. Neurosci. Lett. 188(3): 187–190.
- Vasileiou I., Xanthos T., Koudouna E., Perrea D., Klonaris C., Katsargyris A., Papadimitriou L. (2009) Propofol: a review of its non-anaesthetic effects. Eur. J. Pharmacol. 605(1–3): 1–8. https://doi.org/:10.1016/j.ejphar.2009.01.007
- Wu Q., Zhao Y., Chen X., Zhu M., Miao C. (2018) Propofol attenuates BV2 microglia inflammation via NMDA receptor inhibition. Can. J. Physiol. Pharmacol. 96(3): 241–248. https://doi.org/:10.1139/cjpp-2017-0243
- Walder B., Tramèr M.R., Seeck M. (2002) Seizure-like phenomena and propofol: a systematic review. Neurology. 58(9): 1327–1332. https://doi.org/:10.1212/wnl.58.9.1327
- 95. Lin W.C., Davenport C.M., Mourot A., Vytla D., Smith C.M., Medeiros K.A., Chambers J.J., Kramer R.H. (2014) Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. ACS Chem. Biol. 9(7): 1414–1419. https://doi.org/:10.1021/cb500167u
- 96. Lin W.C., Tsai M.C., Davenport C.M., Smith C.M., Veit J., Wilson N.M., Adesnik H., Kramer R.H. (2015) A comprehensive optogenetic pharmacology toolkit for in vivo control of GABAA receptors and synaptic inhibition. Neuron. 88(5): 879–891. https://doi.org/:10.1016/j.neuron.2015.10.026
- Huckvale R., Mortensen M., Pryde D., Smart T.G., Baker J.R. (2016) Azogabazine; a photochromic antagonist of the GABA A receptor. Org. Biomol. Chem. 14(28): 6676–6678. https://doi.org/:10.1039/c6ob01101b
- Chambon J.P., Feltz P., Heaulme M., Restle S., Schlichter R., Biziere K., Wermuth C.G. (1985) An arylaminopyridazine derivative of gamma-aminobutyric acid (GABA) is a selective and competitive antagonist at the GABAA receptor site. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 82(6): 1832– 1836.
- Lin W.C., Tsai M.C., Rajappa R., Kramer R.H. (2018) Design of a highly bistable photoswitchable tethered ligand for rapid and sustained manipulation of neurotransmission. J. Am. Chem. Soc. 140(24): 7445–7448. https://doi.org/:10.1021/jacs.8b03942
- 100. Gastaut H., Naquet R., Poire R., Tassinari C.A. (1965) Treatment of status epilepticus with diazepam (Valium). Epilepsia. 6(2): 167–182.
- 101. Tan K.R., Rudolph U., Lüscher C. (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. Trends. Neurosci. 34(4): 188–197. https://doi.org/:10.1016/j.tins.2011.01.004
- 102. Rogawski M.A., Heller A.H. (2019) Diazepam buccal film for the treatment of acute seizures. Epilepsy Behav. 101(Pt B): 106537. https://doi.org/:10.1016/j.yebeh.2019.106537
- 103. Vitanova. L, Haverkamp S., Wässle H. (2014) Immunocytochemical localization of glycine and glycine receptors in the retina of the frog Rana ridibunda. Cell Tissue. Res. 317(3): 227–235. https://doi.org/:10.1007/s00441-004-0914-6
- 104. Danglot L., Rostaing P., Triller A., Bessis A. (2004) Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. Mol. Cell Neurosci. 27(4): 394–403. https://doi.org/:10.1016/j.mcn.2004.05.007

- 105. Brackmann M., Zhao C., Schmieden V., Braunewell K.H. (2004) Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324(3): 1137–1142. https://doi.org/:10.1016/j.bbrc.2004.09.172
- 106. Xu T.-L., Gong N. (2010) Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation. Prog. Neurobiol. 91(4): 349–361. https://doi.org/:10.1016/j.pneurobio.2010.04.008
- 107. Chattipakorn S.C., McMahon L.L. (2003) Strychnine-sensitive glycine receptors depress hyperexcitability in rat dentate gyrus. J. Neurophysiol. 89(3): 1339–1342. https://doi.org/:10.1152/jn.00908.2002
- Leite J.F., Cascio M. (2001) Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. Mol. Cell. Neurosci. 17(5): 777–792. https://doi.org/:10.1006/mcne.2001.0984
- 109. Friauf E., Hammerschmidt B., Kirsch J. (1997) Development of adult-type inhibitory glycine receptors in the central auditory system of rats. J. Comp. Neurol. 385(1): 117–134.
- 110. *Malosio M., Marqueze B., Pouey A., Kuhse J., Betz H.* (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. EMBO J. 10(9): 2401–2409.
- 111. Baer K., Waldvogel H.J., Faull R.L.M., Rees M.I. (2009) Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. Front. Mol. Neurosci. 4(2): 25. https://doi.org/:10.3389/neuro.02.025.2009
- Grenningloh G., Rienitz A., Schmitt B., Methfessel C., Zensen M., Beyreuther K., Gundelfinger E.D., Betz H. (1988) Molecular cloning of the antagonist-binding subunit of the glycine receptor. J. Recept. Res. 8(1-4): 183–193.
- 113. Becker C.M., Hoch W., Betz H. (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. EMBO J. 7(12): 3717–3726.
- 114. Grenningloh G., Schmieden V, Schofield P.R., Seeburg P.H., Siddique T., Mohandas T.K., Becker C.M., Betz H. (1990) Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. EMBO J. 9(3): 771–776.
- 115. David-Watine B., Goblet C., De Saint Jan D., Fucile S., Devignot V., Bregestovski P., Korn H. (1999) Cloning, expression and electrophysiological characterization of glycine receptor alpha subunit from zebrafish. Neuroscience. 90(1): 303–317.
- 116. Imboden M., De Saint Jan D., Leulier F., Korn H., Goblet C., Bregestovski P. (2001) Isolation and characterization of an alpha 2-type zebrafish glycine receptor subunit. Neuroscience. 103(3): 799–810.
- https://doi.org/:10.1016/s0306-4522(00)00575-3
- 117. Devignot V., Prado de Carvalho L., Bregestovski P., Goblet C. (2003) A novel glycine receptor αZ1 subunit variant in the zebrafish brain. Neuroscience. 122(2): 449–457. https://doi.org/:10.1016/s0306-4522(03)00171-4
- 118. Grenningloh G., Pribilla I., Prior P., Multhaup G., Beyreuther K., Taleb O., Betz H. (1990) Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. Neuron. 4(6): 963–970.
- Bormann J., Rundström N., Betz H., Langosch D. (1994) Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. EMBO J. 12(10): 3729–3737.
- 120. Meyer G., Kirsch J., Betz H., Langosch D. (1995) Identification of a Gephyrin Binding Motif on the Glycine Receptor p Subunit. Neuron. 15(3): 563–572.
- 121. *Kirsch J., Betz H.* (1995) The Postsynaptic Protein Gephyrin Localization Is Regulated of the Glycine Receptor-Associated by the Cytoskeleton. J. Neurosci. 715(6): 4148–4156.
- 122. *Kneussel M., Betz H.* (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. Trends. Neurosci. 23(9): 429–435. https://doi.org/:10.1016/s0166-2236(00)01627-1
- 123. Pribilla I., Takagi T., Langosch D., Bormann J., Betz H., Pribilla I. (1992) The atypical M2 segment of the subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. EMBO J. 11(12): 4305-4311.
- 124. Zhorov B.S., Bregestovski P.D. (2000) Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. Biophys. J. 78(4): 1786–1803.
 - https://doi.org/:10.1016/S0006-3495(00)76729-4
- 125. *Kirsch J., Meyer G., Betz H.* (1996) Synaptic Targeting of Ionotropic Neurotransmitter Receptors. Mol. Cell. Neurosci. 8(2–3): 93-98.
- 126. Singer J.H., Berger A.J. (2000) Development of inhibitory synaptic transmission to motoneurons. Brain. Res. Bull. 53(5): 553–560. https://doi.org/:10.1016/s0361-9230(00)00389-0

- 127. Singer J.H., Talley E.M., Bayliss D.A., Berger A.J. (1998) Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. J. Neurophysiol. 80(5): 2608–2620.
- Mukhtarov M., Ragozzino D., Bregestovski P. (2005) Dual Ca²⁺ modulation of glycinergic synaptic currents in rodent hypoglossal motoneurones. J. Physiol. 569(3): 817–831. https://doi.org/:10.1113/jphysiol.2005.094862
- 129. *Akagi H., Miledi R.* (1988) Heterogeneity of glycine receptors and their messenger RNAs in rat brain and spinal cord. Science. 242(4876): 270–273.
- 130. Becker C.M., Hoch W., Betz H. (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. EMBO J. 7(12): 3717–3726.
- Samanta S., Beharry A.A., Sadovski O., McCormick T.M., Babalhavaeji A., Tropepe V., Woolley G.A. (2013) Photoswitching azo compounds in vivo with red light. J. Am. Chem. Soc. 135(26): 9777–9784. https://doi.org/10.1021/ia402220t

https://doi.org/:10.1021/ja402220t

Photochromic Modulation of Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channels

P. D. Bregestovski^{a, b, *} and D. N. Ponomareva^{a, b}

^aInstitute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia ^bINSERM, INS, Institut de Neurosciences des Systèmes, Aix-Marseille University, Marseille, France *e-mail: pbreges@gmail.com

Advances in molecular and cellular biology, the development of chemical synthesis and modern technologies, enriched the modern experimental research with new directions, where the light plays a key role as a tool for modulating biological functions. One of them is photopharmacology, a field that uses chemically synthesized light-controlled compounds that can modulate the functions of proteins. When illuminated at specific wavelengths, these photochromic modules switch between active and inactive states and change functions of receptors, ion channels and enzymes. This review briefly describes compounds that modulate the functions of ionotropic Cys-loop receptors for acetylcholine, GABA, and glycine. The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is the first receptor-operated channel for which a way of modulation using light-dependent molecules has been discovered. In the 1970s–80s, blockers and activators of nAChR were created, consisting of azobenzene (light-controlled switch) and agonists. In the current millennium, new compounds have been created to provide light-controlled modulation of nAChR activity. These new photochromes are selective to muscle and neuronal nAChR, and are promising to study the physiological role of nAChRs in the nervous system. An extensive library of photochromic compounds is available for light-controlling of GABA receptor function. Some of them modulate the activity via interaction with the agonist site, the others are light-regulated blockers of chloride-selective ion channels. Recently, the first two photochromic modulators of glycine receptor activity have also been developed. These achievements demonstrate that photopharmacology opens up unique possibilities for remote control of physiological functions, as well as for studying the processes of inhibition and excitation in neural networks and models of neuronal pathologies.

Keywords: Photopharmacology, light-controlled molecular switches, nicotinic acetylcholine receptors, GABA receptors, glycine receptors, synaptic transmission РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 458-473

= обзоры ===

ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СОЕДИНЕНИИ

© 2021 г. Э. А. Бухараева^{1, *}, А. И. Скоринкин¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр РАН", Казань, Россия *E-mail: elbukhara@gmail.com

> Поступила в редакцию 18.01.2021 г. После доработки 29.01.2021 г. Принята к публикации 29.01.2021 г.

Влияние холинергических соединений (активаторов и блокаторов никотиновых холинорецепторов) на секрецию ацетилхолина из двигательных нервных окончаний представляет интерес в связи с вопросом о наличии механизма обратной связи в нервно-мышечном синапсе. Предполагается, что на нервных окончаниях могут быть ауторецепторы к ацетилхолину, изменение активности которых влияет на выделение медиатора в ответ на нервный стимул. Однако многочисленные экспериментальные данные не дают однозначного представления о направленности и механизмах действия как эндогенного ацетилхолина, так и других холинергических соединений на вызванную квантовую секрецию медиатора в нервномышечном синапсе. Актуальность таких исследований обусловлена необходимостью расшифровки эффектов этих соединений, так как многие из них применяются в клинической практике. Обзор посвящен анализу результатов исследований, проведенных на классических для нейрофизиологии объектах – нервно-мышечных препаратах теплокровных животных с помощью радиоизотопного метода оценки количества секретируемого из нервных окончаний медиатора и электрофизиологического метода определения числа квантов, выделяющихся в ответ на нервный стимул. Сопоставлены многочисленные данные, полученные при использовании активаторов и блокаторов ионотропных никотиновых рецепторов, а также вероятные механизмы действия холинергических соединений, модулирующих секреторный процесс. Предложена схема регуляции квантовой секреции, учитывающая новые сведения о возможном участии Шванновской клетки и о пресинаптической гомеостатической пластичности.

Ключевые слова: нервно-мышечное соединение, секреция ацетилхолина, никотиновый ионотропный холинорецептор, агонисты и антагонисты никотиновых холинорецепторов

DOI: 10.31857/S0869813921040063

Вопрос о влиянии ацетилхолина (АХ), основного медиатора нервно-мышечного синапса, на процесс собственного освобождения продолжает интересовать нейрофизиологов. Он затрагивает не только фундаментальные аспекты ауторегуляции секреторного процесса, но и важные особенности клинического применения миорелаксантов разного типа действия. В отечественной нейрофизиологии значимый вклад в изучение пресинаптического действия холинергических соединений и их эффектов на процессы секреции в периферических синапсах внесли исследования академика РАН Л.Г. Магазаника [1–3] и его ученика и последователя академика РАН Е.Е. Никольского [4, 5]. В нервно-мышечном соединении скелетной мускулатуры ведущую роль в обеспечении сократительной функции мышечного волокна играют ионотропные ацетилхолиновые рецепторы (АХР) никотинового типа. Несмотря на достаточно длительную историю исследований влияния активаторов и блокаторов АХР на процессы секреции АХ и немалое количество обзорных публикаций, до сих пор нет однозначного мнения о свойствах пресинаптических ионотропных АХР на двигательных нервных окончаниях; о том, какое действие они оказывают на процесс секреции АХ – облегчающее или тормозное; о механизмах, участвующих в реализации влияния агонистов и антагонистов АХР; о физиологической роли пресинаптических АХР. В связи с этим целью данного обзора является анализ сведений о влиянии холинергических соединений, активных в отношении никотиновых ионотропных АХР в синапсах теплокровных. Эти ограничения обусловлены тем, что в нервно-мышечном синапсе присутствуют также и мускариновые метаботропные АХР [6], вносящие вклад в модуляцию работы синапса, а регуляторные процессы в холинергических синапсах других видов животных (лягушки, змеи, жабы) имеют свои специфические особенности [7, 8].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА ИЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ

Для изучения эффектов активаторов и блокаторов никотиновых АХР на процесс выделения АХ из нервных окончаний применяются, в основном, два метода: радиоизотопный анализ количества выделившегося при стимуляции двигательного нерва меченого [³H]АХ [9, 10] и электрофизиологический метод определения количества освободившихся в ответ на нервный стимул квантов АХ [11].

При использовании достаточно чувствительного радиоактивного метода нервно-мышечный препарат предварительно инкубируется меченным [³H] холином при стимуляции двигательного нерва. После инкубации в ответ на нервный стимул освобождается вновь синтезированный [³H]АХ. Оценивается соотношение количества [³H]АХ при стимуляции до введения исследуемого холинергического соединения и после его аппликации. Особенностью этого метода является то, что его можно использовать без применения других веществ, способных модифицировать синаптические процессы, таких как ингибиторы ацетилхолинэстеразы или блокаторы мышечных сокращений. Хотя и считается, что меченый [³H]АХ, выделяется только из нервной терминали при стимуляции нерва, нельзя полностью исключить его освобождение в неквантовой форме, а может быть и из других источников (мышечное волокно, Шванновская клетка).

Анализ количества освободившихся квантов АХ в ответ на нервный стимул (квантовый состав синаптического ответа) осуществляется при микроэлектродной регистрации потенциалов или токов концевой пластинки — участка постсинаптической мембраны мышечного волокна. Квантовый состав чаще всего определяется путем деления амплитуды вызванного нервным стимулом постсинаптического потенциала или тока на амплитуду миниатюрного потенциала или тока концевой пластинки. Ограничением этого метода является необходимость блокировать сокращения мышечного волокна в ответ на развитие потенциала действия. Все применяемые для этого способы: поперечное рассечение мышечных волокон, обработка нервно-мышечного препарата глицерином, супрамаксимальное растяжение мышцы — могут оказывать собственное влияние на работу нейросекреторного аппарата. В последние годы для блокады мышечных сокращений стали использовать µ-GIIIB конотоксин, который избирательно блокирует потенциал-зависимые натриевые каналы мембраны мышечного волокна и таким образом предотвращает его сокращение [12]. Однако сравнительно небольшое число исследований эффектов холинергических соединений в нервно-мышечных синапсах проведено с использованием этого метода.

ЭФФЕКТЫ АКТИВАТОРОВ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА

С помощью радиоизотопного метода определения эффектов агонистов никотиновых рецепторов на выделение меченого АХ в нервно-мышечном препарате крысы или мыши получено относительно немного данных. В качестве агонистов АХР использовали никотин, цитизин, диметилфенилпиперазин (ДФПП), холин, 2-(4-аминофенил)-этил-триметиламмонийиодид. Под действием всех исследованных активаторов никотиновых рецепторов наблюдалось увеличение количества освобожденного меченого [³H]АХ. ДФПП в диапазоне концентраций 1-30 мкМ повышал выделение [³H]АХ на 76–92%, и этот эффект устранялся при действии блокатора никотиновых АХР тубокурарина [13, 14]. Однако в присутствии блокатора ацетилхолинэстеразы неостигмина ДФПП существенно не влиял на вызванное высвобождение [³H]AX [14]. Степень эффективности облегчающего действия агонистов на секрецию уменьшалась в следующем порядке: никотин > цитизин > > ДФМП > 2-(4-аминофенил)-этил-триметиламмонийиодид [14]. При этом пресинаптические эффекты никотина сильно зависели от времени воздействия: облегчение выявлялось после короткой 20-секундной аппликации, а уже после 3 мин действия наблюдалось снижение секреции АХ [15]. На основании полученных данных были сделаны выводы о том, что двигательные нервные окончания наделены пресинаптическими никотиновыми рецепторами. Эти ауторецепторы обеспечивают механизм положительной обратной связи, который может быть запущен ранее высвобожденным эндогенным АХ. Снижение секреции после длительной экспозиции агониста может быть связано с десенситизацией рецепторов высокими концентрациями агонистов (эндогенных или экзогенных). Вероятно, это один из механизмов, ограничивающих процесс фасилитации секреции. Было высказано предположение, что пресинаптические рецепторы, по-видимому, отличаются по своим фармакологическим свойствам от постсинаптических рецепторов [16].

Электрофизиологический анализ для определения количества квантов АХ, выделившихся в ответ на нервный стимул (квантовый состав) применялся чаще всего на нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы мыши или крысы. Использование ингибиторов ацетилхолинэстеразы эзерина и неостигмина для увеличения амплитуды регистрируемых постсинаптических сигналов — вызванных стимулом потенциалов концевой пластинки и спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки — приводило к снижению высвобождения АХ [17].

Цитизин при низкой (0.5 Гц) частоте стимуляции двигательного нерва диафрагмальной мышцы крысы вызывал кальций-зависимое снижение квантового состава постсинаптического ответа на 20% [18, 19]. Этот эффект наблюдался при концентрации ионов кальция 1.8 мМ, а при понижении или повышении содержания ионов кальция отсутствовал. Повышение частоты стимуляции нерва до 50 Гц приводило к устранению эффекта цитизина на количество освобождаемых квантов АХ. Эти наблюдения позволили авторам предположить, что цитизин активирует пресинаптические никотиновые ауторецепторы по механизму отрицательной обратной связи.

ДФПП в диапазоне концентраций от 1 до 4 мкМ не влиял на спонтанное квантовое высвобождение АХ, но увеличивал количество квантов АХ в ответ на нервный импульс во время стимуляции с частотой 50 Гц [20]. Индуцированное ДФПП увеличение вызванного освобождения АХ зависело от частоты стимуляции, отсутствовало при низкой частоте (0.5 Гц) и не зависело от содержания ионов кальция. Облегчение вызванной секреции АХ при 50 Гц устранялось антагонистом кальмодулина W7 (N-(6-аминогексил)-5-хлор-1-нафталинсульфонамида гидрохлорид). Был сделан вывод, что ДФПП вызывает изменения вызванного освобождения АХ из двигательных нервных окончаний крысы, которые согласуются с существованием пресинаптических стимулирующих никотиновых рецепторов. Полученные данные также указывают на роль кальмодулин-зависимых систем в стимулирующем секрецию эффекте [20].

В исследованиях Балезиной и ее учеников [21] на нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши показано, что никотин в низкой концентрации (10 нМ) не влиял на освобождение квантов АХ в ответ на первые стимулы в пачке, но вызывал небольшое подавление секреции при ритмической стимуляции. Экзогенный холин также оказывал пресинаптическое ингибирующее действие на квантовый состав потенциалов концевой пластинки, вызванных одиночными и ритмическими стимулами. Данный эффект подавлялся антагонистами АХР, такими как метилликаконитин и α-кобратоксин [22], это позволило высказать предположение о том, что ингибирующее действие опосредуется активацией пресинаптических АХР нейронального типа.

Анализ результатов исследований действия агонистов никотиновых АХР показывает, что они могут вызывать как облегчающее, так и ингибирующее влияние на процесс выделения АХ. Это приводит к формированию представления о том, что, вероятно, могут существовать разные системы, активация которых никотиновыми агонистами, в том числе и эндогенным АХ, реализует положительную и отрицательную обратную связь в нервно-мышечном синапсе. Однако необходимо отметить, что если при определении количества выделившегося меченого [³H]АХ чаще наблюдалось начальное повышение уровня секреции под действием агонистов, то при анализе количества квантов АХ более выраженным было угнетение секреции медиатора при повышенной частоте стимуляции двигательного нерва.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ОСВОБОЖДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА

При изучении вопроса о существовании пресинаптических никотиновых АХР в нервно-мышечном синапсе, существенно больше исследований было проведено при использовании блокаторов этих рецепторов. Это вполне объяснимо, т.к. такие соединения, недеполяризующие и деполяризующие миорелаксанты, препятствующие возникновению мышечных сокращений, широко применяются в клинической практике. Ранее описанные два метода использовались для выяснения эффектов антагонистов никотиновых АХР на классических нервно-мышечных препаратах мышей и крыс.

Радиоизотопным методом было показано, что блокатор ганглионарных никотиновых рецепторов гексаметоний (0.001–1 мМ) и блокатор мышечных никотиновых АХР тубокурарин (1–10 мкМ) снижали на 52–60% освобождение [³H]АХ при стимуляции двигательного нерва с частотой 5 Гц [23]. Однако в присутствии ингибитора ацетилхолинэстеразы неостигмина (10 мкМ) тубокурарин существенно не влиял на вызванное освобождение [³H]АХ [13]. Были проверены эффекты нейротоксинов змеиного яда, блокирующих никотиновые АХР [23]. α -бунгаротоксин, α -кобратоксин и эрабутоксин- β подавляли вызванные нервным импульсом сокращения диафрагмы, но не изменяли интенсивность освобождения АХ. Эти данные позволили авторам сделать вывод, что пресинаптические никотиновые АХР отличаются от никотиновых рецепторов, локализованных на мышечной мембране и в вегетативных ганглиях, поскольку α -нейротоксины и к-бунгаротоксин, устраняя мышечные сокращения, не блокировали пресинаптические никотиновые АХР двигательных нервов. Эффективность антагонистов АХР по уменьшению вызванной секреции [³H]АХ (при кратковременной высокочастотной стимуляции нерва) снижалась в ряду: µ-конотоксин MII > дигидро- β -эритроидин > гексаметоний > d-тубокурарин > панкуроний = пипекуроний > мекамиламин [24–26]. Необходимо отметить, что большинство исследований, где показано ингибирующее действие антагонистов никотиновых АХР на секрецию [³H]АХ, проводилось при высокочастотной стимуляции двигательного нерва от 5 до 50 Гц [27, 28], тогда как при низких частотах (менее 5 Гц) и в состоянии покоя такое влияние отсутствовало.

Деполяризующий миорелаксант сукцинилхолин, в отличие недеполяризующих холинолитиков, в низкой концентрации вызывал, напротив, усиление вызванного освобождения [³H]АХ. Однако в более высокой концентрации он также, как и тубокурарин, подавлял секрецию [29].

Данные, полученные при анализе эффектов антагонистов АХР на вызванную секрецию меченого [³H]АХ, указывают на то, что освобождаемый в синаптическую щель АХ при высокочастотной стимуляции нерва может достигать концентрации, достаточной для того, чтобы влиять на собственное выделение за счет действия на пресинаптические рецепторы. Увеличение высвобождения [³H]АХ при ингибировании ацетилхолинэстеразы сульфатом физостигмина, которое устранялось при действии тубокурарина, панкурония и пипекурония подтверждает это заключение. Снижение выделения [³H]АХ при действии антагонистов, специфически взаимодействующих с рецепторами, содержащими $\alpha 2\beta 3$ субъединицы, свойственные нейрональным никотиновым рецепторам, указывает на их вероятное существование на нервных терминалях в синапсах скелетных мышц [26].

Много сведений о действии антагонистов никотиновых АХР в нервно-мышечных синапсах теплокровных животных было получено при использовании электрофизиологического метода анализа синаптической передачи. Мы не рассматриваем здесь данные о сопоставлении изменений силы сокращения мышечных волокон и амплитудных параметров постсинаптического ответа в ходе пачки ритмических стимулов под действием антагонистов. Эти многочисленные сведения требуют отдельного анализа, поскольку затрагивают не только влияние блокаторов на секрецию медиатора, но и постсинаптические механизмы, участвующие в реализации мышечных сокращений.

При физиологической внеклеточной концентрации ионов кальция (2 мМ) тубокурарин вызывал снижение квантового состава тока концевой пластинки на 30% при высоких частотах стимуляции двигательного нерва (50–150 Гц), которое не зависело от содержания ионов кальция. Напротив, при низких частотах стимуляции (0.5-1.0 Гц) антагонист увеличивал квантовый состав постсинаптического ответа примерно на 20%, и этот эффект устранялся при снижении концентрации ионов кальция [30]. Довольно большое число работ представило аналогичные данные об увеличении квантового состава под действием тубокурарина [19, 31-33]. Анализ показал, что изменения квантового состава под действием антагониста были вызваны влиянием на пул везикул, доступный для немедленного освобождения. Гексаметоний и метилликаконитин также при низких частотах стимуляции (0.5–2 Гц) увеличивали квантовый состав потенциалов концевой пластинки на 30–40%, а при высоких частотах (50-150 Гц) не оказывали никакого влияния. При этом эффект гексаметония наблюдался только при нормальной физиологической концентрации ионов кальция (2 мМ) и отсутствовал при ее снижении [34]. Аналогичный эффект увеличения секреции АХ наблюдался под действием гексаметония для первых нескольких стимулов, но не сохранялся во время серии последующих стимулов [35]. Было сделано предположение о том, что гексаметоний и метилликаконитин увеличивают вызванное освобождение АХ за счет блокирования никотиновых пресинаптических AXP, которые относятся к нейрональному типу и реализуют отрицательную обратную связь. Однако исследования, проведенные в условиях сниженной интенсивности вызванной секреции квантов AX (при повышении содержания ионов магния в среде), показали, что тубокурарин и гексаметоний подавляют выделение нейромедиатора, предположительно, без участия рецепторных механизмов [36]. Интересно, что α-бунгаротоксин, который считается антагонистом никотиновых AXP преимущественно мышечного типа, также вызывал кратковременное повышение квантового состава первых постсинаптических ответов на высокочастотную стимуляцию нерва [37].

На основании полученных электрофизиологическими методами данных были сделаны выводы о том, что в нервно-мышечном соединении скелетных мышц млекопитающих существуют системы, посредством которых АХ может воздействовать на пресинаптические ауторецепторы либо усиливая, либо подавляя собственное вызванное освобождение [30, 38]. Действие антагонистов приводит к кальций-независимому снижению квантовой секреции АХ при высоких частотах стимуляции двигательного нерва и к кальций-зависимому увеличению освобождения при низкочастотной стимуляции. Таким образом, по аналогии с результатами, полученными при исследовании эффектов агонистов никотиновых АХР, данные о влиянии блокаторов показали наличие двух противоположно направленных эффектов на квантовую секрецию АХ из двигательных нервных окончаний. Эти результаты дали основания предполагать наличие, как минимум, двух систем, контролирующих квантовую секрецию АХ [30, 39]. Одна реализует отрицательную обратную связь, снижая выброс медиатора при ее активации и повышая при блокировании [32, 33, 35], другая, напротив, облегчает освобождение АХ в условиях активации эндогенным АХ или агонистами. Следовательно, блокируя эти рецепторы, антагонисты должны уменьшать секрецию АХ [15, 27, 40]. Таким образом, возникла гипотеза о том, что на двигательных нервных окончаниях существуют два разных типа никотиновых ауторецепторов для АХ. Один тип реализует механизм положительной обратной связи, повышающий уровень секреции, и отрицательной, которая ограничивает избыточное выделение медиатора [32, 33, 35].

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАЛИЧИЯ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ

Несмотря на множество экспериментальных данных об изменении секреции АХ под действием экзогенных агонистов и антагонистов никотиновых АХР. существование самой белковой молекулы рецептора на пресинаптической мембране двигательных нервных окончаний долгое время было предметом дискуссий. Jones и Salpeter [41] пытались выявить никотиновые АХР на двигательных нервных окончаниях в препаратах диафрагмы мыши с помощью электронной микроскопии и меченого [125]] α-бунгаротоксина после отделения терминалей от мышцы с помощью коллагеназы и протеазы. Анализ локализации радиоактивной метки показал, что α-бунгаротоксин не связывался с мембраной нервного окончания. На этом основании был сделан вывод об отсутствии никотиновых АХР на пресинаптической мембране. Действительно, из-за тесного контакта нервной терминали и постсинаптической мембраны, а также прилегающей к синапсу Шванновской клетки довольно трудно физически установить наличие пресинаптических АХР. Наличие субъединиц нейронального никотинового АХР было исследовано в криостатных срезах диафрагмы мыши методом непрямой иммунофлуоресценции [42]. Специфическое мечение моноклональными антителами (mAb) к β 2- и α 8-субъединицам нейронального АХР наблюдалось в области нервно-мышечного контакта, определяемого путем мечения флуоресцентным красителем конъюгированным с α-бунгаротоксином. На двигательном нерве, включая нервные окончания, была обнаружена иммунореактивность mAb к субъединице α 3 нейронального AXP. Эти результаты подтвердили, что подтипы постсинаптических никотиновых AXP, распознаваемых антителом antit2 и/или mAb против α 8, и пресинаптического AXP, распознаваемого mAb против α 3, присутствуют в нервно-мышечном соединении в дополнение к классическим мышечным никотиновым AXP. На основании пресинаптических эффектов холина, имеющего более высокое сродство к нейрональным AXP, высказывалось предположение о существовании на моторных нервных окончаниях нейрональных AXP, содержащих α 7 субъединицу [22]. Однако иммуногистохимический анализ с использованием специфической метки для α 7 AXP не выявил ее связывания с пресинаптической мембраной нервного окончания в синапсах мыши, а показал их наличие на рядом расположенной Шванновской клетке [43].

Пресинаптический никотиновый АХР на двигательных нервных окончаниях в настоящее время идентифицируется как нейрональный, содержащий $\alpha 3\beta 2$ субъединицы, который не ингибируется α -бунгаротоксином и предпочтительнее взаимодействует с недеполяризующими миорелаксантами и гексаметонием [42, 44]. Это заключение подтверждается данными о влиянии подтип-специфических агонистов на вызванную секрецию квантов АХ [26], а также способностью недеполяризующих миорелаксантов связываться с рецепторами $\alpha 3\beta 2$ типа, экспрессируемыми в ооцитах *Xenopus laevis*, которым вводили информационную PHK, кодирующую эти рецепторные субъединицы [45].

МЕХАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА

Проведенный анализ результатов исследований влияния агонистов и антагонистов никотиновых AXP на освобождение AX из двигательных нервных окончаний в нервно-мышечных синапсах крысы и мыши показал, что холинергические соединения оказывают как облегчающее, так и угнетающее действие на секрецию медиатора, выраженность которого зависит от функционального состояния синапса (интенсивность ритмической активности, исходный уровень секреции).

Имеющиеся данные позволяют считать, что на окончаниях аксона, иннервирующих скелетную мышцу, имеются никотиновые рецепторы, субъединичный состав и свойства которых отличаются от таковых для никотиновых рецепторов постсинаптической мембраны мышечного волокна [26, 44, 46]. Однако остаются спорными заключения о роли ауторецепторов: служат ли они для ограничения секреции, формируя отрицательную обратную связь [31, 32], или усиливают освобождение по механизму положительной обратной связи [13, 47]. Кроме того, возникает вопрос: благодаря каким механизмам происходит изменение интенсивности секреторного процесса при активации пресинаптических АХР. Неоднозначность феноменологических данных приводит также к разнообразию моделей, пытающихся объяснить наблюдаемые эффекты.

Облегчающее действие агонистов на секрецию, т.е. положительную обратную связь, реализуемую пресинаптическими никотиновыми AXP связывают:

1) с повышением концентрации ионов калия в синаптической щели вследствие деполяризации концевой пластинки при активации агонистами постсинаптических АХР [48]. Однако это предположение было опровергнуто, поскольку при изменении внеклеточной концентрации ионов калия с 2.0 на 7.5 мМ не наблюдалось значимого изменения квантового состава постсинаптического ответа;

 с повышением входа ионов кальция в аксоплазму. Считается, что нейрональные никотиновые рецепторы имеют более высокую относительную проницаемость для ионов кальция по сравнению с их аналогами мышечного типа [49]. Активация агонистом рецепторов, содержащих α3 субъединицу, приводит к возрастанию внутриклеточной концентрации кальция [50]. Кратковременный приток кальция через рецепторно-канальный комплекс может активировать внутриклеточные ферментные системы (например, протеинкиназу C, Ca²⁺-кальмодулин-зависимую киназу II), способствуя экзоцитозу за счет быстрого увеличения пула везикул, готового к освобождению [20].

В настоящее время прямых доказательств участия Ca²⁺-кальмодулин-зависимой киназы II (CaMKII) в облегчении секреции AX недостаточно. Однако показано, что активация холинорецепторов потенциирует синаптическую передачу в нейрональной сети за счет повышения активности CaMKII [51]. К тому же, на нервномышечном синапсе лягушки было показано, что CaMKII играет важную роль в обеспечении краткосрочной синаптической пластичности, вероятно, влияя на скорость мобилизации синаптических везикул [52]. Было также показано, что в ответ на действие агонистов может происходить повышение внутриклеточного кальция за счет его выхода из клеточных депо [53]. Нельзя исключить, что кальций, входящий в аксоплазму при активации нейрональных AXP эндогенным AX, может участвовать в регуляции низкопороговых кальциевых каналов L-типа. Активация этих каналов приводит к повышению уровня секреции при участии рианодиновых рецепторов [54];

3) с деполяризацией нервных окончаний входом ионов натрия, основываясь на данных о том, что на нервных окончаниях выявлены АХР α3β2 субъединичного состава, которые обеспечивают приток ионов натрия и, как следствие, увеличивается внутриклеточное содержание ионов кальция за счет активации потенциал-зависимых кальциевых каналов [53].

Представляется наиболее вероятным, что облегчающее секрецию АХ действие агонистов и эндогенного АХ может реализовываться благодаря мобилизации синаптических везикул и ускорению экзоцитоза вследствие повышения внутриклеточного кальция [39, 54]. Этот процесс может происходить как за счет усиления его входа из внеклеточной среды, так и при усилении выброса из внутриклеточных депо.

Более сложная ситуация складывается с гипотезами, объясняющими механизм отрицательной обратной связи или аутоингибирования, обеспечивающего снижение секреции АХ при действии эндогенного АХ и агонистов, а также ее повышение под влиянием антагонистов. Как было описано ранее, часть исследований показывает снижение секреции АХ под действием агонистов, причем даже после начального повышения с течением времени появляется падение уровня освободившегося медиатора. Другие демонстрируют кальций-зависимое повышение квантового состава под действием тубокурарина и блокаторов никотиновых рецепторов нейронального типа при низкочастотной стимуляции нерва.

Аутоингибирование, наблюдаемое преимущественно при низких частотах активации, зависит от концентрации внеклеточных ионов кальция и считается опосредованным никотиновым АХР нейронального подтипа [30, 34].

Одним из возможных механизмов реализации снижения секреции АХ под действием агонистов и/или эндогенного АХ предполагается изменение активности кальциевых и кальций-активируемых калиевых каналов. Блокатор кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости апамин и блокатор рианодиновых рецепторов снимали угнетающее секрецию АХ действие холина [22]. Был сделан вывод, что активация холином рецепторно-канального комплекса нейронального типа, включающего α7 субъединицу и обладающего относительно высокой способностью пропускать ионы кальция, запускают выброс кальция из рианодинчувствительных депо, что, в свою очередь, приводит к активации кальций-зависимых калиевых каналов. По-видимому, последующий выход ионов калия из аксоплазмы вызывает усиление следовой гиперполяризации терминали и снижение эффективности потенциала действия. Однако доказательств такого развития событий пока нет. В работах группы Балезиной на основании наблюдений о том, что блокирование CaMKII устраняло угнетающее секрецию действие холина, был сделан вывод о том, что помимо кальций-зависимых калиевых каналов в реализации ингибирующего действия агониста может участвовать CaMKII [55, 56]. Таким образом, холинергическая модуляция секреции – аутоингибирование, опосредованное α 7 AXP так же, как и аутофасилитация через активацию α 3 β 2 AXP, могут быть связаны с изменением внутриклеточного кальциевого метаболизма при участии кальций-зависимых каналов и депонированного кальция [57].

Активация нейрональных АХР может опосредовать три типа цитоплазматических сигналов кальция: (1) прямой приток кальция через сами рецепторы; (2) непрямой приток кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы, которые активируются АХР-опосредованной деполяризацией; 3) кальций-индуцированное высвобождение кальция (CICR) (запускаемое первыми двумя источниками) из эндоплазматического ретикулума через рецепторы рианодина и рецепторы инозитол (1,4,5)-трифосфата, а также повышение активности фосфолипазы С [58, 59]. Все эти процессы могут быть включены в модуляцию синаптического процесса.

Ргіог и соавт. [19, 38] считают, что существуют два отдельных механизма, обеспечивающих аутофасилитацию и аутоингибирование секреции АХ в нервно-мышечном синапсе. По их мнению, аутофасилитация подтверждается данными о кальмодулин-зависимом возрастании вызванной секреции АХ под влиянием агониста ДФПП и ее угнетении при действии антагонистов тубокурарина и веркурония при высокой частоте стимуляции двигательного нерва [20]. Аутоингибирование происходит при активации АХР агонистом цитизином, а блокирование рецепторов тубокурарином и гексаметонием повышает секрецию при низкой частоте стимуляции. Оба эффекта не зависят от активности кальмодулиновой системы, но устраняются блокатором кальциевых каналов верапамилом [19], поскольку на нервных окончаниях зарегистрированы верапамил-чувствительные кальциевые токи [60]. Тем не менее, события, последующие за активацией верапамил-чувствительных кальциевых каналов и приводящие к снижению уровня секреции, еще не выявлены.

Обобщая имеющиеся экспериментальные данные и гипотезы о механизмах влияния активаторов и ингибиторов никотиновых AXP на секрецию AX из двигательных нервных окончаний, можно сказать, что существуют два разнонаправленных изменения уровня вызванного освобождения медиатора. Облегчающее действие или аутофасилитация, вероятнее всего, опосредована никотиновыми рецепторами, содержащими $\alpha 3\beta 2$ субъединицы, действующими как кратковременный пресинаптический усилитель для увеличения коэффициента надежности синаптической передачи, если требуется увеличение силы мышечных сокращений [20, 26, 61]. Возможно, использование α -конотоксина LvIA (пептид из яда плотоядного морского брюхоногого моллюска *Conus lividus*), который на сегодняшний день считают наиболее селективным ингибитором никотиновых $\alpha 3\beta 2$ AXP, позволит получить прямые доказательства участия этих рецепторов в аутофасилитации [62]. Аутоингибирование, по-видимому, связанное с активацией рецепторов с $\alpha 7$ субъединицей, необходимо для предотвращения избыточной траты нейромедиатора из пула везикул, готового к немедленному освобождению.

Однако, принимая во внимание ряд исследований, появившихся в последнее пятилетие, необходимо сказать, что могут быть альтернативные механизмы холинергической регуляции секреции АХ в нервно-мышечном синапсе.

На Шванновской клетке иммуногистохимическим методом показано наличие нейрональных АХР, содержащих α7 субъединицу, которые могут контролировать распространение АХ в области синапса [43]. Активация этих рецепторов избытком АХ в условиях ингибирования ацетихолин- и бутирилхолинэстеразы в синаптиче-

ской зоне приводит к освобождению глиотрансмиттера (предположительно гаммааминомасляной кислоты), который оказывает ингибирующее действие на освобождение АХ. Возможные варианты накопления эндогенного АХ – это снижение активности холинэстераз при патологических состояниях (снижение экспрессии самих ферментов, при применении лекарственных ингибиторов). Вместе с тем, получены данные о том, что существуют эндогенные ингибиторы ацетихолинэстеразы, например, оксид азота, интенсивное освобождение которого в синаптическую щель при ритмической стимуляции приводит к снижению активности фермента [63]. С другой стороны, активация никотиновых рецепторов на Шванновской клетке приводит к увеличению кальциевого транзиента и, весьма вероятно, к выходу предполагаемого глиотрансмиттера даже без предварительного ингибирования холинэстеразы [43]. Недавно было показано, что индуцированная ритмической стимуляцией активация α7 АХР на Шванновской клетке управляет спилловером АХ в нервно-мышечном синапсе при высокочастотном режиме работы синапса за счет выделения Шванновской клеткой другого активного соединения — аденозина [64], пресинаптическое действие которого приводит к уменьшение секреции АХ из нервных терминалей [65]. Таким образом, Шванновскую клетку нельзя исключить из вероятных участников процессов, модулирующих синаптическую передачу в определенных условиях (интенсивный выброс медиатора, недостаточность холинэстераз).

Интерес вызывает возникшая относительно недавно гипотеза о пресинаптической гомеостатической пластичности в нервно-мышечном синапсе, которая подразумевает изменение интенсивности секреторного процесса в ответ на снижение постсинаптической активности. Это означает, что блокирование постсинаптических АХР токсинами или миорелаксантами вызывает повышение количества высвобождаемых синаптических везикул, т.е. квантового состава [66]. Механизм, лежащий в основе этой пластичности, неизвестен. Было показано, что токсины, селективно блокирующие никотиновые рецепторы мышечного волокна, содержащие α1 субъединицу, вызывали повышение квантового состава. Влияние антагониста на синапсы мышей, нокаутированных по α7 субъединице АХР, приводило к увеличению квантового состава, аналогичному в синапсах животных дикого типа. Эти данные показали, что блокирование пресинаптических нейрональных рецепторов не вносит вклад в облегчение секреторного процесса. Авторы считают, что помимо инициирования мышечного сокращения, ионотропные никотиновые АХР мышечного волокна могут служить сигнальными молекулами, которые участвуют в синаптической пластичности. По-видимому, доказательства такой неканонической регуляции процесса секреции АХ в нервно-мышечном синапсе ожидают нас в ближайшем будущем.

На основании анализа рассмотренных данных можно предложить гипотетическую схему реализации действия эндогенного AX (а также, вероятно, и экзогенных активаторов AXP) на процесс вызванной секреции квантов AX из двигательных нервных окончаний (рис. 1). Учитывая наблюдения о том, что активация AXP приводит к эффектам разной направленности и результативности, трудно представить, что они реализуются системой с одним "входным" звеном. Мы предполагаем, что облегчающий секрецию эффект может быть опосредован активацией пресинаптических рецепторов нейронального типа, содержащих $\alpha 3\beta 2$ субъединицы. AX, освободившийся в ответ на нервный стимул, активирует эти рецепторы, что приводит к входу ионов кальция в аксоплазму. Повышенная внутриклеточная концентрация кальция может стимулировать кальций-индуцированное освобождение этих ионов из эндоплазматического ретикулума или активировать кальмодулинкиназу. Эти процессы могут облегчать активацию кальций-зависимых белков экзоцитоза и повышать выброс медиатора. Аутоингибирование секреторного процесса можно свя-



Рис. 1. Схема процессов в синаптическом контакте нервно-мышечного препарата. α3β2-AChR – нейрональный никотиновый рецептор на нервном окончании; (α1)2β1εδ-AChR – мышечный никотиновый рецептор на постсинаптической мембране; α7-AChR – нейрональный никотиновый рецептор на Шванновской клетке; EPR – эндоплазматический ретикулум; AChE – ацетилхолинэстераза; BuChE – бутирилхолинэстераза; GlioR – глиотрансмиттер; CaMKII – кальций-кальмодулин-зависимая киназа II. Знак + указывает на стимулирующее действие; знак – указывает на ингибирующее действие, знак ? указывает на неизвестный фактор, выделяющийся из мышечного волокна, участвующий в реализации пресинаптической гомеостатической пластичности.

зать с нейрональными рецепторами с α 7 субъединицей, обнаруженными на Шванновских клетках. Повышение частоты стимуляции, вызывающее возрастание концентрации АХ, особенно при недостаточной активности холинэстераз, позволяет молекулам АХ достичь мембраны Шванновской клетки и активировать α 7 АХР. Это приводит к освобождению глиотрансмиттера (предположительно, гамма-аминомасляной кислоты или аденозина), который, взаимодействуя с собственными рецепторами, уменьшает интенсивность секреции АХ. Согласно гипотезе последних лет о пресинаптической гомеостатической пластичности, из постсинаптической мембраны мышечного волокна при активации АХР мышечного типа, содержащих субъединицы (α 1)2 β 1 ϵ δ, может освобождаться некий, пока неустановленный фактор, способный оказывать влияние на секрецию медиатора из нервных окончаний. Таким образом, по-видимому, именно наличие нескольких "входных" звеньев и многоступенчатость последующих событий является причиной неоднозначности эффектов при действии холинергических соединений на вызванную секрецию квантов АХ в нервно-мышечном синапсе.

Независимо от того, посредством каких механизмов и при участии каких сигнальных систем агонисты и антагонисты модулируют секрецию АХ из двигательных нервных окончаний, важность и физиологическое значение этого влияния трудно переоценить. Многие нервно-мышечные патологии, связанные с синаптическим дефектом и приводящие к развитию мышечной слабости, требуют восстановления функциональной синаптической передачи. Необходимость выявления наиболее эффективных соединений, способных реализовать это требование, будет стимулировать исследователей к изучению процессов, регулирующих пресинаптические функции.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00046). А.И. Скоринкин поддержан средствами госзадания ФИЦ КазНЦ РАН.
КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, сбор основных данных литературы, написание рукописи — Э.А. Бухараева; обсуждение, написание и редактирование текста — А.И. Скоринкин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят к. б. н. В.Ф. Хузахметову и к. б. н. А.Н. Ценцевицкого за обсуждение и ценные рекомендации по тексту рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kamenskaya M.A., Magazanik L.G., Kotova E.R., Samybaldina N.K., Miroshnikov A.I., Apsalon U.R. (1979) Effect of presynaptic neurotoxins from bee and cobra venom on spontaneous mediator secretion from mouse motor-nerve ending. Bull. Exp. Biol. Med. 87(5): 402–405. https://doi.org/10.1007/BF00806665
- 2. *Magazanik L.G., Nikol'ski E.E.* (1979) Pre- and postsynaptic action of a cholinomimetic (subecholine) under a voltage clamp of the postsynaptic membrane. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 249(6): 1488–1491.
- 3. *Magazanik L.G., Potapjeva N.N., Fedorova I.M.* (1998) Modulation of transmitter release from motor nerve endings by muscarinic and adenosine receptors. J. Neurochem. 71: S4.
- 4. Nikolsky E.E., Vyskocil F., Bukharaeva E.A., Samigullin D., Magazanik L.G. (2004) Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction. J. Physiol. 560: 77–88. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065805.4
- Bukharaeva E.A., Samigullin D., Nikolsky E.E., Magazanik L.G. (2007) Modulation of the kinetics of evoked quantal release at mouse neuromuscular junctions by calcium and strontium. J. Neurochem. 100(4): 939–949. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04282.x
- Santafé M.M., Salon I., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomàs J. (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. Eur. J. Neurosci. 17(1): 119–127. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x
- Khaziev E.F., Fatikhov N.F., Samigullin D.V., Barrett G.L., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. (2012) Decreased entry of calcium into motor nerve endings upon activation of presynaptic cholinergic receptors. Dokl. Biol. Sci. 446: 283–285. https://doi.org/10.1134/S0012496612050080
- Connor E.A., Dunaevsky A., Griffiths D.J., Hardwick J.C., Parsons R.L. (1997) Transmitter release differs at snake twitch and tonic endplates during potassium-induced nerve terminal depolarization. J. Neurophysiol. 77(2): 749–760. https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.749
- 9. Foldes F.F., Chaudhry I.A., Kinjo M., Nagashima H. (1989) Inhibition of mobilization of acetylcholine: the weak link in neuromuscular transmission during partial neuromuscular block with d-tubocurarine. Anesthesiology. 71: 218–223.
- Somogyi G.T., Vizi E.S., Chaudhry I.A., Nagashima H., Duncalf D., Foldes F.F., Goldiner P.L. (1987) Modulation of stimulation-evoked release of newly formed acetylcholine from mouse hemidiaphragm preparation. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 336(1): 11–15. https://doi.org/10.1007/BF00177744
- Katz B., Miledi R. (1979) Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 205(1160): 369–378. https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0070
- Li R.A., Ennis I.L., Vélez P., Tomaselli G.F., Marbán E. (2000) Novel structural determinants of mu-conotoxin (GIIIB) block in rat skeletal muscle (mu1) Na⁺channels. J. Biol. Chem. 275(36): 27551–27558.

https://doi.org/10.1074/jbc.M909719199

13. Wessler I., Halank M., Rasbach J., Kitbinger H. (1986) Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feed-back on transmitter release from the rat phrenic nerve. Naunyn-Schmiedebergs

Arch. Pharmacol. 334: 365–372. https://doi.org/10.1007/BF00569371

- Wessler I., Apel C., Garmsen M., Klein A. (1992) Effects of nicotine receptor agonists on acetylcholine release from the isolated motor nerve, small intestine and trachea of rats and guineapigs. Clin. Investig. 70(3–4): 182–189. https://doi.org/10.1007/BF00184649
- 15. Wessler I., Scheuer B., Kilbinger H. (1987) [3H]acetylcholine release from the phrenic nerve is increased by activation or desensitization of nicotine receptors. Eur. J. Pharmacol. 135(1): 85–87.

https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90760-6

- Giniatullin R.A., Magazanik L.G. (1998) Does desensitisation of acetylcholine receptors play a physiological role in the neuromuscular synapse? Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M Sechenova. 84(1–2): 3–14.
- Wilson D.F. (1982) Influence of presynaptic receptors on neuromuscular transmission in rat. Am. J. Physiol. 242(5): 366–372. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1982.242.5.C366
- Prior C., Dempster J., Marshall I.G. (1993) Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. J. Pharmacol. Toxicol. Met. 30: 1–17. https://doi.org/10.1016/1056-8719(93)90002-V
- Prior C., Singh S. (2000) Factors influencing the low-frequency associated nicotinic ACh autoreceptor-mediated depression of ACh release from rat motor nerve terminals. Br. J. Pharmacol. 129(6): 1067–1074.
 - https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442
- 20. *Singh S., Prior C.* (1998) Prejunctional effects of the nicotinic ACh receptor agonist dimethylphenylpiperazinium at the rat neuromuscular junction. J. Physiol. 511: 451–560. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.451bh.x
- Balezina O.P., Fedorin V.V., Gaidukov A.E. (2006) Effect of nicotine on neuromuscular transmission in mouse motor synapses. Bull. Exp. Biol. Med. 142(1): 17–21. https://doi.org/10.1007/s10517-006-0280-32006
- 22. Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Tarasova E.O., Balezina O.P. (2014) The mechanism of choline-mediated inhibition of acetylcholine release in mouse motor synapses. Acta Naturae. 6(4): 110–115. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4273098/pdf/AN20758251-23-110.pdf
- Apel C., Rícný J., Wagner C., Wessler I. (1995) alpha-Bungarotoxin, kappa-bungarotoxin, alpha-cobratoxin and erabutoxin-b do not affect [3H]acetylcholine release from the rat isolated left hemidiaphragm. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 352(6): 646–652. https://doi.org/10.1007/BF00171324
- 24. *Vizi E.S., Chaudhry I.A., Goldiner P.L., Ohta Y., Nagashima H., Foldes F.F.* (1991) The pre- and postjunctional components of the neuromuscular effect of antibiotics. J. Anesth. 5(1): 1–9. https://doi.org/10.1007/s0054010050001
- 25. Vizi E.S., Somogyi G.T., Nagashima H., Duncalf D., Chaudhry I.A., Kobayashi O., Goldiner P.L., Foldes F.F. (1987) Tubocurarine and pancuronium inhibit evoked release of acetylcholine from the mouse hemidiaphragm preparation. Br. J. Anaesth. 59(2): 226–231. https://doi.org/10.1093/bja/59.2.226
- 26. Faria M., Oliveira L., Timoteo M.A., Lobo M.G., Correia-De-Sa P. (2003) Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing alpha 3 beta 2 subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. Synapse. 49: 77–88 https://doi.org/10.1002/syn.10211
- 27. Vizi E.S., Somogyi G.T. (1989) Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic)-and negative (muscarinic)-feedback modulation. Br. J. Pharmacol. 97(1): 65–70. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb11924.x
- Wessler I. (1992) Acetylcholine at motor nerves: storage, release, and presynaptic modulation by autoreceptors and adrenoceptors. Int. Rev. Neurobiol. 34: 283–384. https://doi.org/10.1016/s0074-7742(08)60100-2
- Kimura I., Okazaki M., Uwano T., Kobayashi S., Kimura M. (1991) Succinylcholine-induced acceleration and suppression of electrically evoked acetylcholine release from mouse phrenic nerve-hemidiaphragm muscle preparation. Jpn. J. Pharmacol. 57(3): 397–403. https://doi.org/10.1254/jjp.57.397
- 30. *Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G.* (1994) Nicotinic antagonist-produced frequencydependent changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals. J. Physiol. 476(3): 517–529.

https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020151

- Ferry C.B., Kelly S.S. (1988) The nature of the presynaptic effects of (+)-tubocurarine at the mouse neuromuscular junction. J. Physiol. 403: 425–437. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017257
- 32. *Wilson D.F.* (1982) Influence of presynaptic receptors on neuromuscular transmission in rat. Am. J. Physiol. 242: 366–373. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1982.242.5.C366
- 33. Wilson D.F., Thomsen R.H. (1991) Nicotinic receptors on the rat phrenic nerve: evidence for negative feedback. Neurosci. Lett. 132(2): 163–166. https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90292-2
- Tian L., Prior C., Dempster J., Marshall I.G. (1997) Hexamethonium- and methyllycaconitineinduced changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals. Br. J. Pharmacol. 122(6):1025–1034.
 - https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701481
- 35. Wilson D.F., Thomsen R.H. (1992) Effects of hexamethonium on transmitter release from the rat phrenic nerve. Neurosci. Lett. 143(1–2): 79–82. https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90237-2
- 36. Wilson D.F, West A.E., Lin Y. (1995) Inhibitory action of nicotinic antagonists on transmitter release at the neuromuscular junction of the rat. Neurosci. Lett. 186(1): 29–32. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11274-Z
- Domet M.A., Webb C.E., Wilson D.F. (1995) Impact of alpha-bungarotoxin on transmitter release at the neuromuscular junction of the rat. Neurosci. Lett. 199(1): 49–52. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12013-t
- Prior C., Tian L., Dempster J., Marshall I.G. (1995) Prejunctional actions of muscle relaxants: Synaptic vesicles and transmitter mobilization as sites of action. Gen. Pharmacol. 26: 659–666. https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00246-j
- Bowman W.C., Prior C., Marshall I.G. (1990) Presynaptic Receptors in the Neuromuscular Junction. Ann. N. Y. Acad. Sci. 604: 69–81. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb31983.x
- 40. Bowman W.C., Marshall L.G., Gibb A.G., Harbome A.J. (1988) Feedback control of transmitter release at the neuromuscular junction. Trends Pharmacol. Sci. 9: 16–20.
- Jones W., Salpeter M. (1983) Absence of [1251] alpha-bungarotoxin binding to motor nerve terminals of frog, lizard and mouse muscle. J. Neurosci. 3(2): 326–331. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-02-00326
- Tsuneki H., Kimura I., Dezaki K., Kimura M., Sala C., Fumagalli G. (1995) Immunohistochemical localization of neuronal nicotinic receptor subtypes at the pre- and postjunctional sites in mouse diaphragm muscle. Neurosci. Lett. 196: 13–16. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11824-G
- 43. Petrov K.A., Girard E., Nikitashina A.D., Colasante C., Bernard V., Nurullin L., Leroy J., Samigullin D., Colak O., Nikolsky E., Plaud B., Krejci E. (2014) Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by α7 nicotinic receptors and butyrylcholinesterase. J. Neurosci. 34(36): 11870–11883. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0329-14.2014
- 44. Fagerlund M.J., Eriksson L.I. (2009) Current concepts in neuromuscular transmission. Br. J. Anaesth. 103(1): 108–114. https://doi.org/10.1093/bja/aep150
- 45. Jonsson M., Gurley D., Dabrowski M., Larsson O., Johnson E.C., Eriksson L.I. (2006) Distinct pharmacologic properties of neuromuscular blocking agents on human neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a possible explanation for the train-of-four fade. Anesthesiology. 105(3): 521–533.
 - https://doi.org/10.1097/00000542-200609000-00016
- 46. Wessler I. (1989) Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. Trends Pharmacol. Sci. 10(3): 110–114. https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90208-3
- 47. Vizi E.S., Kiss J., Elenkov I.J. (1991) Presynaptic modulation of cholinergic and noradrenergic neurotransmission: interaction between them. NIPS. 6: 119–123.
- Miledi R., Molenaar P.C, Polak RL (1978) Alpha-Bungarotoxin enhances transmitter "released" at the neuromuscular junction. Nature. 272(5654): 641–643. https://doi.org/10.1038/272641a0
- Kabbani N., Nichols R.A. (2018) Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. Trends Pharmacol. Sci. 39(4): 354–366. https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.002
- 50. *Tsuneki H., Klink R., Léna C., Korn H., Changeux J.P.* (2000) Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. Eur. J.

Neurosci. 12(7): 2475–2485. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00138.x

- Djemil S., Chen X., Zhang Z., Lee I., Rauf M., Pak D., Dzakpasu R. (2020) Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces potentiation and synchronization within in vitro hippocampal networks. J. Neurochem. 153(4): 468–484. https://doi.org/10.1111/jnc.14938
- 52. Mukhamedyarov M., Kochunova J., Yusupova E. (2010) The contribution of calcium/calmodulin-dependent protein-kinase II (CaMKII) to short-term plasticity at the neuro-muscular junction. Brain Res. Bull. 81(6): 613–616. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.12.010
- 53. Kulak J.M., McIntosh J.M., Yoshikami D., Olivera B.M. (2001) Nicotine-evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific presynaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. J. Neurochem. 77(6): 1581–1589. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00357.x
- 54. *Bowman W.C.* (1989) Presynaptic nicotinic autoreceptors. Trends Pharmacol. Sci. 10(4): 136–137. https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90162-4
- 55. Tarasova E.O., Gaydukov A.E., Balezina O.P. (2015) Methods of activation and the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of acetylcholine secretion in the motor synapses of mice. Neurochem. J. 9(2): 101–107. https://doi.org/10.1134/S1819712415020099
- 56. *Gaydukov A.E., Balezina O.P.* (2017) CaMKII Is Involved in the Choline-Induced Downregulation of Acetylcholine Release in Mouse Motor Synapses. Acta Naturae. 9(4): 110–113.
- 57. Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Balezina O.P. (2019) The Participation of Presynaptic Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Inhibition of Acetylcholine Release during Long-Term Activity of Mouse Motor Synapses. Neurochem. J. 13(1): 20–27. https://doi.org/10.1134/S1819712419010082
- Shen J.X., Yakel J.L. (2009) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. Acta Pharmacol. Sin. 30(6):673–680. https://doi.org/10.1038/aps.2009.64
- 59. King J.R., Ullah A., Bak E., Jafri M.S., Kabbani N. (2018) Ionotropic and metabotropic mechanisms of allosteric modulation of α7 nicotinic receptor intracellular calcium. Mol. Pharmacol. 93: 601–61. https://doi.org/10.1124/mol.117.111401
- 60. Penner R., Dreyer F. (1986) Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. Pfugers Arch. 406: 190–197. https://doi.org/10.1007/BF00586682
- 61. Wood S.J., Slater C.R. (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. Prog. Neurobiol. 64(4): 393–429. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00055-1
- Zhangsun D., Zhu X., Wu Y., Hu Y., Kaas Q., Craik D.J., McIntosh J.M., Luo S. (2015). Key residues in the nicotinic acetylcholine receptor β2 subunit contribute to α-conotoxin LvIA binding. J. Biol. Chem. 290(15): 9855–9862. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.632646
- Petrov K.A., Malomouzh A.I., Kovyazina I.V., Krejci E., Nikitashina A.D., Proskurina S.E, Zobov V.V., Nikolsky E.E. (2013) Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via N-methyl-D-aspartate receptor activation. Eur. J. Neurosci. 37(2): 181–189. https://doi.org/10.1111/ejn.12029
- 64. Noronha-Matos J.B., Oliveira L., Peixoto A., Almeida L., Castellão-Santana M.L., Ambiel C.R., Alves-do Prado W., Correia-de-Sá P. (2020) Nicotinic α7 receptor-induced adenosine release from perisynaptic Schwann cells controls acetylcholine spillover from motor endplates. J. Neurochem. 154(3): 263–283. https://doi.org/10.1111/jnc.14975
- 65. Correia-de-Sá P., Sebastião A.M., Ribeiro J.A. (1991) Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. Br. J. Pharmacol. 103: 1614–1620. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb09836.x
- 66. Wang X., McIntosh J.M., Rich M.M. (2018) Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors May Mediate Trans-Synaptic Signaling at the Mouse Neuromuscular Junction. J. Neurosci. 38(7): 1725–1736.

E. A. Bukharaeva^{*a*}, * and A. I. Skorinkin^{*a*}

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia *e-mail: elbukhara@gmail.com

The effect of cholinergic compounds (activators and blockers of nicotinic cholinergic receptors) on the acetylcholine secretion from motor nerve endings is of interest in connection with the questions of the feedback mechanism in the neuromuscular synapse. It is assumed that acetylcholine autoreceptors may exist on the nerve endings. Their activity changes be able affects the release of the transmitter in response to a nerve stimulus. However, numerous of experimental data do not give an unambiguous idea of the direction and mechanisms of action of both endogenous acetylcholine and other cholinergic compounds on the evoked transmitter quantal secretion at the neuromuscular synapse. The relevance of such studies is due to the need to decipher the effects of these compounds, since many of them are used in clinical practice. The review is devoted to analysis of the studies results carried out on classical objects for neurophysiology – neuromuscular preparations of warm-blooded animals using a radioisotope method for assessing the amount of a transmitter secreted from nerve endings and an electrophysiological method for determining the number of quanta released in response to a nervous stimulus. Numerous data obtained using activators and blockers of ionotropic nicotinic receptors, as well as the probable mechanisms of action of cholinergic compounds modulating the secretory process, are compared. A scheme for the regulation of quantum secretion was proposed, taking into account new information about the possible participation of the Schwann cell and about presynaptic homeostatic plasticity.

Keywords: neuromuscular junction, secretion of acetylcholine, nicotinic ionotropic cholinergic receptor, agonists and antagonists of nicotinic cholinergic receptors РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 474-491

= обзоры ==

РОЛЬ НЕЙРО-КАРДИАЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ В СИМПАТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЦА

© 2021 г. Ю. Г. Одношивкина¹, А. М. Петров^{1, 2, *}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия ²Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия *E-mail: fysio@rambler.ru

> Поступила в редакцию 19.01.2021 г. После доработки 02.02.2021 г. Принята к публикации 03.02.2021 г.

Один из важных механизмов сердечной регуляции реализуется через иннервацию кардиомиоцитов нейронами симпатической нервной системы. Симпатические аксоны ветвятся и формируют на своем протяжении расширения (варикозы), содержащие синаптические везикулы с основным нейромедиатором (норадреналином) и ко-нейромедиаторами. Варикозы тесно контактируют с кардиомиоцитами, в результате могут формироваться нейро-кардиальные соединения, имеющие синапс-подобную организацию – специализированные пре- и постсинаптические регионы, разделенные узкой щелью. Эти синаптические образования подвержены пластичности и освобождение нейромедиатора из пресинаптических варикозов плотно регулируется, в том числе, со стороны ауторецепторов. Нейрокардиальная передача имеет быстрые хронотропный и инотропный эффекты, а также управляет трофическими процессами, определяющими размеры кардиомиоцитов и архитектуру сердечной стенки. Разные подтипы постсинаптических адренорецепторов вовлечены в эти кратковременные и долговременные эффекты нейро-кардиальных взаимодействий. Изменения в адренергической нейропередаче в сердце часто сопровождают многие распространенные патологии (сердечная недостаточность, аритмии, гипертония), внося вклад в их развитие. В представленном обзоре мы систематизировали и обобщили экспериментальные данные, свидетельствующие о существовании в сердце синаптической передачи, которая может иметь решающее значение в коммуникации между мозгом и сердцем.

Ключевые слова: адренорецептор, пресинаптический варикоз, кардиомиоцит, норадреналин, сердце, симпатическая нервная система, синапс **DOI:** 10.31857/S0869813921040117

ВВЕДЕНИЕ

Главный путь регуляции мозгом деятельности сердца реализуется через симпатическую и парасимпатическую нервную систему. За счет этой коммуникации контролируется ритм сердца, артериальное давление и трофические процессы. В представленном обзоре мы сосредоточились на симпатической ветви нейро-кардиальных взаимодействий. Рабочий миокард густо иннервируется симпатическими нейронами, изменение активности которых происходит при многих патологических состояниях. В частности, хроническая гиперактивность симпатических нейронов часто наблюдается при аритмиях, гипертензии, сердечной недостаточности и гипертрофии, а острая гиперактивация симпатической нервной системы увеличивает риск возникновения аритмий и внезапной смерти [1, 2]. Учитывая широкую распространенность данных состояний, бета-блокаторы, угнетающие эффекты симпатической нервной системы на сердце, являются одними из самых часто используемых препаратов. С другой стороны, снижение эффективности действия симпатической нервной системы на сердце (за счет уменьшения плотности симпатической иннервации, содержания симпатического нейромедиатора – норадреналина (НА)) может наблюдаться с возрастом [3, 4]. Более того, при болезни Паркинсона общим немоторным симптомом является сердечная дизавтономия, которая проявляется на ранней стадии заболевания и сопряжена с уменьшением симпатической иннервации сердца, а также захвата НА в синаптические везикулы симпатических нервных окончаний [5, 6]. Снижение функциональной активности симпатических нервных окончаний может сопровождаться усилением предсердных аритмий [7]. Низкая экспрессия фермента дофамин-бета-гидроксилазы, приводящая к снижению синтеза НА, симпатической иннервация сердца и захвата НА в синаптические везикулы, встречается при семейных формах дизавтономии, которые вызывают нарушения ритма и сократимости сердца, а также увеличивают риск внезапной смерти [8]. Все это указывает на важное значение коммуникации между симпатическими нервами и кардиомиоцитами в обеспечении жизнедеятельности организма.

СИМПАТИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ СЕРДЦА И ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ВАРИКОЗЫ

Шейно-грудной симпатический звездчатый ганглий, расположенный рядом с T1–T4 сегментами, преимущественно иннервирует сердце. Выходящие из ганглия симпатические аксоны проникают в сердце через эпикард, где ветвятся и проходят через миокард, располагаясь близко к сосудам [9]. Отростки симпатических аксонов имеют характерную морфологию с повторяющимися расширениями (варикозами), содержащими заполненные нейромедиатором синаптические везикулы (размером 30-60 нм). Длина отдельного варикоза ~1-2 мкм и ширина ~0.6 мкм, варикозы обычно сгруппированы, и дистанция между ними составляет несколько микрон, разделенных тонким (0.1–0.2 мкм) отрезком аксона [10, 11]. Почти все кардиомиоциты имеют контакты с несколькими симпатическими варикозами [12, 13]. Судя по иммуногистохимическим данным, симпатические варикозы содержат типичный пресинаптический белковый аппарат. В частности, в них локализуются белки, необходимые для экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, например, синтаксин 1, синапсин 1, SNAP-25, синаптотагмин-1, SV-2 [14-17]. Пресинаптический SNARE белок синтаксин формирует скопления (0.2 мкм²) в мембране варикоза, рядом с которыми распределены синаптические везикулы, это указывает на формирования специализированных сайтов освобождения нейромедиатора – активных зон [10, 16]. Количество докированных везикул в отдельном варикозе может составлять от 40 до 120 [10]. Экзоцитоз этих синаптических везикул запускается за счет входа Ca²⁺ через потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы N-типа в ответ на потенциал действия. Дополнительно Ca²⁺-вызванное освобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы 2 типа вносит вклад в Ca^{2+} -транзиент в симпатическом варикозе [18].

Варикозы симпатической нервной системы содержат синаптические везикулы, заполненные основным нейромедиатором — НА. После освобождения концентрация НА в примыкающем к симпатическую варикозу пространстве быстро уменьшается, что зависит от обратного захвата нейромедиатора Na⁺-зависимым транспортером SLC6A2 в нервные окончания [26]. Мутации в гене *SLC6A2* ассоциируется с сердечной недостаточностью и тахикардией [27]. Мы предполагаем, что по аналогии с нервно-мышечными синапсами в нейро-кардиальных адренергических синапсах, вероятно, существует спонтанная и неквантовая секреция, уровень которой может влиять на установление базального ритма сердца и сократимости. Наличие секреции НА в покое согласуется с наблюдениями о том, что низкие дозы β-блокаторов могут снижать в покое ритм сердца, но не способны устранить тахикардию, вызванную освобождением НА при стимуляции кардиальных симпатических аксонов [15]. Это коррелирует с клиническими данными о том, что пациенты, получающие β-блокаторы, сохраняют частично хронотропный рефлекс, опосредуемый сильной активацией симпатической нервной системы. Следует отметить, что существование неквантовой секреции предполагается для холинергических нервных окончаний в сердце [19] и симпатических варикозов, иннервирующих гладкую мускулатуру [20].

Возможными дополнительными комедиаторами в синаптических везикулах могут быть гистамин и β-никотинамидадениндинуклеотид (β-НАД) [21–23]. Помимо синаптических везикул, в варикозах обнаруживаются гетерогенные по размерам электронно-плотные гранулы (обычно больше чем синаптические везикулы, до 130 нм в диаметре), которые расположены вдали от активной зоны [11]. Эти гранулы заполнены пептидами, в основном – нейропептидом Y, также могут содержать галанин и мозговой нейротрофический фактор. Освобождение пептид-содержащих гранул обычно происходит при высокочастотной активности симпатических нейронов. Пептиды связываются с высокой аффинностью с рецепторами и медленно расшепляются во внеклеточной среде, поэтому они способны диффузно передавать сигнал на соседние клетки или даже действовать системно. Нейропептид У может ингибировать освобождение ацетилхолина (AX) и НА через пресинаптические У2-рецепторы и оказывать синергичный с НА положительный инотропный эффект, действуя через Y1-рецерторы кардиомиоцитов желудочков [1, 24–27]. Однако нейропептид Ү может вызывать отрицательный инотропный эффект в препаратах предсердий и желудочков [28, 29], а также по-разному влиять на сократимость миокарда в зависимости от стадии постнатального онтогенеза [30]. Следовательно, конечный эффект нейропептида У может варьировать в зависимости от условий, в том числе, от возраста [31, 32]. Экспрессия У1- и У2-рецепторов в сердце крыс увеличивалась после рождения, тогда как Y5-рецепторов, наоборот, снижалась [33]. При этом стимуляция Ү5-рецепторов кардиомиоцитов, вероятно, имеет главным образом длительные эффекты, способствуя развитию гипертрофии сердца в ответ на хроническую гиперактивацию симпатической нервной системы [34, 35]. Мозговой нейротрофический фактор через TrkB-рецепторы тонически увеличивает сократимость кардиомиоцитов и скорость их расслабления [36].

В синаптических везикулах и электронно-плотных гранулах содержится также АТФ. После экзоцитоза в синаптической щели АТФ расщепляется до аденозина, способного ограничивать стимулирующие эффекты НА и нейропептида Y на сердце [37]. Сам АТФ через активацию метаботропных (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) и ионотропных (P2X, всех подтипов) пуринорецепторов кардиомиоцитов регулирует многие аспекты деятельности сердца, при этом часто проявляя стимулирующие эффекты [37, 38]. Более того, активация пуринорецепторов может усиливать позитивное инотропное действие стимуляции β -AP [39].

НЕЙРО-КАРДИАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

До недавнего времени полагалось, что сердечные симпатические нервы выделяют НА в интерстиций миокарда, где НА диффундирует, проникая в межклеточные пространства и капилляры. Однако обнаружение с помощью электронной микро-

скопии относительно узкой синаптической щели (меньше 100 нм, и объемом меньше 0.1 мкм³) между симпатическими варикозами и кардиомиоцитами, а также оценка локальной концентрации НА в синаптической щели (около 100 нМ) указывают на формирование нейро-кардиального контакта (рис. 1) по аналогии с классическим нервно-мышечным соединением [13, 15]. При этом размер щели варьирует от менее чем 20 до 100 нм [1], а с рабочими кардиомиоцитами обычно контактируют несколько варикозов от одного или нескольких нейронов [40], что напоминает полинейрональную иннервацию некоторых мышечных волокон [41]. Теоретически, формирование таких тесных нейро-кардиальных контактов позволяет обойти следующие ограничения эффективности "диффузного" освобождения НА: (1) суммарно, рабочие кардиомиоциты имеют на несколько порядков больший объем, чем иннервирующие миокард симпатические варикозы; (2) интенсивный коронарный кровоток способен быстро вымывать НА из интерстиция миокарда; (3) обилие разрушающих катехоловые амины ферментов в сердце, в частности, моноаминоксидаз, активность которых сопровождается продукцией активных форм кислорода [13, 42, 43]. Следовательно, точечная коммуникация через нейрокардиальные соединения, вероятно, позволяет избежать избыточного выделения НА, что может быть токсично для кардиомиоцитов, а также требовать высокую активность ферментов, ответственных за синтез НА в симпатических нейронах. При существовании нейро-кардиальных соединений (рис. 1) только в условиях высокочастотной активности симпатического нейрона, когда способность транспортера повторно захватывать НА превышена, возможна значительная диффузия НА за

пределы синаптической щели ("перелив") и его глобальное действие на кардиомиоциты, в том числе, неиннервированные (в норме если они есть, то они имеют минорное значение [40]).

Основной механизм действия НА в сердце связан со стимуляцией β 1-адренорецепторов (AP). После взаимодействия с агонистом β 1-AP быстро (десятки миллисекунд) активирует Gs-белок, который увеличивает ферментативную активность аденилатциклазы, превращающую ATФ в цАМФ. В результате, в течение нескольких секунд после активации β 1-AP уровень цАМФ увеличивается в объеме цитоплазмы (компартменте), непосредственно прилегающем к плазматической мембране, где локализуются стимулированные β 1-AP. Активация одновременно многих β 1-AP, распределенных по всей поверхности мембраны, ведет к глобальному повышению цАМФ в кардиомиоците. Подробная цепочка событий детально изложена в многочисленных обзорах (например, [44, 45]), и здесь мы остановимся только на некоторых моментах, которые особенно важны для понимания нейрокардиальных взаимодействий.

Функциональные доказательства формирования нейро-кардиальных соединений были получены в экспериментах с ко-культурами (кардиомиоциты и симпатические нейроны). В этих экспериментах с помощью генетического сенсора оценивалась локальная концентрация вторичного посредника цАМФ в кардиомиоцитах. Было показано, что в ответ на освобождение НА из симпатических варикозов увеличение цАМФ наблюдалось только в иннервируемых (постсинаптических) кардиомиоцитах. Причем, в ближних к варикозу регионах кардиомиоцита локальный уровень цАМФ возрастал быстрее и сильнее, чем в дистальных регионах того же кардиомиоцита. Локальная концентрация НА в нейро-кардиальной шели была оценена в ~100 нМ, и экзогенная аппликация эквивалентной концентрации НА вызывала в десять раз более амплитудный ответ (рост цАМФ), вероятно, за счет активации экстрасинаптических рецепторов [15]. Эксперименты *in vivo* с оптогенетической активацией иннервирующих сердце симпатических нейронов [46] показали, что 10-миллисекундная стимуляция светом, вызывающая освобождение НА, достаточна для зависимого от β -АР ускорения сердечного ритма с задержкой только в ~170 мс [15]. Это указывает скорее на синаптическую передачу, нежели на действие НА, диффундирующего из варикозов через интерстициальную жидкость к кардиомиоцитам, хотя это время на порядок больше, чем синаптическая задержка в нервно-мышечных синапсах [47]. Однако стоит учитывать, что в кардиомиоцитах постсинаптический ответ медленный и связан с активаций, главным образом, метаботропных рецепторов, которые модулируют ионные токи.

ПОСТСИНАПТИЧЕСКАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ НЕЙРО-КАРДИАЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ

Относительно специализации постсинаптического региона в нейро-кардиальном соединении известно мало. В процессе развития формирование контакта между пресинаптическим варикозом и кардиомиоцитом требует взаимодействия интегрина $\alpha 4\beta 1$ на пресинаптической стороне и молекулы адгезии VCAM-1 на кардиомиоцитах [48]. В ко-культуре в формировании нейро-кардиального соединения принимают участие кадгерины и β -катенины, формирующие адгезивные комплексы, стабилизирующие синаптический контакт [14]. Схожий механизм работает при образовании и стабилизации нервно-мышечных синапсов [49, 50]. Постсинаптические мембраны должны заякоривать рецепторные и сигнальные молекулы, обеспечивающие ответ на освобождение нейромедиатора. Различные каркасные (рапсин,

478

Рис. 1. Схема нейро-кардиального соединения. Показан симпатический варикоз, контактирующий с кардиомиоцитом. Внутри варикоза синаптические везикулы (SVs) формируют скопления, часть SVs прикреплена к пресинаптической мембране в специализированной области – активной зоне (AZ), где сконцентрированы белки экзоцитоза и потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы N-типа. Дополнительно выход Ca^{2+} через рианодиновые рецепторы (RyRs) из эндоплазматического ретикулума (ER) может усиливать освобождение нейромедиатора. Освобождение норадреналина из SVs может регулироваться со стороны многих пресинаптических рецепторов: активация β1-адренорецепторов (β1-AR), β2-AR, ангиотензиновых AT1-рецепторов (AT1-R), эндотелиновых ETA-рецепторов (ETA-R), пуриновых P2X-рецепторов (P2X-R) – усиливает (+) секрецию норадреналина, тогда как стимуляция α 2-AR, Y2-рецепторов к нейропептиду Y (Y2-R), мускариновых m2-холинорецепторов (m2-AChR), дофаминовых D2-рецепторов (D2-R), гистаминовых H3-рецепторов (H3-R), эндотелиновых ETB-рецепторов (ETB-R), пуриновых P2Y-рецепторов (P2Y-R), аденозиновых A1-рецепторов (A1-R) наоборот, ослабляет (-) секрецию норадреналина. После экзоцитоза норадреналин захватывается обратно в нервное окончание транспортером SLC6A2. В варикозах также присутствуют электронно-плотные гранулы (ED-granules), которые освобождают нейропептиды (в основном нейропептид Y) в ответ на высокочастотную активность. Молекулы адгезии (cadherins, catenin, VCAM1) обеспечивают сцепление пре- и постсинаптических мембран. На постсинаптической мембране кардиомиоцита локализуются в основном β1-ARs, также на периферии в кавеолах (липидных рафтах) экспрессируются β 2-ARs. α 1-ARs, вероятно, расположены преимущественно в экстрасинаптических областях кардиомиоцитов. Также рецепторы к нейропептиду Ү (У1-R, У5-R) и АТФ (Р2У-R, Р2Х-R) могут локализоваться на плазматической мембране в непосредственной близости к синаптическому региону. Каркасные белки (SAP97, AKAP79) формируют сайты для кластеризации β1-AR, Gs-белка, аденилатциклазы (AC), протеинкиназы А (PKA), фосфодиэстеразы (PDE), потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала L типа, на их основе создаются сигнальные комплексы. При активации постсинаптических β-AR образуются локальные пулы цАМФ (сАМР), в зону действия которых попадают специфические комплексы РКА и белка-мишени (L-типа Ca^{2+} -канал, RyR саркоплазматического ретикулума (SR), тропонин и др.). Фосфорилирование последних вызывает реализацию быстрых эффектов активации симпатических нейронов. Тоническая стимуляция постсинаптических β2-AR запускает цепочку событий (в которых принимают участие Gi-белок, фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназа PDK1), ведущую к фосфорилирование киназы Akt. Затем Akt фосфорилирует транскрипционный фактор FOXO, в итоге FOXO теряет способность проникать в ядро и усиливать экспрессию убиквинтинлигаз (MuRF1, MAFbx). Снижение интенсивности убиквинтилирования замедляет распад миокардиальных белков и интенсивность аутофагии, способствуя увеличению размеров иннервируемых кардиомиоцитов. Это медленный трофический эффект нейро-кардиальной передачи.



МАСF1) и цитоскелетные белки, наряду с липидными микродоменами (рафтами) участвуют в заякоривании постсинаптических сигнальных комплексов в нервномышечных синапсах [51, 54]. В нейро-кардиальном соединении обнаруженное формирование локального пула цАМФ в околомембранном пространстве, прилежащем к постсинаптической мембране [15], подразумевает компартментализацию сигнализации через путь β -AP – аденилатциклаза – цАМФ – протеинкиназа A, который активируется НА. При этом барьерами на пути диффузии цАМФ в кардиомиоците могут быть как внутриклеточные органеллы, мембранные инвагинации, так и заякоренные на цитоскелете фосфодиэстеразы, гидролизующие цАМФ [40, 55]. В ко-культуре, в месте контакта симпатического варикоза с мембраной кардиомиоцита, формируются специализированные зоны, где концентрируются каркасные белки SAP97 и AKAP79/150 вместе с β 1- и β 2-AP, а также молекулами адгезии (рис. 1). Рецепторная композиция таких постсинаптических регионов подвержена зависимой от активности пластичности, и кратковременная стимуляция симпатических нервных окончаний вызывает интернализацию избирательно β 2-AP, в результате в постсинаптической зоне остаются преимущественно β 1-AP [14]. В предсердиях β 2-AP также могут концентрироваться в регионах кардиомиоцита, непосредственно окружающих пресинаптический варикоз, где могут ко-локализоваться с белком липидных рафтов — кавеолином 3 и сигнальными молекулами [56, 57]. Причем нарушение целостности липидных рафтов кардиомиоцитов за счет удаления или окисления их основного компонента — холестерина существенно подавляет вызванное активацией β 2-AP увеличение Ca²⁺-транзиента и сократимости [58, 59]. Следует отметить, что часто ассоциированные с липидными рафтами P2X1-рецепторы также могут формировать кластеры поблизости от симпатического варикоза в предсердиях и желудочках [60]. Возможно, обогащенные холестерином микродомены принимают участие наряду с каркасными белками в структурной и (или) функциональной организации постсинаптического региона в кардиомиоцитах, как это предполагается в нервно-мышечных синапсах [54, 61, 62].

Следует отметить, что кардиомиоциты контактируют с несколькими варикозами, которые могут принадлежать разным симпатическим нейронам [40]. Это потенциально создает возможность для формирования разных локальных пулов цАМФ и соответственно фосфорилирования разных белков-мишеней в одном кардиомиоците при активации разных симпатических нейронов. С другой стороны, формирование нескольких микропулов ц $AM\Phi$ в кардиомиоците, взамен глобального повышения ц $AM\Phi$, может быть более энергетически эффективно, поскольку подвергаются фосфорилированию протеинкиназой А только специфичные белки. Локализация АР (особенно β2-полтипа) в отдельных регионах мембраны создает условиях для компартментализации сигнализации. Более того, в кардиомиоцитах β2-АР способны контролировать сигнализацию через основные β1-АР [59, 63, 64]. В частности, сильная стимуляция β2-АР может усиливать рекрутирование цАМФ-гидролизующей фосфодиэстеразы 4 к β1-АР, в результате активация последних ведет только к локальному повышению цАМФ и меньшему увеличению Ca²⁺-транзинета. Подобная ситуация проявляется при стимуляции кардиомиоцитов желудочков одновременно неселективным β-агонистом (изопротеренолом, НА) в присутствии селективного агониста β2-АР (сальбутонола, зинтерола) [63]. Однако нейрональный метаболит холестерина 24-гидроксихолестерин (в нано- и микромолярных концентрациях) способен ослаблять вызванные изопротеренолом и зависимые, в основном, от β 1-AP увеличение силы сокращений и Ca²⁺-транзиента за счет опосредованной β2-АР активации фосфодиэстеразы 4 в предсердиях [64]. Более того, окисление мембранного холестерина способствует зависимому от β2-АР увеличению продукции активных форм кислорода, что значительно угнетает стимулирующие эффекты активации β 1-АР (на сократимость, Ca²⁺ транзиент и продукцию NO) в предсердиях мышей [59].

РЕГУЛЯЦИЯ ОСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРА В НЕЙРО-КАРДИАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ

Регуляция синаптической передачи основывается на контроле пресинаптических процессов, обеспечивающих освобождение нейромедиатора, и постсинаптических процессов рецепции молекул нейромедиатора. В отношении специфики регуляции постсинаптических рецепторов в нейро-кардиальных соединениях известно крайне мало, поэтому мы сосредоточимся на пресинаптических феноменах.

В любом синапсе функционируют петли обратной связи, направленные на оптимизацию секреции нейромедиатора, нейро-кардиальное соединение не исключение. НА, действуя через ауторецепторы (β 1-, β 2- и α 2-AP) на нервных окончаниях, регулирует свое собственное освобождение в сердце (рис. 1). Активация пресинапти-

ческих β1/β2-АР и ангиотензиновых АТ1-рецепторов может увеличивать освобождение НА в симпатических варикозах, тогда как α 2-AP, мускариновых m2 ацетилхолиновых, дофаминовых D2- и гистаминовых H3-рецепторов имеет обратный эффект [2, 21, 65, 66]. Активация эндотелиновых рецепторов ЕТА и ЕТВ на симпатических варикозах в желудочках может усиливать и угнетать освобождение НА соответственно; при этом стимулирующий эффект ЕТА-рецепторов преобладает при экзогенной аппликации эндотелина-1 [67]. Освобождаемый вместе с НА и пептидами АТФ может иметь быстрые эффекты, реализуемые через ионотропные Р2Х- (вероятно, Р2Х2- и Р2Х3-) рецепторы в сердце [37]. В частности, АТФ способен усиливать освобождение НА [68, 69]. Однако АТФ и его производное аденозин способны также тормозить освобождение НА в предсердиях, действуя через пресинаптические Р2У- и А1-аденозиновые рецепторы соответственно [70]. Отдельные субтипы Р2Ү, обеспечивающие контроль освобождения НА в сердце, остаются неизвестными. Другой ко-медиатор в симпатических варикозах – В-НАД может действовать через пуринорецепторы, как $AT\Phi$ и также тормозить освобождение парасимпатического нейромедиатора – AX [22].

При патологических условиях пресинаптические механизмы регуляции освобождения НА могут сильно модифицироваться, внося вклад в развитие заболевания. В ко-культурах, полученных из клеток гипертензивных животных, было показано, что усиленный прирост цАМФ в кардиомиоцитах при гипертензии связан преимущественно с облегчением освобождения НА из симпатических варикозов, а не с большей чувствительностью кардиомиоцитов к НА [71]. Подобное облегчение освобождения НА может определяться гиперактивацией пресинаптических ауторецепторов (β1-АР и особенно β2-АР), усиливающих освобождение НА; также вклад может вносить снижение обратного захвата НА в пресинаптические нервные окончания и увеличение экспрессии потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов N-типа. обеспечивающих основной приток Ca²⁺ в варикоз [2, 72, 73]. Усиление активации пресинаптических ангиотензиновых AT1- рецепторов способно увеличивать освобождение НА при гипертонии, а их делеция в симпатических нейронах снижает гипертензию, вызванную ангиотензином II [74]. Кроме того, АТ1-рецепторы могут формировать гетеродимеры с пресинаптическими ингибиторными α 2-AP, в результате последние теряют способность угнетать освобождение НА; более того, теперь при активации α2-АР запускается атипическая сигнализация, увеличивающая секрецию НА [75]. В том же ключе, формирование комплекса АТ1-рецепторов со стимулирующими пресинаптическими β2-АР усиливает стабильность β2-АР на плазматической мембране и вызванное активацией β2-АР увеличение освобождения НА [76]. Повышенный адреналин в кровотоке тоже может значительно усиливать освобождение НА из симпатических варикозов в сердце, действуя через пресинаптические β-АР. Причем, в отличие от нормы, когда симпатические нейроны звездчатого ганглия выделят преимущественно НА, в условиях предгипертонии симпатические нейроны могут освобождать наряду с НА существенные порции адреналина из синаптических везикул. Это происходит за счет повышения активности в варикозах фермента фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы (PNMT), превращающего НА в адреналин [2, 77]. При ишемии миокарда АТФ, способный разнонаправленно регулировать освобождение НА, преимущественно усиливает его освобождение, действуя через Р2Х-рецепторы [78]. Это может определяться изменением соотношения подтипов пуринорецепторов, в частности, повышением экспрессии Р2Х4-рецепторов [79]. В постишемический период, наоборот, часто наблюдается торможение экзоцитоза НА в сердце, что в значительной степени определяется действием повышенного уровня аденозина на А1-рецепторы [80]. Примечательно, что после инфаркта миокарда симпатические нервы могут подвергаться "трансдифференциации" и начинать освобождать наряду с НА и АХ из синаптических везикул [81]. Освобождение АХ может выступать в роли компенсаторного механизма, ограничивающего проаритмогенное действие НА [82]. Подобная холинергическая трансдифференциация симпатических нервов наблюдается и у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [83]. Эти данные коррелируют с представлениями, что один синапс может использовать два основных нейромедиатора, упакованных в одни и те же или разные популяции синаптических везикул. Подобный двойственный фенотип может ярко проявляться в ходе развития или повреждений [84].

В целом, пресинаптические изменения, опосредующие увеличение освобождения НА, могут вносить вклад в развитие сердечных патологий (например, при сердечной недостаточности и гипертонии), хотя и угнетение освобождения НА также может иметь негативные последствия. Так, снижение способности накапливать и освобождать норадреналин из варикозов у B6CBAF1 мышей сопровождается уменьшением симпатического компонента контроля ритма сердца и усилением проаритмической активности (фибрилляции предсердий), в том числе, в ответ на экзогенное введение НА [7].

ТРОФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕЙРО-КАРДИАЛЬНОЙ КОММУНИКАЦИИ

Общепринято, что нейро-кардиальные взаимодействия имеют важные кратковременные последствия (контролируют хронотропию и инотропию). Однако меньшее внимание уделяется долговременным эффектам симпатической иннервации, которые определяют трофические процессы и ремоделирование миокарда.

В течение эмбрионального развития, выделяемые сердцем нейротрофические факторы контролируют установление симпатической иннервации и выживаемость симпатических нейронов; доступность этих факторов (в основном, нейронального фактора роста – NGF) определяет распределение и созревание симпатических отростков, формирующих контакты с кардиомиоцитами [85]. У мышей с делецией NGF или его рецептора TrkA наблюдается полная потеря постганглионарных симпатических нейронов [86, 87]. В процессе развития кардиомиоцитами выделяются ограниченные количества NGF, и его хватает, чтобы поддержать выживание только части симпатических нейронов [88]. Симпатические нейроны, полученные от человеческих плюрипотентных стволовых клеток, образовывали при ко-культивировании стабильные контакты с кардиальными мышечными клетками, но не со скелетными миотубами. Формирование этих контактов усиливало созревание нейронов [89]. Таким образом, в ходе развития миоциты сердца в значительной степени определяют размер пула симпатических нейронов, иннервирующих сердце, а также размер "сердечной двигательной единицы".

Существуют и обратные влияния симпатических нейронов на трофические процессы в кардиомиоцитах. Было показано, что раннее установление симпатической иннервации важно для перехода кардиомиоцитов из фазы пролиферативного роста в фазу гипертрофического роста [90]. Также была обнаружена положительная корреляция между симпатической иннервацией и размером кардиомиоцитов. Вопервых, в ко-культуре кардиомиоциты, обладающие нейро-кардиальными контактами (иннервированные), имели существенно больший размер, чем неиннервированные кардиомиоциты. Во-вторых, *in vivo* в сердце кардиомиоциты, контактирующие с большим числом пресинаптических варикозов, имеют больший размер, чем те кардиомиоциты, что образуют соединения с меньшим числом симпатических варикозов [40, 91]. Хотя основные AP в кардиомиоцитах желудочков β 1-AP и, затем, по уровню экспрессии следуют α 1В-AP [92], трофический эффект симпатической иннервации на размер кардиомиоцитов зависит от активации β 2-AP (рис. 1). Фармакологическое ингибирование β 2-AP, как и абляция симпатических нейронов вызывает атрофическое ремоделирование кардиомиоцитов, сопровождающееся

усиленной деградацией белков (за счет активации мышце-специфичных ЕЗ-убиквинтинлигаз MAFbx и MuRF1) с последующей активацией аутофаго-лизосомной системы [40, 91]. При этом контроль экспрессии убиквинтинлигаз осуществляется через путь Akt-FOXO. В частности, нейрокардиальная коммуникация приводит к зависимой от β 2-AP активации Akt-киназы, которая фосфорилирует транскрипционный фактор FOXO, в результате последний перестает усиливать экспрессию данных лигаз, что препятствует избыточному протеолизу [13]. β2-АР активируют Akt опосредованно, что требует участия фосфоинозитол-3-киназы и Gi-белка и(или) бета-аррестина [45]. В частности, опосредуемое фосфоинозитид-3-киназой превращение фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатов цитоплазматического слоя мембраны в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфаты создает в мембране площадку (микродомен), необходимую для активации Akt посредством ее фосфорилирования зависимой от фосфоинозитидов киназой PDK1 [93]. Более того, способность β2-AP активировать Akt зависит от холестерина и липидных рафтов [57, 58], что дополнительно указывает на компартментализацию этой сигнализации в определенном регионе кардиомиоцита. В то же время трофический эффект нейро-кардиальных взаимодействий вряд ли связан с влиянием синаптической активности на FOXOопосредуемую транскрипцию в особом "субсинаптическом" ядре, поскольку в кардиомиоцитах обычно имеется 2-3 ядра, расположенных на отдалении от клеточной мембраны. В отличие от этого, в нервно-мышечном синапсе специфические субсинаптические ядра прилежат к постсинаптической мембране, обеспечивая зависимую от синаптической активности экспрессию специфичных генов, продукты которых необходимы для построения синаптического аппарата [94].

Следует отметить, что нейро-кардиальные взаимодействия, сопряженные с β2-AP могут быть вовлечены в ремоделирование сердца при патологиях, сопряженных с изменением экспрессии AP. Так, при сердечной недостаточности различного генеза доля β2-AP может увеличиваться, а β1-AP снижаться [59, 95]. Однако напрямую этот вопрос не исследован. Интересно, что β2-AP в изобилии экспрессируются на сердечных фибробластах и эндотелиальных клетках, однако симпатические нервные окончания не образуют стабильных контактов с этими клетками [13]. Следовательно, симпатические аксоны должны иметь механизмы селективного распознавания кардиомиоцитов и дальнейшего формирования точечного контакта. Даже после повреждения сердца симпатические нервы избирательно прорастают по направлению к кардиомиоцитам. Эта реиннервация важна для регенерации неонатального сердца. Так, симпатическая денервация сердца полностью подавляет регенерацию сердца у неонатальных мышей после удаления верхушки левого желудочка [96].

Кардиомиоциты в сердечной стенке, соединяясь щелевыми контактами, образуют слои, которые накладываются друг на друга. В слоях кардиомиоциты отличаются размером, ориентацией и паттерном экспрессии ионных каналов. Такая организация необходима для обеспечения механических свойств – развития оптимальной силы сокращения при сохранении прочности. Учитывая, что формирование синаптического контакта между симпатическим варикозом и кардиомиоцитом способствует гипертрофии последнего [91], установление нейро-кардиальных контактов может дирижировать формированием архитектуры стенки сердца. Более плотная симпатическая иннервация обнаруживается в эпикардиальных регионах (наружные слои миокарда) по сравнению с субэндокардиальными участками. Это показано как у грызунов, так и у людей [40]. Подобное распределение симпатических волокон положительно коррелирует с размером кардиомиоцитов в этих регионах сердечной стенки, а удаление симпатической иннервации, так же, как и системное хроническое применение агониста бета-АР, подавляет проявление трансмуральной гетерогенности размера кардиомиоцитов [40]. Безусловно, помимо неравномерности симпатической иннервации, нагрузка также влияет на размер кардиомиоцита, поскольку разные слои испытывают отличное активное и пассивное натяжение [97]. Потенциально гетерогенность электрокардиографических характеристик кардиомиоцитов частично может быть связана с неравномерностью симпатической иннервации. Так, гетерогенность симпатической иннервации влияет на динамику локальной реполяризации [98], а аритмии часто сопровождаются альтерациями симпатической иннервации и захвата меченых аналогов катехоловых аминов в отдельных регионах сердца [99].

Следует отметить, что вероятно не только НА, выделяемый из симпатических нервных окончаний, но и комедиаторы и нейропептиды играют роль в трофическом контроле [31, 32]. В частности, нейропептид Y может увеличивать количество белка в культивированных кардиомиоцитах желудочков, уменьшая расщепление белков и усиливая их синтез [100]. Более того, нейропептид Y способен усиливать гипертрофическое действие НА на кардиомиоциты желудочков [101]. Эти данные клеточных исследований согласуются со способностью нейропептида Y усиливать патологические изменения кардиомиоцитов в ряде моделей сердечной гипертрофии [34, 102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сердце – самая сложноорганизованная мышца, которая обеспечивает создание давления для кровообращения. Регуляция деятельности сердца со стороны симпатической нервной системы является ключевой для адаптации кровообращения к потребностям организма. Данные последних лет указывают на осуществление прецизионной коммуникации симпатических нейронов с миоцитами сердца через нейро-кардиальные соединения – подобные синапсам образования. Такой тип взаимодействий обеспечивает возможность тонкой регуляции функционирования отдельных кардиомиоцитов и их групп, и в то же время позволяет избежать освобождения избытка нейромедиатора и нейромодуляторов из пресинаптических варикозов. Коммуникация через нейро-кардиальные соединения вызывает быстрые (хроно- и инотропные) и долговременные (трофические) сердечные эффекты, которые преимущественно реализуются за счет разных подтипов постсинаптических АР. Нейро-кардиальная передача подвержена пластичности и регулируется на пресинаптическом уровне за счет ауторецепторов и рецепторов, чувствительных к основным регуляторами кровообращения (ангиотензину II, эндотелинам, ацетилхолину). При многих заболеваниях (сердечная недостаточность, аритмии, гипертония) происходят изменения нейро-кардиальных связей, которые могут вносить значительный вклад в распространение патологий. Разработка фармакологических препаратов, нацеленных на коррекцию нейро-кардиальной передачи, может быть перспективным направлением в терапии широкого спектра сердечно-сосудистых нарушений. Однако перед этим предстоит предпринять большие усилия для понимания фундаментальных принципов организации фокусной коммуникации между симпатической нервной системой и сердцем.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана частично грантом РФФИ № 20-04-00077, а также частично выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.Г.О. и А.М.П. – сбор данных, иллюстрация и редактирование манускрипта, А.М.П. – идея работы и написание манускрипта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность академику А.Л. Зефирову за постоянную поддержу в развитие нервно-мышечной физиологии в рамках Казанской физиологической школы, а также рецензентам за ценные замечания и комментарии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Fedele L., Brand T.* (2020) The Intrinsic Cardiac Nervous System and Its Role in Cardiac Pacemaking and Conduction. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 7: 54. https://doi.org/10.3390/jcdd7040054
- Bardsley E.N., Paterson D.J. (2020) Neurocardiac regulation: from cardiac mechanisms to novel therapeutic approaches. J. Physiol. 598: 2957–2976. https://doi.org/10.1113/JP276962
- Francis Stuart S.D., Wang L., Woodard W.R., Ng G.A., Habecker B.A. Ripplinger C.M. (2018) Age-related changes in cardiac electrophysiology and calcium handling in response to sympathetic nerve stimulation. J. Physiol. 596: 3977–3991. https://doi.org/10.1113/JP276396
- 4. *McLean M.R., Goldberg P.B., Roberts J.* (1983) An ultrastructural study of the effects of age on sympathetic innervation and atrial tissue in the rat. J. Mol. Cell Cardiol. 15: 75–92. https://doi.org/10.1016/0022-2828(83)90284-5
- Lamotte G., Holmes C., Wu T., Goldstein D.S. (2019) Long-term trends in myocardial sympathetic innervation and function in synucleinopathies. Parkinsonism Relat. Disord. 67: 27–33. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.09.014
- Safandeev V.V., Kolacheva A.A., Ugrumov M.V. (2019) Estimation of Metabolism of Catecholamines in Peripheral Organs As an Indicator of Their Desympathization under the Influence of Neurotoxins. Dokl. Biochem. Biophys. 486: 171–174. https://doi.org/10.1134/S1607672919030037
- Kuzmin V.S., Potekhina V.M., Odnoshivkina Y.G., Chelombitko M.A. Fedorov A.V., Averina O.A. et al. (2020) Proarrhythmic atrial ectopy associated with heart sympathetic innervation dysfunctions is specific for murine B6CBAF1 hybrid strain. Life Sci. 266: 118887. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118887
- Goldstein D.S., Eldadah B., Sharabi Y., Axelrod F.B. (2008) Cardiac sympathetic hypo-innervation in familial dysautonomia. Clin. Auton. Res. 18: 115–119. https://doi.org/10.1007/s10286-008-0464-1
- Kimura K., Ieda M., Fukuda K. (2012) Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. Circ. Res. 110: 325–336. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.257253
- Bennett M.R., Cheung A., Brain K.L. (1998) Sympathetic neuromuscular transmission at a varicosity in a syncytium. Microsc. Res. Tech. 42: 433–450. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<433::AID-JEMT6>3.0.CO;2-N
- 11. Goyal R.K., Chaudhury A. (2013) Structure activity relationship of synaptic and junctional neurotransmission. Auton. Neurosci. 176: 11–31. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.02.012
- Freeman K., Tao W., Sun H., Soonpaa M.H., Rubart M. (2014) In situ three-dimensional reconstruction of mouse heart sympathetic innervation by two-photon excitation fluorescence imaging. J. Neurosci. Methods. 221: 48–61. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.09.005
- Zaglia T., Mongillo M. (2017) Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)view. J. Physiol. 595: 3919–3930. https://doi.org/10.1113/JP273120
- Shcherbakova O.G., Hurt C.M., Xiang Y., Dell'Acqua M.L., Zhang Q. Tsien R.W., Kobika B.K. (2007) Organization of beta-adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes. J. Cell Biol. 176: 521–533. https://doi.org/10.1083/jcb.200604167
- Prando V., Da Broi F., Franzoso M., Plazzo A.P., Pianca N., Francolini M., Basso C., Kay M.W., Zaglia T., Mongillo M. (2018) Dynamics of neuroeffector coupling at cardiac sympathetic synapses. J. Physiol. 596: 2055–2075. https://doi.org/10.1113/JP275693

- Brain K.L., Cottee L.J., Bennett M.R. (1997) Varicosities of single sympathetic nerve terminals possess syntaxin zones and different synaptotagmin N-terminus labelling following stimulation. J. Neurocytol. 26: 491–500. https://doi.org/10.1023/a:1018533524643
- Sung U., Apparsundaram S., Galli A., Kahlig K.M., Savchenko V., Schroeter S., Quick M.W., Blakely R.D. (2003) A regulated interaction of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. J. Neurosci. 23: 1697–709. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01697.2003
- Li D., Paterson D.J. (2019) Pre-synaptic sympathetic calcium channels, cyclic nucleotide-coupled phosphodiesterases and cardiac excitability. Semin. Cell Dev. Biol. 94: 20–27. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.010
- Abramochkin D.V., Nurullin L.F., Borodinova A.A., Tarasova N.V., Sukhova G.S., Nikolsky E.E., Rosenshtraukh L.V. (2010) Non-quantal release of acetylcholine from parasympathetic nerve terminals in the right atrium of rats. Exp. Physiol. 95: 265–273. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050302
- Bennett M.R., Farnell L., Gibson W.G., Lin Y.Q., Blair D.H. (2001) Quantal and non-quantal current and potential fields around individual sympathetic varicosities on release of ATP. Biophys. J. 80: 1311–1328. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76105-X
- Li M., Hu J., Chen Z., Meng J., Wang H., Ma X., Luo X. (2006) Evidence for histamine as a neurotransmitter in the cardiac sympathetic nervous system. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 291: H45–H51. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00939.2005
- Pustovit K.B., Potekhina V.M., Ivanova A.D., Petrov A.M., Abramochkin D.V., Kuzmin V.S. (2019) Extracellular ATP and beta-NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner. Purinergic Signal. 15: 107–117. https://doi.org/10.1007/s11302-019-09645-6
- Smyth L.M., Bobalova J., Mendoza M.G., Lew C., Mutafova-Yambolieva V.N. (2004) Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder. J. Biol. Chem. 279: 48893–48903. https://doi.org/10.1074/jbc.M407266200
- Herring N., Lokale M.N., Danson E.J., Heaton D.A., Paterson D.J. (2008) Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal bradycardia via a Y2 receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. J. Mol. Cell Cardiol. 44: 477–485. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.10.001
- Herring N., Cranley J., Lokale M.N., Li D., Shanks J., Alston E.N., et al. (2012) The cardiac sympathetic co-transmitter galanin reduces acetylcholine release and vagal bradycardia: implications for neural control of cardiac excitability. J. Mol. Cell Cardiol. 52: 667–676. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.11.016
- Heredia Mdel P., Delgado C., Pereira L., Perrier R., Richard S., Vassort G. et al. (2005) Neuropeptide Y rapidly enhances [Ca2+]i transients and Ca2+ sparks in adult rat ventricular myocytes through Y1 receptor and PLC activation. J. Mol. Cell Cardiol. 38: 205–212. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.11.001
- Rump L.C., Riess M., Schwertfeger E., Michel M.C., Bohmann C., Schollmeyer P. (1997) Prejunctional neuropeptide Y receptors in human kidney and atrium. J. Cardiovasc. Pharmacol. 29: 656–661. https://doi.org/10.1097/00005344-199705000-00014
- Oki Y, Teraoka H., Kitazawa T. (2017) Neuropeptide Y (NPY) inhibits spontaneous contraction of the mouse atrium by possible activation of the NPY1 receptor. Auton. Autacoid. Pharmacol. 37: 23–28.

https://doi.org/10.1111/aap.12055

- 29. *Piper H.M., Millar B.C., McDermott B.J.* (1989) The negative inotropic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 340: 333–337. https://doi.org/10.1007/BF00168519
- Zverev A.A., Anikina T.A., Maslyukov P.M., Zefirov T.L. (2014) Role of neuropeptide Y in myocardial contractility of rats during early postnatal ontogeny. Bull. Exp. Biol. Med. 157: 421–423. https://doi.org/10.1007/s10517-014-2581-2
- 31. *Widiapradja A., Chunduri P., Levick S.P.* (2017) The role of neuropeptides in adverse myocardial remodeling and heart failure. Cell Mol. Life. Sci. 74: 2019–2038. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2452-x
- 32. *Protas L., Qu J., Robinson R.B.* (2003) Neuropeptide y: neurotransmitter or trophic factor in the heart? News. Physiol. Sci. 18: 181–185. https://doi.org/10.1152/nips.01437.2003

- Masliukov P.M., Moiseev K., Emanuilov A.I., Anikina T.A., Zverev A.A., Nozdrachev A.D. (2016) Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats. Neuropeptides. 55: 47–54. https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.10.007
- Bell D., Allen A.R., Kelso E.J., Balasubramaniam A., McDermott B.J. (2002) Induction of hypertrophic responsiveness of cardiomyocytes to neuropeptide Y in response to pressure overload. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303: 581–591. https://doi.org/10.1124/ipet.102.038448
- Pellieux C., Sauthier T., Domenighetti A., Marsh D.J., Palmiter R.D., Brunner H.R. et al. (2000) Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y5 receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 1595–1600. https://doi.org/10.1073/pnas.030533197
- Feng N., Huke S., Zhu G., Tocchetti C.G., Shi S., Aiba T., Kaludercic N., Hoover D.B., Beck S.E., Mankowski J.L., Tomaselli G.F., Bers D.M., Kass D.A., Paolocci N. (2015) Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112: 1880–1885.
- https://doi.org/10.1073/pnas.1417949112
- 37. Burnstock G. (2017) Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circ. Res. 120: 207–228. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
- Mei Q., Liang B.T. (2001) P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 281: H334–H341. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.1.H334
- 39. Anikina T.A., Zverev A.A., Sitdikov F.G., Anisimova I.N. (2013) Interaction of adrenergic and purinergic receptors in the regulation of rat myocardial contractility in postnatal ontogeny. Russ. J. Dev. Biol. 44: 296–301. https://doi.org/10.1134/S1062360413060027
- Pianca N., Di Bona A., Lazzeri E., Costantini I., Franzoso M., Prando V. et al. (2019) Cardiac sympathetic innervation network shapes the myocardium by locally controlling cardiomyocyte size through the cellular proteolytic machinery. J. Physiol. 597(14): 3639–3656. https://doi.org/10.1113/JP276200
- Vyskocil F., Magazanik L.G. (1977) Dual end-plate potentials at the single neuromuscular junction of the adult frog. Pflugers Arch. 368: 271–273. https://doi.org/10.1007/BF00585207
- 42. *Thaemert J.C.* (1966) Ultrastructure of cardiac muscle and nerve contiguities. J. Cell. Biol. 29: 156–162.
 - https://doi.org/10.1083/jcb.29.1.156
- 43. Kaludercic N., Takimoto E., Nagayama T., Feng N., Lai E.W., Bedja D., Chen K., Gabrielson K.L., Blakely R.D., Shin J.C., Pacak K., Kass D.A., Lisa F.D., Paolocci N. (2010) Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. Circ. Res. 106: 193–202. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198366
- 44. Bhogal N.K., Hasan A., Gorelik J. (2018) The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 5: 25. https://doi.org/10.3390/jcdd5020025
- 45. Wang J., Gareri C., Rockman H.A. (2018) G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. Circ. Res. 123: 716–735. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403
- Wengrowski A.M., Wang X., Tapa S., Posnack N.G., Mendelowitz D., Kay M.W. (2015) Optogenetic release of norepinephrine from cardiac sympathetic neurons alters mechanical and electrical function. Cardiovasc. Res. 105: 143–150. https://doi.org/10.1093/cvr/cvu258
- 47. *Tsentsevitsky A.N., Zakyrjanova G.F., Petrov A.M.* (2020) Cadmium desynchronizes neurotransmitter release in the neuromuscular junction: Key role of ROS. Free Radic Biol. Med. 155: 19–28.
 - https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.017
- Wingerd K.L., Goodman N.L., Tresser J.W., Smail M.M., Leu S.T., Rohan S.J., Pring J.L., Jacksan D.Y., Clegg D.O. (2002) Alpha 4 integrins and vascular cell adhesion molecule-1 play a role in sympathetic innervation of the heart. J. Neurosci. 22: 10772–10780. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-24-10772.2002
- Wu H., Lu Y., Barik A., Joseph A., Taketo M.M. Xiong W.C. (2012) beta-Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation. Development. 139: 2392–2404. https://doi.org/10.1242/dev.080705
- 50. *Cifuentes-Diaz C., Nicolet M., Goudou D., Rieger F., Mege R.M.* (1994) N-cadherin expression in developing, adult and denervated chicken neuromuscular system: accumulations at both the neuromuscular junction and the node of Ranvier. Development. 120: 1–11.

- Krivoi I.I., Petrov A.M. (2019) Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission. Int. J. Mol. Sci. 20: 1046. https://doi.org/10.3390/ijms20051046
- 52. Chen P.J., Martinez-Pena Y.V.I., Aittaleb M., Akaaboune M. (2016) AChRs Are Essential for the Targeting of Rapsyn to the Postsynaptic Membrane of NMJs in Living Mice. J. Neurosci. 36: 5680–5685.
 - https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4580-15.2016
- Oury J., Liu Y., Topf A., Todorovic S., Hoedt E., Preethish-Kumar V. et al. (2019) MACF1 links Rapsyn to microtubule- and actin-binding proteins to maintain neuromuscular synapses. J. Cell Biol. 218: 1686–1705. https://doi.org/10.1083/jcb.201810023
- Marchand S., Devillers-Thiery A., Pons S., Changeux J.P., Cartaud J. (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. J. Neurosci. 22: 8891–8901. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-08891.2002
- 55. *Petrov A.M., Zefirov A.L.* (2013) Cholesterol and lipid rafts in the biological membranes. Role in the release, reception and ion channel functions. Usp. Fiziol. Nauk. 44: 17–38.
- 56. Odnoshivkina U.G., Sytchev V.I., Nurullin L.F., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. (2015) β2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect. Eur. J. Pharmacol. 765: 140–153. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.020
- 57. Sytchev V.I., Odnoshivkina Y.G., Ursan R.V., Petrov A.M. (2017) Oxysterol, 5α-cholestan-3one, modulates a contractile response to β2-adrenoceptor stimulation in the mouse atria: Involvement of NO signaling. Life Sci. 188: 131–140. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.006
- 58. Odnoshivkina Y.G., Sytchev V.I., Petrov A.M. (2017) Cholesterol regulates contractility and inotropic response to β2-adrenoceptor agonist in the mouse atria: Involvement of G i -protein– Akt–NO-pathway. J. Mol. Cell Cardiol. 107: 27–40. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.001
- Ursan R., Odnoshivkina U.G., Petrov A.M. (2019) Membrane cholesterol oxidation downregulates atrial beta-adrenergic responses in ROS-dependent manner. Cell Signal. 67: 109503. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109503
- Hansen M.A., Bennett M.R., Barden J.A. (1999) Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. J. Auton. Nerv. Syst. 78: 1–9. https://doi.org/10.1016/s0165-1838(99)00046-6
- 61. Petrov A.M., Kravtsova V.V., Matchkov V.V., Vasiliev A.N., Zefirov A.L., Chibalin A.V. et al. (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 312: C627–C637. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00365.2016
- Kravtsova V.V., Petrov A.M., Vasil'ev A.N., Zefirov A.L., Krivoi I.I. (2015) Role of cholesterol in the maintenance of endplate electrogenesis in rat diaphragm. Bull. Exp. Biol. Med. 158(3): 298–300.
 https://doi.org/10.1007/c10517_015_2745_8
 - https://doi.org/10.1007/s10517-015-2745-8
- 63. Yang H.Q., Wang L.P., Gong Y.Y., Fan X.X., Zhu S.Y., Wang X.T. (2019) beta2-Adrenergic Stimulation Compartmentalizes beta1 Signaling Into Nanoscale Local Domains by Targeting the C-Terminus of beta1-Adrenoceptors. Circ. Res. 124: 1350–1359. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314322
- 64. Odnoshivkina U.G., Sytchev V.I., Starostin O., Petrov A.M. (2019) Brain cholesterol metabolite 24-hydroxycholesterol modulates inotropic responses to beta-adrenoceptor stimulation: The role of NO and phosphodiesterase. Life Sci. 220: 117–126. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.054
- Abadie C., Foucart S., Page P., Nadeau R. (1996) Modulation of noradrenaline release from isolated human atrial appendages. J. Auton. Nerv. Syst. 61: 269–276. https://doi.org/10.1016/s0165-1838(96)00093-8
- 66. Rump L.C., Riera-Knorrenschild G., Schwertfeger E., Bohmann C., Spillner G., Schollmeyer P. (1995) Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. J. Cardiovasc. Pharmacol. 26: 462–470. https://doi.org/10.1097/00005344-199509000-00017
- Isaka M., Kudo A., Imamura M., Kawakami H., Yasuda K. (2007) Endothelin receptors, localized in sympathetic nerve terminals of the heart, modulate norepinephrine release and reperfusion arrhythmias. Basic Res. Cardiol. 102: 154–162. https://doi.org/10.1007/s00395-006-0623-2
- 68. Sperlagh B., Erdelyi F., Szabo G., Vizi E.S. (2000) Local regulation of [(3)H]-noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P(2X)-receptors located on axon terminals.

Br. J. Pharmacol. 131: 1775–1783. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703757

- Machida T., Heerdt P.M., Reid A.C., Schafer U., Silver R.B. Broekman M.J. (2005) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/CD39, localized in neurons of human and porcine heart, modulates ATP-induced norepinephrine exocytosis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 313: 570–577. https://doi.org/10.1124/jpet.104.081240
- von Kugelgen I., Stoffel D., Starke K. (1995) P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat atria. Br. J. Pharmacol. 115: 247–254. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15870.x
- Larsen H.E., Lefkimmiatis K., Paterson D.J. (2016) Sympathetic neurons are a powerful driver of myocyte function in cardiovascular disease. Sci. Rep. 6: 38898. https://doi.org/10.1038/srep38898
- 72. Larsen H.E., Bardsley E.N., Lefkimmiatis K., Paterson D.J. (2016) Dysregulation of Neuronal Ca²⁺ Channel Linked to Heightened Sympathetic Phenotype in Prohypertensive States. J. Neurosci. 36: 8562–8573. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1059-16.2016
- Shanks J., Mane S., Ryan R., Paterson D.J. (2013) Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the hypertensive rat. Hypertension. 61: 187–193. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.202184
- 74. Jancovski N., Bassi J.K., Carter D.A., Choong Y.T., Connelly A., Nguyen T.P. (2013) Stimulation of angiotensin type 1A receptors on catecholaminergic cells contributes to angiotensin-dependent hypertension. Hypertension. 62: 866–871. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01474
- 75. Bellot M., Galandrin S., Boularan C., Matthies H.J., Despas F., Denis C. (2015) Dual agonist occupancy of AT1-R-alpha2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. Nat. Chem. Biol. 11: 271–279. https://doi.org/10.1038/nchembio.1766
- Toth A.D., Gyombolai P., Szalai B., Varnai P., Turu G., Hunyady L. (2017) Angiotensin type 1A receptor regulates beta-arrestin binding of the beta2-adrenergic receptor via heterodimerization. Mol. Cell Endocrinol. 442: 113–124. https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.027
- 77. Bardsley E.N., Davis H., Buckler K.J., Paterson D.J. (2018) Neurotransmitter Switching Coupled to beta-Adrenergic Signaling in Sympathetic Neurons in Prehypertensive States. Hypertension. 71: 1226–1238. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10844
- Sperlagh B., Heinrich A., Csolle C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. Purinergic Signal. 3: 269–284. https://doi.org/10.1007/s11302-007-9080-0
- 79. Braganca B., Nogueira-Marques S., Ferreirinha F., Fontes-Sousa A.P., Correia-de-Sa P. (2019) The Ionotropic P2X4 Receptor has Unique Properties in the Heart by Mediating the Negative Chronotropic Effect of ATP While Increasing the Ventricular Inotropy. Front. Pharmacol. 10: 1103. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01103
- Burgdorf C., Richardt D., Kurz T., Seyfarth M., Jain D., Katus H.A. (2001) Adenosine inhibits norepinephrine release in the postischemic rat heart: the mechanism of neuronal stunning. Cardiovasc. Res. 49: 713–720. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00309-6
- Olivas A., Gardner R.T., Wang L., Ripplinger C.M., Woodward W.R., Habecker B.A. (2016) Myocardial Infarction Causes Transient Cholinergic Transdifferentiation of Cardiac Sympathetic Nerves via gp130. J. Neurosci. 36(2): 479–488. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3556-15.2016
- Wang L., Olivas A., Francis Stuart S.D., Tapa S., Blake M.R., Woodward W.R (2020) Cardiac sympathetic nerve transdifferentiation reduces action potential heterogeneity after myocardial infarction. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 318: H558–H565. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00412.2019
- Kanazawa H., Ieda M., Kimura K., Arai T., Kawaguchi-Manabe H., Matsuhashi (2010) Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. J. Clin. Invest. 120: 408–421. https://doi.org/10.1172/JCI39778
- Vaaga C.E., Borisovska M., Westbrook G.L. (2016) Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. Curr. Opin. Neurobiol. 29: 25–32. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.010
- Franzoso M., Zaglia T., Mongillo M. (2016) Putting together the clues of the everlasting neurocardiac liaison. Biochim. Biophys. Acta. 1863: 1904–1915. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.009

 Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.M., Mc-Mahon S.B., Shelton D.L, Levinson A.D. (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. Cell. 76: 1001–1011.

https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90378-6

- Smeyne R.J., Klein R., Schnapp A., Long L.K., Bryant S., Lewin A., Lira S.A. Barbacid M. (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. Nature. 368(6468): 246–249. https://doi.org/10.1038/368246a0
- Mok S.A., Lund K., Campenot R.B. (2009) A retrograde apoptotic signal originating in NGFdeprived distal axons of rat sympathetic neurons in compartmented cultures. Cell Res. 19: 546-560.
 https://doi.org/10.1028/or.2000.11
 - https://doi.org/10.1038/cr.2009.11
- Oh Y., Cho G.S., Li Z., Hong I., Zhu R., Kim M.J. (2016) Functional Coupling with Cardiac Muscle Promotes Maturation of hPSC-Derived Sympathetic Neurons. Cell Stem. Cell 19: 95–106.

https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.002

- Kreipke R.E., Birren S.J. (2015) Innervating sympathetic neurons regulate heart size and the timing of cardiomyocyte cell cycle withdrawal. J. Physiol. 593: 5057–5073. https://doi.org/10.1113/JP270917
- Zaglia T., Milan G., Franzoso M., Bertaggia E., Pianca N., Piasentini E., Voltarelli V.A., Chiavegato D., Brum P.C., Glass D.J., Schaffino S., Sandri M., Mongillo M. (2013) Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via beta2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis. Cardiovasc. Res. 97: 240–250. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs320
- 92. Myagmar B.E., Flynn J.M., Cowley P.M., Swigart P.M., Montgomery M.D., Thai K., Nair D., Gupta R., Deng Dx, Hosoda C., Melov S., Baker A.J., Simpson P.C. (2017) Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent. Circ. Res. 120: 1103–1115. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310520
- Gao X., Lowry P.R., Zhou X., Depry C., Wei Z., Wong G.W. Zhang Y. (2011) PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 14509–14514. https://doi.org/10.1073/pnas.1019386108
- 94. Belotti E., Schaeffer L. (2020) Regulation of Gene expression at the neuromuscular Junction. Neurosci. Lett. 735: 135163 https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135163
- Wang J., Gareri C., Rockman H.A. (2018) G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. Circul. Res. 123: 716–735. https://doi.org/10.1161/circresaha.118.311403
- 96. White I.A., Gordon J., Balkan W., Hare J.M. (2015) Sympathetic Reinnervation Is Required for Mammalian Cardiac Regeneration. Circ. Res. 117(12): 990–994 https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307465
- 97. *Hoffman J.I.* (1987) Transmural myocardial perfusion. Prog. Cardiovasc. Dis. 29: 429–464. https://doi.org/10.1016/0033-0620(87)90016-8
- Yoshioka K., Gao D.W., Chin M., Stillson C., Penades E., Lesh M. et al. (2000) Heterogeneous sympathetic innervation influences local myocardial repolarization in normally perfused rabbit hearts. Circulation. 101: 1060–1066. https://doi.org/10.1161/01.cir.101.9.1060
- Momose M., Tyndale-Hines L., Bengel F.M., Schwaiger M. (2001) How heterogeneous is the cardiac autonomic innervation? Basic Res. Cardiol 96: 539–546. https://doi.org/10.1007/s003950170004
- 100. Millar B.C., Schluter K.D., Zhou X.J., McDermott B.J., Piper H.M. (1994) Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes. Am. J. Physiol. 266: C1271–1277. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.5.C1271
- 101. Kanevskij M., Taimor G., Schafer M., Piper H.M., Schluter K.D. (2002) Neuropeptide Y modifies the hypertrophic response of adult ventricular cardiomyocytes to norepinephrine. Cardiovasc. Res. 53: 879–887. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00517-x
- 102. Wang J., Hao D., Zeng L., Zhang Q., Huang W. (2021) Neuropeptide Y mediates cardiac hypertrophy through microRNA-216b/FoxO4 signaling pathway. Int. J. Med. Sci. 18: 18–28. https://doi.org/10.7150/ijms.51133

The Role of Neuro-Cardiac Junction in the Sympathetic Regulation of Heart

Yu. G. Odnoshivkina^{*a*} and A. M. Petrov^{*a*, *b*, *}

^aKazan State Medial University, Kazan, Russia ^bLaboratory of Biophysics of Synaptic Processes, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia *e-mail: fysio@rambler.ru

A one of the important mechanisms of heart regulation is realized via sympathetic innervation of cardiac myocytes. Axons of the sympathetic neurons branch out and form along their length extensions (varicosities), which contain synaptic vesicle filled out with a main neurotransmitter (norepinephrine) and co-neurotransmitters. The varicosities come closely to cardiomyocytes and can form the neuro-cardiac junction, having synapse-like organization, i.e. pre- and postsynaptic regions divided by narrow gap. These synaptic structures are subject to plasticity and the neurotransmitter release from the presynaptic varicosities are tightly regulated, including due to autoreceptors. Neuromuscular transmission via the neuro-cardiac junctions have fast chronotropic and inotropic effects and also regulate tropic processes, which determine a size of cardiomyocytes and architecture of cardiac wall. Different subtypes of postsynaptic adrenoceptors are involved in the short- and long-time effects of the neuro-cardiac interactions. Numerous common disorders (heart failure, arrythmia, hypertension) are frequently accompanied by changes in cardiac neurotransmission which contribute to the disease progression. In this review we have systematized and summarized evidences supporting hypothesis about cardiac quasi-synaptic transmission that could have a pivotal meaning for brainheart communication.

Keywords: adrenergic receptor, presynaptic varicosity, cardiomyocyte, norepinephrine, heart, sympathetic nervous system, synapse

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 492-517

= обзоры =

СИНАПТИЧЕСКИЕ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

© 2021 г. А. В. Зайцев^{1,} *, Д. В. Амахин¹, А. В. Дёмина¹, М. В. Захарова¹, Ю. Л. Ергина¹, Т. Ю. Постникова¹, Г. П. Диеспиров¹, Л. Г. Магазаник¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: aleksey zaitsev@mail.ru

> Поступила в редакцию 20.01.2021 г. После доработки 08.02.2021 г. Принята к публикации 09.02.2021 г.

Эпилепсия является одним из распространенных заболеваний мозга, и несмотря на интенсивные многолетние исследования этой патологии современная медицина не может эффективно купировать судорожные проявления почти у трети больных. При эпилепсии происходит реорганизация нейронных сетей, которая обусловлена гибелью части нейронов и формированием новых нейронных связей с измененными свойствами. В этом обзоре мы сфокусировались на анализе изменений свойств ключевого элемента нейронных сетей – химического синапса – сразу после эпилептической активности, во время эпилептогенеза, а также при хронической эпилепсии. Так как синапс включает в себя не только нейрональные пре- и постсинаптическую части, но и глиальные компоненты, то в наше рассмотрение включены изменения свойств астроцитов и микроглии. Эпилептическая активность вызывает многочисленные модификации в работе синапса: меняется вероятность выброса медиатора, трансформируется субъединичный состав и соотношение постсинаптических рецепторов, нарушается синаптическая пластичность, меняется морфология и активность астроцитов и микроглии. Глиальные клетки выделяют ряд глиатрансмиттеров и цитокинов, которые, в свою очередь, модифицируют синаптическую передачу. В некоторых случаях комплекс этих изменений благоприятен и позволяет практически полностью скомпенсировать последствия эпилептической активности для нервной системы. Однако нередко эти изменения, наоборот, запускают цепь процессов, ведущих к эпилептизации и долговременным нарушениям в функционировании нейронных сетей. За последние 10 лет достигнут существенный прогресс в расшифровке этих изменений и их механизмов, который и отражен в нашем обзоре. Однако до сих пор у исследователей не сложилось четкое понимание, какие именно модификации в функционировании синапсов обеспечивают наилучшую компенсацию и способны предотвратить эпилептогенез. Эти знания могли бы стать основой для разработки действенных методов профилактики эпилептогенеза и лечения эпилепсии.

Ключевые слова: синапс, NMDA-рецептор, астроцит, микроглия, эпилептогенез, модель эпилепсии

DOI: 10.31857/S0869813921040166

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических расстройств, существенно влияющих на качество жизни пациентов [1]. Эпилепсия не единое заболевание, а целая группа расстройств. Эпилепсия может быть обусловлена как генетической предрасположенностью (идиопатическая эпилепсия),

так и вызвана различными травмами мозга, инсультом, гипоксией, инфекциями, опухолями (приобретенная, вторичная, или симптоматическая эпилепсия). Однако общим для всех форм эпилепсии является повторное появление самопроизвольной судорожной активности в связи с гиперактивностью нейронов головного мозга.

На сегодняшний день до 30% случаев эпилепсии остаются фармакорезистентными [2], поэтому важнейшей проблемой как фундаментальной нейробиологии, так и клинической нейрофизиологии является выяснение механизмов эпилептизации мозга и поиск эффективных методов предотвращения и лечения эпилепсии [3]. Современная концепция эпилептогенеза предполагает, что в результате действия неблагоприятных факторов происходит утрата или нарушение механизмов, препятствующих судорожной активности, появляется дисбаланс между возбуждением и торможением в нейронных сетях, где глутаматергические и ГАМКергические нейроны соответственно играют важную роль.

Однажды проявившись, судорожные состояния, как правило, ведут к дальнейшим патологическим перестройкам на молекулярном, клеточном и сетевых уровнях, что сопровождается морфологическими и функциональными нарушениями в работе центральной нервной системы, усиливающими судорожную готовность и нарушающими работу мозга. Таким образом, сам эпилептогенез условно подразделяется на 3 основных фазы: 1) действие провоцирующего фактора, запускающего процесс; 2) латентный период, в ходе которого самопроизвольных судорог нет, но идут перестройки, приводящие к утрате антисудорожных механизмов и превращению нормального мозга в эпилептический; 3) хроническая фаза эпилепсии [4].

Во время эпилептогенеза наблюдается нейродегенерация и нейрогенез, повреждение аксонов и их разрастание, активация глиальных клеток, инвазия периферических иммунных клеток, повреждение сосудов и ангиогенез, трансформации во внеклеточном матриксе, а также изменения в молекулярной структуре различных ионных каналов [3]. Важным фактором, усиливающим эпилептизацию мозга, является формирование многочисленных новых возбуждающих синапсов в тех местах, где они отсутствуют в норме [5]. Появление новых синапсов и изменение свойств существующих синапсов ведет к патологическим формам синаптической пластичности, усиливающей процессы синхронизации в нейронных цепях. Это, в свою очередь, ведет к более легкому возникновению новых эпилептических приступов [6].

В настоящем обзоре мы не будем обсуждать вклад и значение всех процессов, наблюдаемых при эпилептогенезе, а рассмотрим прежде всего современные данные об изменениях свойств ключевого элемента нейронных сетей — химического синапса — сразу после эпилептической активности, во время эпилептогенеза, а также при хронической эпилепсии. Так как синапс включает в себя не только нейрональные пресинаптическую и постсинаптическую части, но также глиальные компоненты, то в наше рассмотрение также включены изменения свойств астроцитов и микроглии (рис. 1).

1. ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Изучению пресинаптических изменений в ходе эпилептогенеза и при эпилепсии уделяется относительно мало внимания. Значительная доля из проведенных исследований посвящена оценке частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ). Показано увеличение частоты мВПСТ в ходе эпилептогенеза; в частности, увеличение выявлено у нейронов области САЗ в модели постишемической спонтанной эпилептиформной активности [7], проекционных нейронов латеральной амигдалы спустя 14–16 нед. после эпилептического статуса, вызванного пилокарпином [8], нейронов области СА1 в латентный период, спустя



Рис. 1. Патологические изменения в синапсе при эпилепсии. На рисунке представлены основные структурные и молекулярные изменения в разных частях глутаматергического синапса, наблюдаемые при эпилепсии (эти изменения могут не совпадать друг с другом по времени возникновения при развитии патологии). При эпилепсии увеличивается площадь пресинаптического бутона и количество глутамат-содержащих везикул. На постсинаптической поверхности наблюдается увеличение NMDA-рецепторов, содержащих GluN2B-субъединицу, а также появляются AMPA-рецепторы, лишенные GluA2-субъединицы, что в целом увеличивает ток ионов Ca²⁺ внутрь нейрона. Обратите вниманием, что красные стрелки иллюстрируют только ток ионов Ca²⁺, без учета других ионных токов. Увеличивается внеклеточная концентрация хемокина CX3CL1 и ADP/ATP, что приводит к изменению морфологии микроглиальных клеток и повышению продукции провоспалительных цитокинов, что в свою очередь может модулировать работу NMDA-рецепторов через колокализованные на постсинаптической мембране IL-1R1-рецепторы. Астроциты втягивают свои отростки, из-за чего площадь покрытия синапса астроцитарными лепестками уменьшается. Это ослабляет обратный захват глутамата из синаптической щели. Усиливается высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо астроцита, что может приводить к усилению выброса глиотрансмиттеров. Подробное объяснение всех процессов дано в соответствующих разделах обзора.

7 дней после эпилептического статуса, вызванного введением каината [9]. Однако во многих случаях остается неясным, связано ли наблюдаемое увеличение частоты мВПСТ именно с увеличением вероятности выброса глутамата или же обусловлено подключением молчащих синапсов. Кроме того, высвобождение глутамата контролируется рядом пресинаптических рецепторов: аденозиновыми, мускариновыми и ГАМКб-рецепторами, действующих по принципу гетерорецепторов и выступающими в роли ауторецепторов ионотропными (NMDA-рецепторы, каинатные рецепторы) и метаботропными рецепторами глутамата [10]. Graebenitz и соавт. продемонстрировали, что различия в частоте мВПСТ у контрольных и пилокарпиновых мышей нивелируются в присутствии антагониста NMDA-рецепторов AP5, что может быть связано с регулирующим влиянием пресинаптических NMDA-ауторецепторов на процесс высвобождения глутамата [8]. Согласно исследованию Thompson и соавт., агонисты ГАМКб-рецепторов, ССР44533 и ССР35024, значительно снижали частоту мВПСТ в энторинальной коре. Ни один из агонистов не оказывал никакого влияния на амплитуду или кинетику миниатюрных ВПСТ. Однако эффект СGP44533 на частоту миниатюрных ВПСТ оказался снижен в срезах пилокарпиновых крыс, что может указывать на снижение функциональной активности пресинаптических ГАМКб-рецепторов в пилокарпиновой модели эпилепсии [11].

Интересно, что в модели судорожных состояний, вызванных применением конвульсанта пентилентетразола, наоборот, выявлено уменьшение вероятности выброса глутамата. Спустя сутки после введения пентилентетразола наблюдается фасилитация полевых ответов в области CA1 гиппокампа при парной стимуляции коллатералей Шаффера, что свидетельствует об уменьшении вероятности выброса глутамата в этих синапсах [12, 13]. Пентилентетразол, в отличие от пилокарпина и каината, не приводит к развитию приобретенной эпилепсии. По-видимому, снижение вероятности выброса глутамата в синапсах гиппокампа в этой модели может быть важным антиэпилептогенным фактором.

Морфологические исследования позволяют подойти к проблеме с другой стороны, отвечая на вопрос о том, что происходит с количеством везикул, а также числом и размерами пресинаптических терминалей. Так, эффект киндлинга на пресинаптические отростки был оценен при помощи иммуномечения – в качестве маркера пресинаптических везикулярных мембран использовался синаптофизин. Значительное увеличение иммунореактивности было отмечено на 28-й день в радиальном слое области СА1, в люцидном и радиальном слоях СА3, в хилусе и во внутренней трети молекулярного слоя зубчатой извилины, а также в II/III слоях пириформной коры [14]. 3D-реконструкция синаптических контактов нейронов CA3–CA1 гиппокампа показала, что эпилептический статус, индуцированный неоднократным введением низких доз каината, приводит к увеличению числа докированных (готовых к высвобождению) везикул в пресинаптических окончаниях уже через 7 дней после его индукции [9]. Согласно работе Murthy и соав, размер пула готовых к высвобождению везикул сильно коррелирует с вероятностью высвобождения медиатора, следовательно, полученные морфологические данные позволяют предположить, что вероятность высвобождения глутамата может быть повышена в исследуемых синапсах [15].

С помощью метода двухфотонной микроскопии было подробно исследовано, как индуцированный пилокарпином эпилептический статус влияет на пресинаптические процессы в терминалях мшистых волокон. В хроническую фазу пилокарпиновой модели значимо увеличились средняя площадь бутонов мшистых волокон и число активных зон, приходящихся на один бутон. Проведенные эксперименты со стимул-индуцированным выбросом медиатора свидетельствовали как об ускорении высвобождения везикул из бутонов мшистых волокон, так и о появлении новой субпопуляции бутонов, характеризующейся более высокой скоростью высвобождения глутамата. Согласно данным электронной микроскопии, у животных, перенесших эпилептический статус, пресинаптические окончания содержали бо́льшее число готовых к высвобождению везикул, повышенным было также соотношение среднего числа готовых к высвобождению везикул к протяженности активной зоны [16].

Использование in vivo моделей эпилепсии позволяет учитывать не только внутригиппокампальные связи, но и афференты, приходящие из других областей мозга, а значит и роль, которую они играют в процессах эпилептогенеза. В работе 2015 г. при помощи пилокарпиновой модели эпилепсии была исследована динамика связей между супрамаммиллярным ядром гипоталамуса и зубчатой извилиной и подробно изучена их реорганизация, начинающаяся в ходе латентного периода и продолжающаяся также после появления у животных спонтанных судорог [17]. Помимо нарушения паттерна распределения изучаемых афферентов, весь внутренний молекулярный слой зубчатой извилины получал гораздо более высокое, по сравнению с контролем, число окончаний аксонов, приходящих из латеральной и медиальной областей супрамаммиллярного ядра. В частности, спустя 2 месяца после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса, на всем ростро-каудальном протяжении зубчатой извилины во внутренней трети молекулярного слоя присутствовало множество крупных VGLUT-2-иммунопозитивных терминалей (VGLUT2 – везикулярный транспортер глутамата 2 типа). Количественный анализ показал, что средняя плотность VGLUT2- и VGLUT2/VGAT-иммуномеченных бутонов в молекулярном слое зубчатой извилины была выше у пилокарпиновых животных. Применение антероградного трейсера BDA продемонстрировало схожий паттерн реорганизации афферентов, идущих от супрамаммиллярного ядра, с данными, полученными при иммуномечении окончаний аксонов на содержание VGLUT2 [17].

Таким образом, пресинаптические изменения могут быть одной из важных причин повышенной возбудимости нейронов при эпилепсии.

2. ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

2.1. Постсинаптические изменения, являющиеся прямым следствием эпилептической активности

2.1.1. Нарушения глутаматергической передачи

Индуцированная эпилептическая активность *in vivo* и эпилептиформная активность *in vitro* могут вызвать длительное усиление постсинаптических возбуждающих ответов во всех глутаматергических синапсах гиппокампа [18–21]. Вызванная эпилептической активностью потенциация сопровождается увеличением экспрессии GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов в дендритных шипиках, что указывает на происходящее встраивание AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану [18, 20]. Также имеются свидетельства происходящего увеличения числа NMDA-рецепторов в синапсах [22, 23]. В пирамидных нейронах энторинальной коры уже спустя несколько минут после начала эпилептиформной активности наблюдается схожее по своим свойствам усиление глутаматергических синапсов [24].

Предполагается, что происходящее во время эпилептической активности усиление возбуждающей синаптической передачи может быть одним из механизмов перехода от одиночных судорог к эпилептическому статусу [22, 25, 26]. Подробнее изменения долговременной синаптической пластичности (ДВП) рассмотрено в следующем разделе этого обзора.

2.1.2. Нарушения ГАМК-опосредованного торможения при эпилептической активности

Известно, что концентрация хлорид-ионов внутри клетки достаточно лабильна и может изменяться в широких пределах в зависимости от интенсивности активации ГАМКа-рецепторов и эффективности регулирующих ее гомеостатических механизмов [27–29]. Предполагается, что именно аномальная активность ГАМКергических нейронов приводит к уменьшению градиента хлорид-ионов, что ведет к эпилептическому припадку [28, 30–32]. Исследования с применением моделей эпилептической активности позволяют связать переход от одиночных эпилептических судорог к эпилептическому статусу с необратимым изменением полярности ГАМКа-рецептор-опосредованных ответов. В результате избыточной активации ГАМКа-рецепторов гомеостатические механизмы оказываются не в состоянии восстановить функциональное торможение в нейронной сети, в результате чего генерация эпилептических разрядов не может остановиться [33].

О происходящих вследствие эпилептической активности постсинаптических изменениях ГАМКергической синаптической передачи свидетельствует снижение эффективности противосудорожных препаратов. Например, противосудорожный эффект бензодиазепинов, являющихся положительными модуляторами ГАМКарецепторов, снижается, если их применению предшествовал значительный период эпилептической активности [33].

Другим патологическим механизмом, который снижает эффективность ГАМК-опосредованного торможения во время эпилептической активности и способствует усугублению эпилептического состояния, является снижение проводимости ГАМКа-рецепторов [33–35]. Это может быть следствием интернализации ГАМКа-рецепторов в ходе эпилептиформной активности [36, 37]: скорость интернализации коррелирует с нейрональной активностью и, по-видимому, регулируется посредством кальций-зависимых механизмов.

2.2. Постсинаптические изменения, ассоциированные с развитием приобретенной эпилепсией

Даже однократный эпилептический припадок зачастую приводит к отложенным во времени постсинаптическим изменениям, которые могут стать причиной развития приобретенной эпилепсии. Примером наиболее часто описываемых нарушений, влияющих на свойства синаптической передачи, является изменение относительного вклада GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов и кальций-проницаемых AMPA-рецепторов в постсинаптический ответ.

2.2.1. Изменение уровня экспрессии GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов

GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы значительно отличаются по своим свойствам от GluN2A-содержащих: они имеют более медленную кинетику, чем обеспечивают более продолжительный постсинаптический ответ, а также сильно отличаются по аминокислотной последовательности цитоплазматических доменов и характеру взаимодействия с внутриклеточными сигнальными молекулами [38]. Например, показано, что активация GluN2A-содержащих рецепторов увеличивает экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF), тогда как активация GluN2B-содержащих рецепторов в большей мере усиливает ERK1/2-опосредованное фосфорилирование [39]. В пилокарпиновой и литий-пилокарпиновой моделях эпилепсии у крыс было продемонстрировано увеличение относительного вклада GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов в постсинаптический ответ на ранних стадиях эпилептогенеза [40–42]; аналогичные результаты были получены и в модели с пентилентетразоловым киндлингом [43]. Также было показано, что послед-

ствием судорог может быть усиление фосфорилирования GluN2B-субъединицы NMDA-рецепторов [44]. Данные, касающиеся эффекта фармакологической блокады GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов на этапе эпилептогенеза противоречивы: в ряде исследований продемонстрировано, что применение антагониста этих рецепторов (ифенпродила) препятствует эпилептогенезу после провоцирующего воздействия [43–45], но есть свидетельства отсутствия подобного эффекта [39]. Все вышеперечисленное позволяет рассматривать GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы как перспективную мишень для фармакологического воздействия в целях предотвращения развития приобретенной эпилепсии.

2.2.2. Экспрессия кальций-проницаемых АМРА-рецепторов

АМРА-рецепторы, не содержащие GluA2-субъединицы (или в некоторых случаях, содержащие неотредактированную версию GluA2-субъединицы) проницаемы для ионов кальция. Кроме того, такие рецепторы обладают большей проводимостью, иными временными характеристиками открытия и закрытия ионного канала, а также иначе взаимодействуют с внутриклеточными сигнальными и регуляторными молекулами [46, 47]. На раннем этапе постнатального развития кальций-проницаемые АМРА-рецепторы экспрессируются в пирамидных нейронах гиппокампа. По мере взросления организма, они замещаются на кальций-непроницаемые АМРА-рецепторы [48].

Помимо относительно кратковременной экспрессии кальций-проницаемых АМРА-рецепторов в глутаматергических нейронах непосредственно во время эпилептической активности, аномальная экспрессия данных рецепторов может также являться отложенным следствием перенесенных судорожных состояний. В большом числе работ на различных моделях эпилепсии показано снижение относительной экспрессии GluA2-субъединицы AMPA-рецепторов на определенных этапах развития заболевания [49–55], хотя есть и противоположные свидетельства о снижении их экспрессии [56, 57].

В одной из наиболее хорошо воспроизводящей процесс эпилептогенеза моделей – пилокарпиновой, с помощью электрофизиологических методов было продемонстрировано кратковременное появление кальций-проницаемых АМРА-рецепторов на пирамидных нейронах префронтальной коры крыс спустя несколько дней после перенесенного эпилептического статуса [54]. Также в ряде моделей эпилепсии было продемонстрировано, что антагонисты кальций-проницаемых АМРА-рецепторов обладают некоторым непосредственным противосудорожным эффектом [58–61]

Эпилептические приступы, перенесенные в раннем возрасте, могут еще больше увеличить уровень экспрессии кальций-проницаемых AMPA-рецепторов [62], результатом чего является развитие эпилепсии и различных когнитивных расстройств. В ряде случаев подобные последствия перенесенных судорог могут быть предотвращены с помощью терапии антагонистами AMPA-рецепторов [62, 63].

В пользу непосредственного вклада кальций-проницаемых АМРА-рецепторов в развитие эпилепсии свидетельствуют эксперименты с искусственным повышением экспрессии неотредактированной формы GluA2-субъединицы AMPA-рецепторов у мышей, что приводит к повышению количества постсинаптических кальций-проницаемых AMPA-рецепторов. В этом случае наблюдалась повышенная склонность к эпилептическим судорогам, низкая выживаемость подопытных животных после эпилептических приступов, гибель пирамидных нейронов CA1 гиппокампа, сниженная плотность дендритных шипиков, нарушения обучения и памяти [61, 64, 65].

Цитоплазматический белок PICK1, активность которого повышается с увеличением внутриклеточной концентрация кальция, способствует интернализации GluA2-содержащих рецепторов из плазматической мембраны, тем самым увеличивая относительный вклад кальций-проницаемых АМРА-рецепторов в синаптический ответ и еще больше увеличивая вход кальция в клетку. Показано, что экспрессия белка PICK1 снижается вследствие перенесенных судорог, что, вероятно, представляет собой адаптивный механизм, препятствующий слишком сильному снижению количества GluA2-содержащих рецепторов в синапсах [66].

2.3. Постсинаптические изменения при хронической эпилепсии

Постсинаптические изменения при хронической эпилепсии исследуются как на образцах ткани головного мозга человека, полученных в ходе нейрохирургических операций или посмертно, так и с применением моделей эпилепсии на лабораторных животных. Наиболее распространенным экспериментальным подходом к изучению постсинаптических изменений при эпилепсии у человека является выявление изменений эксперссии субъединиц постсинаптических рецепторов молекулярно-биологическими и иммуногистохимическими методами [67–72].

Большинство выявленных изменений субъединичного состава синаптических рецепторов при эпилепсии у человека воспроизводятся в животных моделях, что подтверждает их валидность. Например, часто выявляемое увеличение относительной экспрессии GluN2B-субъединицы NMDA-рецепторов у человека при эпилепсии [69, 73] показано в пилокарпиновой модели хронической эпилепсии у крыс [74]. Однако в каинатной модели хронической эпилепсии выявлено небольшое снижение экспрессии GluN2B-субъединицы [75].

В образцах ткани мозга пациентов с эпилепсией показано снижение экспрессии GluA2-субъединицы AMPA-рецепторов, что ведет к появлению кальций-проницаемых AMPA-рецепторов [69, 76]. Аналогичное снижение экспрессии GluA2-субъединицы наблюдалось в периринальной коре крыс в модели хронической эпилепсии [77]. Другой механизм увеличения числа кальций-проницаемых AMPA-рецепторов при эпилепсии выявлен при изучении образцов ткани гипоталамической гамартомы, вызывающей эпилептические припадки [76]. Предположительно, количество кальций-проницаемых AMPA-рецепторов в этих нейронах увеличивается за счет снижения посттрансляционной модификации PHK GluA2-субъединицы, поскольку у них было снижено количество фермента аденозин-дезаминазы (ADAR2), осуществляющей эту модификацию.

Наиболее характерным изменением субъединичного состава ГАМКа-рецепторов, регистрируемого у пациентов с эпилепсией, является увеличение соотношения субъединиц α2/α1 ГАМКа-рецепторов [68, 69], что характерно для более ранних стадий онтогенеза [78]. Подобные изменения описаны и в животных моделях [79]. В сочетании с ослаблением трансмембранного градиента ионов хлора и повышенной экспрессией кальций-проницаемых АМРА-рецепторов, которые также характерны для синаптической передачи в незрелом мозге, это наблюдение позволяет предполагать, что в ходе хронической эпилепсии может наблюдаться своего рода инверсия процесса созревания синаптической передачи [80].

3. ДОЛГОВРЕМЕННАЯ СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

При эпилепсии нарушается одна из основных функций мозга — способность обучаться и модифицировать поведение, реализуемая благодаря синаптической пластичности [81, 82]. Суть феномена синаптической пластичности заключается в том, что в ответ как на физиологические, так и на патологические повторяющиеся раздражители происходит изменение синаптических связей, эти изменения могут длиться от секунд до часов, дней и даже месяцев [81]. Долговременная потенциация (ДВП) и депрессия вместе с другими формами синаптической пластичности

обеспечивают нейронный субстрат для процессов обучения и памяти [83]. Наибольший интерес у исследователей эпилепсии вызывает изучение долговременной пластичности в гиппокампе [84, 85]. Это связано с тем, что гиппокамп играет важную роль в процессах памяти и обучения, моторном контроле и стереотипном поведении [86]. Кроме того, гиппокамп является одним из наиболее уязвимых участков головного мозга при возникновении эпилепсии [87].

Сейчас достаточно распространена гипотеза, что потенциация синаптической передачи, происходящая вследствие эпилептической активности, и классическая ДВП имеют общий механизм реализации [18–20, 24], поэтому дальнейшая потенциация синапсов после судорожных состояний ослаблена в результате окклюзии. Однако недавнее экспериментальное сравнение свойств синаптической пластичности, вызванной эпилептоподобной активностью и классическими индукционными протоколами, выявило ряд различий между этими процессами [88]. Кратковременное встраивание кальций-проницаемых АМРА-рецепторов необходимо для консолидации ДВП в синапсах гиппокампа, и блокада этих рецепторов нарушает экспрессию ДВП [89]. Потенциация синапсов зоны СА1 гиппокампа, вызываемая эпилептиформной активностью, наоборот, более выражена и сохраняется дольше в условиях блокады кальций-проницаемых АМРА-рецепторов [88].

Следует подчеркнуть, что изменения синаптической пластичности после эпилептических припадков очень разнообразны. В экспериментальных моделях на животных было показано как ослабление долговременной потенциации [12, 90–95], так и ее усиление [96–98]. Вероятно, различия в результатах определяются особенностями экспериментальных условий и выбора модели. Нами было показано ослабление ДВП в CA3–CA1 синапсах гиппокампа у крыс через 1, 3 и 7 дней после пентилентетразол (ПТ3)-индуцированного генерализованного эпилептического припадка [12, 95]. Кроме того, мы обнаружили ослабление долговременной синаптической депрессии [99] и ДВП в латентную [93] и хроническую [94] фазы литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии.

Нарушение ДВП, вероятно, следует связать с повреждением молекулярных механизмов индукции. Известно, что для формирования ДВП в синапсах гиппокампа необходима активация глутаматных NMDA-рецепторов [100]. Как уже подробно обсуждалось выше, эпилептическая активность изменяет не только количество NMDA-рецепторов [23], но и их функциональные свойства, которые напрямую зависят от их субъединичного состава [101].

Ряд генетических и фармакологических исследований показывают, что синаптические GluN2A-содержащие NMDA-рецепторы играют большую роль в индукции долговременной потенциации, в то время как внесинаптические GluN2B-содержащие — в индукции долговременной депрессии [101–107]. Поэтому было высказано предположение, что соотношение продукции субъединиц GluN2A и GluN2B является наиболее значимым фактором при определении знака синаптической пластичности [108] и изменение их соотношения влияет на пластичность. Наши данные согласуются с этим обобщением. Так, ослабление ДВП в синапсах CA3–CA1 гиппокампа крыс через 24 ч после генерализованного припадка, вызванного ПТЗ, сопровождалось увеличением экспрессии мРНК GluN2B субъединицы [12].

Однако другие исследователи отмечают, что как GluN2A-, так и GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы необходимы для индукции и ДВП, и долговременной депрессии [109]. Некоторые результаты однако не укладываются в это обобщение. Например, Muller с соавт. обнаружили усиление ДВП в CA3–CA1 синапсах у животных с хронической эпилепсией, которая полностью подавлялась селективным блокатором GluN2B-содержащих NMDA-рецептора (Ro 25-6981, 1 мкМ), в то время блокатор GluN2A-содержащих NMDA-рецепторов (NVP-AAM077, 50 нМ) не оказывал влияния на ДВП [98].

Нарушение пластичности может быть связано с работой метаботропных глутаматных рецепторов. Известно, что mGluR I группы располагаются на постсинаптической мембране перисинаптически [110], участвуют в выработке и длительном поддержании ДВП в синапсах [111], а также оказывают модулирующее действие на NMDA-рецепторы [112, 113]. Временная активация mGluR I группы с помощью агонистов вызывает эпилептиформные разряды в срезах гиппокампа, которые сохраняются в течение нескольких часов после отмывки [114]. В наших исследованиях в модели генерализованных ПТЗ-индуцированных эпилептических припадков мы впервые выявили смену механизма индукции ДВП с NMDAR-зависимого на обусловленный работой mGluR I группы 1 подтипа (mGluR1) [95]. Применение специфического антагониста mGluR1 (FTIDC, 5 мкМ) полностью блокировало выработку ДВП в СА3–СА1 синапсах гиппокампа у крыс через одни сутки после судорог и не влияло на индукцию ДВП в контрольных срезах и срезах через 3 и 7 дней после судорог. Эта форма синаптической пластичности не требовала активации NMDA-рецепторов, и сохранялась в присутствии их конкурентного блокатора АР-5. Ранее такая форма ДВП в поле CA1 гиппокампа, которая обусловлена лишь работой mGluRs, наблюдалась только в синапсах на интернейронах [115, 116]. Временное появление дополнительных функционально активных рецепторов mGluR1 в синапсах CA1 после судорог подтверждается биохимическими исследованиями [117, 118].

4. ГЛИЯ-НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Сейчас все большее внимание уделяется роли глия-нейрональных взаимодействий в патогенезе эпилепсии и формировании постсудорожных неврологических нарушений [119]. Эти исследования проводятся в рамках "трехчастной" или "четырехчастной" концепций строения и функционирования синапсов. Идея заключается в том, что в состав синапса помимо пре- и постсинаптических нейронов входят астроцит и микроглиальная клетка [120–122].

4.1. Участие астроцитов в патогенезе эпилепсии

Астроглия быстро реагирует на развитие судорожной активности в ЦНС. Наиболее ярким эффектом является астроглиоз – увеличение числа и размеров астроцитарных клеток, приводящее к изменению функциональных свойств астроглии [121]. Некоторые молекулярные и морфологические особенности реактивных (активированных) астроцитов рассматриваются как отличительные признаки активации астроцитов при эпилепсии [123]. Наиболее заметным признаком является повышенная экспрессия белков промежуточных филаментов, в частности, увеличение продукции глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), который является основным компонентом системы промежуточных филаментов взрослых астроцитов. Увеличение продукции GFAP рассматривается в качестве маркера развития астроглиоза [124].

Степень астроглиоза может значительно различаться, сильный астроглиоз приводит к образованию глиального рубца, закрывающего пустое пространство, образованного после гибели нейронов. Формирование астроглиального рубца является частым признаком хронической фокальной эпилепсии [121, 125]. Увеличение содержания GFAP в зонах CA1 и CA3 гиппокампа больных височной эпилепсией найдено с помощью иммуногистохимических методов [126]. Усиление продукции мPHK и/или белка GFAP также было продемонстрированы в различных моделях приобретенной эпилепсии на животных, включая каинатную [127] и литий-пилокарпиновую модель [128].

Увеличение числа астроцитарных клеток может влиять на баланс глутамата за счет участия астроцитов в контроле поглощения, деградации и рециркуляции глу-

тамата, играющего ключевую роль в эпилептогенезе [129]. Глутамат активно удаляется из синаптической щели с помощью нескольких транспортеров возбуждающих аминокислот (EAATs). Основным из них является астроцитарный транспортер EAAT2, опосредующий поглощение астроцитами около 80–90% всего глутамата, он играет одну из ключевых ролей в нейрон-глиальных взаимодействиях [130]. Нарушение обратного захвата глутамата влияет на сдвиг баланса в сторону возбуждения и способствует развитию эпилептиформной активности [131].

В исследовании, проведенном на каинатной модели, было показано, что экспрессия гена *Slc1a2*, кодирующего белок EAAT2, имеет волновую динамику: она увеличивалась через 1 день после эпилептического статуса, далее через 7 дней отмечалось снижение экспрессии и ее повторное усиление через 30 дней после судорог [127]. Кроме того, исследования на трансгенных мышах с гиперэкспрессией EAAT2 показали, что на острой стадии пилокарпин-индуцированных судорог значительного различия в степени тяжести приступа между мышами EAAT2 и мышами дикого типа не наблюдается, однако в хроническую стадию модели у генно-модифицированных мышей отмечается уменьшение спонтанных рецидивирующих судорог. Также было показано, что у трансгенных животных в острой и хронической фазах пилокарпиновой модели слабее выражена нейродегенерация [132].

Астроциты реагируют на повышение синаптической активности внутриклеточным повышением Ca²⁺, опосредованным активацией различных метаботропных и ионотропных рецепторов глутамата [129, 133]. В пилокарпиновой модели с использованием двухфотонной микроскопии *in vivo* было выявлено усиление астроцитарных кальциевых волн в коре через 3 дня после введения конвульсанта, что сопровождалось отсроченной гибелью нейронов [134]. Активация кальциевого сигналинга может способствовать высвобождению химических медиаторов, вовлеченных в эпилептогенез, включая D-серин, ATФ, глутамат, простагландины, цитокины и нейропептиды. Следствием этого является развитие нейронной гиперсинхронизации и аномальной возбудимости, а также нейродегенеративных процессов [129, 135].

Критическим и необходимым компонентом сигнального кальциевого пути в астроцитах являются инозитолтрифосфотные рецепторы второго типа (IP3R2), что было доказано в работах с животными нокаутными по гену соответствующего белка [136, 137]. Нокаутные мыши Itpr2—/— проявляют на 60% меньше эпилептиформной активности по сравнению с мышами дикого типа, что подтверждает проконвульсивную роль повышенного уровня астроцитарного Ca²⁺ [133].

Таким образом, вовлеченность астроцитов в постсудорожные изменения в мозге носит разноплановый характер. С одной стороны, активация астроглии после эпилептического статуса способствует активации обратного захвата глутамата, снижая риск гиперактивации нейронов и развития эпилептиформной активности. С другой стороны, чрезмерный астроглиоз вызывает активацию кальциевого сигналинга в астроцитах, что приводит к нарушению опосредованной глией регуляции ионов и нейромедиаторов и ведет к гипервозбудимости нервной ткани.

Существует альтернативное мнение, что основная роль астроцитов связана с нейровоспалением. Нейровоспаление — патологический процесс в нервной ткани, имеющий сходство с воспалением по основным механизмам, но характеризующийся особенностями, обусловленными иммунологической обособленностью мозга. Считается, что на короткий период нейровоспаление призвано обеспечить сохранность нейронов, однако хроническое воспаление сопровождает нейродегенеративные заболевания и, возможно, является их причиной [138, 139]. Хотя активированные астроциты высвобождают цитокины [140], основную роль в процессах нейровоспаления отводят микроглиальным клеткам и микроглия-нейрональным, микроглия-астроцитарным взаимодействиям, о чем подробнее рассказано в следующем разделе.

4.2. Участие микроглии в патогенезе эпилепсии

Активация микроглии была выявлена как у людей с эпилепсией, так и в моделях эпилепсии у животных; при этом повышенная реактивность микроглии в гиппокампе коррелирует с частотой и длительностью припадков, что может иметь диагностическую значимость [141, 142]. Детальное исследование механизмов участия микроглии в эпилептогенезе началось преимущественно в последние 10 лет, поэтому до сих пор остается открытым вопрос, оказывает ли микроглия в целом проэпилептогенное действие или, наоборот, антиэпилептогенное [143].

4.2.1. Реакция микроглии на эпилептические судороги

В моделях эпилептогенеза на животных выявлена быстрая активация микроглии в ответ на гиперактивацию нейронов [141]. Высвобождаемый во время судорог глутамат активирует нейрональные NMDA-рецепторы, что ведет к кальций-зависимому высвобождению АТФ из нейронов [144]. АТФ активирует микроглию через P2Y12-рецепторы [145], что, проявляется в виде удлинения отростков микроглии в направлении слоя пирамидных клеток гиппокампа. Это, возможно, оказывает противоэпилептическое действие, так как у мышей с нокаутом P2Y12-рецепторов после внутрибрюшинной инъекции каината припадок начинался раньше, и тяжесть и частота приступов увеличивалась, приводя, в том числе, к гибели животных [144].

Через 3 ч после введения пилокарпина наблюдается утолщение точек ветвления и отростков клеток микроглии [144]. Через 24–48 ч после введения каината или пилокарпина наблюдается гибель нейронов и увеличение сомы микроглиальных клеток и укорочение их отростков, данный фенотип больше соответствует реактивной микроглии, способной к фагоцитозу [146]. В этот же период наблюдается повышение продукции хемокина CX3CL1 [147], уровень которого снова снижается через 3 дня после судорог [148]. При этом введение антител к CX3CL1 или его рецептору снижало гибель нейронов в результате эпилептического статуса [149].

Одновременно с морфологическими изменениями микроглии происходит запуск каскадов воспалительных реакций. Во-первых, активация микроглиального рецептора P2X7 [150] способствует процессингу IL-1 β и экспрессии TNF- α . Блокада активации этого рецептора снижала микроглиоз и астроглиоз в гиппокампе мышей в каинтатной модели, а также уменьшало тяжесть спонтанных судорог [151]. С другой стороны, предполагается, что комплекс P2X7 с паннексином-1 может играть роль отрицательного модулятора судорожной активности при индукции судорог пилокарпином [152]. Во-вторых, высвобождаемый во время судорог глутамат также может непосредственно способствовать активации микроглии и продукции провоспалительных цитокинов [153]. В-третьих, ДНК погибших нейронов стимулирует микроглиальные Toll-подобные рецепторы (в частности, TLR9), способствуя высвобождению провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1b, что может способствовать подавлению аберрантного нейрогенеза [154].

В то же время избыточная активация микроглии и гиперпродукция провоспалительных цитокинов может провоцировать нарушение функций гематоэнцефалического барьера, процессов торможения и возбуждения в мозге и способствовать эпилептогенезу [155]. В частности, ТNFα способствует высвобождению глутамата из микроглии, что усиливает нейротоксические эффекты воспаления [156]. Цитокины оказывают модулирующее действие на работу синапсов [157]. Так, IL-1b через рецептор IL-1R1 может усиливать опосредованные NMDA-рецепторами токи Ca²⁺ [158], способствуя нарушению синаптической пластичности и эксайтотоксическим эффектам. Более того, IL-1b способствует снижению опосредованной ГАМК нейротрансмиссии [159]. Блокирование образования или действия IL-1b на рецептор IL-1R1 способствует снижению гибели нейронов в гиппокампе и уменьшению тяжести спонтанных судорог в хронической фазе литий-пилокарпиновой модели [160, 161]. В то же время для фебрильных судорог, характерных для раннего возраста, показано, что зависимое от микроглии изменение ГАМК-опосредованных токов способствует снижению возбудимости нейронов и смягчению судорог, следовательно, в данной модели острая активация микроглии имеет скорее нейропротекторное действие [162].

В последние годы обсуждается гипотеза наличия двух типов активации микроглии, определяющих исход патологии. Предполагается, что активация микроглии по первому типу (M1) увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов (в частности IL-1b, IL-6, TNFα), усиливает воспалительные реакции, в том числе активацию астроцитов [163]. Активация по второму типу (M2) повышает продукцию противовоспалительных факторов и репарацию тканей [164]. Попытка разграничить M1 и M2 маркеры активации микроглии у мышей в пилокарпиновой модели выявила гетерогенную активацию микроглии в мозге после эпилептического статуса [165]. В переднем мозге наблюдалось повышение продукции и тех, и других маркеров, однако в гиппокампе превалировала экспрессия маркеров M1. В каинатной модели, характеризующейся более ранним началом спонтанных судорог, у мышей выявлено преобладание продукции маркеров M1 сразу после эпилептического статуса. Однако в начале хронической фазы в обеих моделях продукция изучаемых маркеров снижалась.

Согласно результатам другой работы, воспалительные изменения микроглии не являются обязательными для эпилептогенеза, невоспалительная активация микроглии вследствие повышенной активации mTOR может тоже запускать эпилептогенез [166]. Однако у нокаутных мышей с mTOR-дефицитарной микроглией наблюдается усиленная нейродегенерация и развитие более тяжелых спонтанных судорог после эпилептического статуса, чем у контроля [167]. Таким образом, только умеренная активация микроглием микроглием товация микроглием в действие.

Фагоцитарные функции активированной микроглии могут способствовать облегчению последствий судорожного припадка, обеспечивая снижение образования новых нейронов в зубчатой извилине после эпилептического статуса, которые могут способствовать формированию аберрантных гипервозбудимых нервных цепей [168]. Фармакологическое ингибирование миноциклином активации микроглии после эпилептического статуса снижало фагоцитоз вновь образовавшихся и выживших нейронов, часто находящихся в эктопическом положении [169], и в то же время подавляло миграцию вновь образовавшихся аберрантных нейронов [170]. В каинатной модели применение миноциклина подавляло нейродегенерацию в гиппокампе [171], при этом в пилокарпиновой модели было показано не только снижение гибели нейронов в гиппокампе, но и облегчение тяжести спонтанных рецидивирующих судорог в хронической фазе модели, а также уменьшение повышенной продукции микроглией IL-1b и TNFα в гиппокампе [172].

Элиминация синапсов микроглией после судорог затрагивает не только возбуждающие синапсы, но и тормозные ГАМКергические синапсы интернейронов, что ведет к дисбалансу торможения и возбуждения в гиппокампе [173].

Важно отметить, что эпилептический припадок провоцирует значительные изменения в составе сигнальных молекул, опосредующих фагоцитоз, что меняет фагоцитарные функции микроглии [174].

4.2.2. Хроническая активация микроглии в эпилептической ткани мозга человека

Предполагается, что хроническая активация микроглии может иметь проэпилептическое действие [143, 175]. При эпилепсии, ассоциированной с глионейро-
нальной опухолью, плотность активированных клеток микроглии коррелирует с частотой припадков и длительностью эпилепсии [176]. Morin-Brureau с соавт. изучили морфологические характеристики микроглии в гиппокампах пациентов с височной эпилепсией и выявили преобладание амебоидных клеток микроглии в склеротизированном гиппокампе, то есть морфотипа реактивной микроглии. Однако встречаются также и клетки с сильным ветвлением отростков, более соответствующие форме "покоящейся" микроглии [146]. В областях с меньшим количеством нейронов (как правило, это области СА1 и СА3) встречалась преимущественно амебоидная микроглия. Однако число глиальных клеток и их форма не коррелировали с частотой приступов у пациентов. Также все морфотипы микроглиальных клеток демонстрировали отличную от нормальной реакцию на присутствие внеклеточного АДФ: отростки втягивались, в то время как в норме наоборот начинают удлиняться. Однако по другим данным, в эпилептизированных тканях мозга человека такая реакция зависит от концентрации АДФ: низкие концентрации способствуют удлинению отростков в направлении источника АДФ, опосредованное рецепторами Р2Ү12, а высокие концентрации, напротив, вызывали втягивание отростков, опосредованное рецепторами Р2У1 и Р2У13 [177]. Также в склеротизированной ткани повышена продукция рецептора CX3CR1, что может представлять собой компенсаторную реакцию для восстановления ГАМК-опосредованных токов, которые, как было показано Roseti и соавт., могут моделироваться посредством CX3CL1 [159].

Обобщая вышесказанное, можно отметить, что с одной стороны, временная активация микроглии после судорог снижает образование аберрантных связей, гибель и гиперактивацию нейронов, с другой стороны, избыточная активация микроглии может способствовать нарушению баланса возбуждения и торможения в нейронах, усугубляя нарушения синаптических функций. Остается открытым вопрос, какие из этих процессов преобладают при формировании патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние два десятилетия значительные усилия были приложены для выявления молекулярных механизмов изменений, происходящих в синапсах после эпилептической активности. Подводя итог нашему рассмотрению выявленных изменений в функционировании синапсов в ходе эпилептогенеза, следует подчеркнуть следующее. Во-первых, эпилептическая активность вносит долговременные комплексные изменения в работе всех функциональных частей синапса. Меняется вероятность выброса медиаторов, модифицируются свойства постсинаптических рецепторов, нарушается долговременная пластичность синаптической передачи. Все это сопровождается анатомическими и функциональными изменениями со стороны глиальных клеток. Всеохватность и масштабность таких изменений, к сожалению, не позволяет однозначно выявить причинно-следственные связи между этими событиями и указать, какие изменения изначально носят компенсаторный характер, а появление каких приведет впоследствии к усилению и закреплению патологической активности в нервных сетях. Поэтому выявить одну универсальную мишень для приложения наиболее эффективного терапевтического воздействия с целью остановки эпилептогенеза сейчас представляется маловероятным. Скорее следует думать о комплексном воздействии на нейронные сети, позволяющем максимально снизить их активность, предотвратить избыточную нейровоспалительную реакцию.

Во-вторых, многие из наблюдаемых изменения имеют сложный волновой характер. Например, встраивание кальций-проницаемых AMPA-рецепторов или GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов наблюдается неоднократно на разных сроках, как это было описано нами выше. Вероятно, что эффекты от активации этих рецепторов в различные периоды после эпилептической активности могут сильно различаться. Можно предположить, что быстрое кратковременное встраивание кальций-проницаемых АМРА-рецепторов во время судорог может вести к дополнительной активации кальций-зависимой калиевых каналов и на коротком промежутке времени снижать возбудимость нейронов, оказывая таким образом противоэпилептическое действие. Однако более позднее встраивание и длительное присутствие кальций-проницаемых АМРА-рецепторов будет вести к нарушениям кальциевого сигналинга в нейроне, что в свою очередь может стать причиной его гибели.

Волновая природа изменений экспрессии многих значимых для нормального функционирования синапса молекул указывает нам также на то, что фармакологическое воздействие должно производиться в строго определенный период, так как раньше или позднее срока нарушенной экспрессии оно может оказаться бесполезным или даже вредным. Вероятно, что этим объясняются противоречивые данные об антиэпилептогенном эффекте антагонистов кальций-проницаемых AMPA-рецепторов или GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов.

Масштабность и сложная временная динамика выявляемых изменений в синапсе в ходе эпилептогенеза делают необходимым проведение дальнейших детальных исследований с анализом активации различных сигнальных путей в нейронах и глиальных клетках на различных моделях эпилептогенеза. Центральными задачами по-прежнему остаются установление причинно-следственных связей между происходящими изменениями в функционировании синапсов во время и после эпилептической активности, а также выявление тех критических механизмов, которые запускают эпилептизацию мозга и ведут к развитию спонтанной судорожной активности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась за счет средств госбюджета в рамках программы исследований ИЭФБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание разделов: Введение (А.В.З., Л.Г.М.), Пресинаптические изменения (Ю.Л.Е.), Постсинаптические изменения (Д.В.А.), Долговременная пластичность (Т.Ю.П., Г.П.Д.), Глия-нейрональные взаимодействия (А.В.Д. и М.В.З.), Заключение и редактирование всех разделов статьи (А.В.З., Л.Г.М.). Рисунок выполнен А.В.Д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Chin J.H., Vora N.* (2014) The global burden of neurologic diseases. Neurology. 83: 349–351. https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000610
- Laxer K.D., Trinka E., Hirsch L.J., Cendes F., Langfitt J., Delanty N., Resnick T., Benbadis S.R. (2014) The consequences of refractory epilepsy and its treatment. Epilepsy. Behav. 37: 59–70. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.05.031
- Pitkänen A., Lukasiuk K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. Lancet Neurol. 10: 173–186. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0

- Goldberg E.M., Coulter D.A. (2013) Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. Nat. Rev. Neurosci. 14: 337–349. https://doi.org/10.1038/nrn3482
- Ben-Ari Y. (2008) Epilepsies and neuronal plasticity: for better or for worse? Dialogues Clin. Neurosci. 10: 17–27. https://doi.org/10.31887/DCNS.2008.10.1/ybenari
- Avoli M., Louvel J., Pumain R., Köhling R. (2005) Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. Prog. Neurobiol. 77: 166–200. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.006
- 7. *Epsztein J., Milh M., Bihi R.I., Jorquera I., Ben-Ari Y., Represa A., Crépel V.* (2006) Ongoing epileptiform activity in the post-ischemic hippocampus is associated with a permanent shift of the excitatory-inhibitory synaptic balance in CA3 pyramidal neurons. J. Neurosci. 26: 7082–7092.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1666-06.2006

- Graebenitz S., Lesting J., Sosulina L., Seidenbecher T., Pape H.C. (2010) Alteration of NMDA receptor-mediated synaptic interactions in the lateral amygdala associated with seizure activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 51: 1754–1762. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02561.x
- Clarkson C., Smeal R.M., Hasenoehrl M.G., White J.A., Rubio M.E., Wilcox K.S. (2020) Ultrastructural and functional changes at the tripartite synapse during epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. Exp. Neurol. 326: 113196. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113196
- Yang J., Woodhall G.L., Jones R.S.G. (2006) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. J. Neurosci. 26: 406–410. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4413-05.2006
- Thompson S.E., Ayman G., Woodhall G.L., Jones R.S.G. (2006) Depression of Glutamate and GABA Release by Presynaptic GABA_B Receptors in the Entorhinal Cortex in Normal and Chronically Epileptic Rats. Neurosignals. 15: 202–215. https://doi.org/10.1159/000098515
- Postnikova T.Y., Zubareva O.E., Kovalenko A.A., Kim K.K., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2017) Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. Biochemistry (Moscow). 82: 282–290. https://doi.org/10.1134/S0006297917030063
- Postnikova T.Y, Amakhin D.V., Trofimova A.M., Smolensky I.V., Zaitsev A.V. (2019) Changes in Functional Properties of Rat Hippocampal Neurons Following Pentylenetetrazole-induced Status Epilepticus. Neuroscience. 399: 103–116. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.029
- Li S., Reinprecht I., Fahnestock M., Racine R. (2002) Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex, and entorhinal cortex of the rat. Neuroscience. 115: 1221–1229. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00485-2
- 15. Murthy V.N., Sejnowski T.J., Stevens C.F. (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. Neuron. 18: 599–612. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80301-3
- Upreti C., Otero R., Partida C., Skinner F., Thakker R., Pacheco L.F., Zhou Z., Maglakelidze G., Velíšková J., Velíšek L., Romanovicz D., Jones T., Stanton P.K., Garrido-Sanabria E. R (2012) Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Brain. 135: 869–885. https://doi.org/10.1093/brain/awr341
- Soussi R., Boulland J.L., Bassot E., Bras H., Coulon P., Chaudhry F.A., Storm-Mathisen J., Ferhat L., Esclapez M. (2015) Reorganization of supramammillary-hippocampal pathways in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: evidence for axon terminal sprouting. Brain Struct. Funct. 220: 2449–2468. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0800-2
- Abegg M.H., Savic N., Ehrengruber M.U., McKinney R.A., Gähwiler B.H. (2004) Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. J. Physiol. 554: 439–448. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.052662
- 19. Debanne D., Thompson S.M., Gähwiler B.H. (2006) A brief period of epileptiform activity strengthens excitatory synapses in the rat hippocampus in vitro. Epilepsia. 47: 247–256. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00416.x
- Joshi S., Rajasekaran K., Sun H., Williamson J., Kapur J. (2017) Enhanced AMPA receptormediated neurotransmission on CA1 pyramidal neurons during status epilepticus. Neurobiol. Dis. 103: 45–53. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.017

- Rajasekaran K., Todorovic M., Kapur J. (2012) Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus. Ann. Neurol. 72: 91–102. https://doi.org/10.1002/ana.23570
- Naylor D.E., Liu H., Niquet J., Wasterlain C.G. (2013) Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. Neurobiol. Dis. 54: 225–238.
 https://doi.org/10.1016/j.phd.2012.12.015
 - https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.015
- Wasterlain C.G., Naylor D.E., Liu H., Niquet J., Baldwin R. (2013) Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: Therapeutic implications. Epilepsia. 54: 78–80. https://doi.org/10.1111/epi.12285
- Amakhin D.V., Soboleva E.B., Ergina J.L., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. (2018) Seizure-Induced Potentiation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Entorhinal Cortex. Front. Cell Neurosci. 12: 486. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00486
- Rajasekaran K., Joshi S., Kozhemyakin M., Todorovic M.S., Kowalski S., Balint C., Kapur J. (2013) Receptor trafficking hypothesis revisited: Plasticity of AMPA receptors during established status epilepticus. Epilepsia. 54: 14–16. https://doi.org/10.1111/epi.12266
- Joshi S., Kapur J. (2018) Mechanisms of status epilepticus: α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolepropionic acid receptor hypothesis. Epilepsia. 59: 71–81. https://doi.org/10.1111/epi.14482
- Doyon N., Vinay L., Prescott S.A., De Koninck Y. (2016) Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. Neuron. 89: 1157–1172. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.030
- Glykys J., Dzhala V., Egawa K., Balena T., Saponjian Y., Kuchibhotla K.V., Bacskai B.J., Kahle K.T., Zeuthen T., Staley K.J. (2014) Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. Science. 343: 670–675. https://doi.org/10.1126/science.1245423
- Raimondo J.V., Burman R.J., Katz A.A., Akerman C.J. (2015) Ion dynamics during seizures. Front. Cell Neurosci. 9: 1–14. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00419
- Lillis K.P., Kramer M.A., Mertz J., Staley K.J., White J.A. (2012) Pyramidal cells accumulate chloride at seizure onset. Neurobiol. Dis. 47: 358–366. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.016
- Fujiwara-Tsukamoto Y., Isomura Y., Nambu A., Takada M. (2003) Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience. 119: 265–75. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00102-7
- Librizzi L., Losi G., Marcon I., Sessolo M., Scalmani P., Carmignoto G., de Curtis M. (2017) Interneuronal Network Activity at the Onset of Seizure-Like Events in Entorhinal Cortex Slices. J. Neurosci. 37: 10398–10407. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3906-16.2017
- Burman R.J., Selfe J.S., Lee J.H., van den Berg M., Calin A., Codadu N.K., Wright R., Newey S.E., Parrish R.R., Katz A.A., Wilmshurst J.M., Akerman C.J., Trevelyan A.J., Raimondo J.V. (2019) Excitatory GABAergic signalling is associated with benzodiazepine resistance in status epilepticus. Brain. 142: 3482–3501.
 https://doi.org/10.1093/brain/gwg283
- https://doi.org/10.1093/brain/awz283
- Gibbs J.W., Sombati S., Delorenzo R.J., Coulter D.A. (1997) Physiological and Pharmacological Alterations in Postsynaptic GABAA Receptor Function in a Hippocampal Culture Model of Chronic Spontaneous Seizures. J. Neurophysiol. 77: 2139–2152. https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.4.2139
- Joshi S., Rajasekaran K., Hawk K.M., Brar J., Ross B.M., Tran C.A., Chester S.J., Goodkin H.P. (2015) Phosphatase inhibition prevents the activity-dependent trafficking of GABAA receptors during status epilepticus in the young animal. Epilepsia. 56: 1355–1365. https://doi.org/10.1111/epi.13098
- Goodkin H.P., Joshi S., Mtchedlishvili Z., Brar J., Kapur J. (2008) Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. J. Neurosci. 28: 2527–2538. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3426-07.2008
- Goodkin H.P. (2005) Status Epilepticus Increases the Intracellular Accumulation of GABAA Receptors. J. Neurosci. 25: 5511–5520. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-05.2005
- Erreger K., Geballe M.T., Kristensen A., Chen P.E., Hansen K.B., Lee C.J., Yuan H., Le P., Lyuboslavsky P.N., Micale N., Jørgensen L., Clausen R.P., Wyllie D.J.A., Snyder J.P., Traynelis S.F. (2007) Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. Mol. Pharmacol. 72: 907–920. https://doi.org/10.1124/mol.107.037333

 Chen Q., He S., Hu X.L., Yu J., Zhou Y., Zheng J., Zhang S., Zhang C., Duan W.H., Xiong Z.Q. (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. J. Neurosci. 27: 542–552.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007

 Amakhin D.V., Malkin S.L., Ergina J.L., Kryukov K.A., Veniaminova E.A., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. (2017) Alterations in Properties of Glutamatergic Transmission in the Temporal Cortex and Hippocampus Following Pilocarpine-Induced Acute Seizures in Wistar Rats. Front. Cell Neurosci. 11 :264.

https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00264

- Di Maio R., Mastroberardino P.G., Hu X., Montero L., Greenamyre J.T. (2011) Pilocapine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. Neurobiol. Dis. 42: 482–495. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.012
- 42. Di Maio R., Mastroberardino P.G., Hu X., Montero L.M., Greenamyre J.T. (2013) Thiol oxidation and altered NR2B/NMDA receptor functions in in vitro and in vivo pilocarpine models: Implications for epileptogenesis. Neurobiol. Dis. 49: 87–98. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.07.013
- 43. Zhu X., Dong J., Shen K., Bai Y., Zhang Y., Lv X., Chao J., Yao H. (2015) NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. Brain Res. Bull. 114: 70–78. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.04.002
- 44. Chen B., Feng B., Tang Y., You Y., Wang Y., Hou W., Hu W., Chen Z. (2016) Blocking GluN2B subunits reverses the enhanced seizure susceptibility after prolonged febrile seizures with a wide therapeutic time-window. Exp. Neurol. 283: 29–38. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.034
- Frasca A., Aalbers M., Frigerio F., Fiordaliso F., Salio M., Gobbi M., Cagnotto A., Gardoni F., Battaglia G.S., Hoogland G., Di Luca M., Vezzani A. (2011) Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity. Neurobiol. Dis. 43: 507–515. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.024
- 46. Isaac J. T.R., Ashby M.C., McBain C.J. (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. Neuron. 54: 859–871. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001
- 47. Geiger J.R.P., Melcher T., Koh D.S., Sakmann B., Seeburg P.H., Jonas P., Monyer H. (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron. 15: 193–204. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90076-4
- Kumar S.S., Bacci A., Kharazia V., Huguenard J.R. (2002) A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons. J. Neurosci. 22: 3005–3015. https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-08-03005.2002
- Henley J.M., Wilkinson K.A. (2016) Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. 17: 337–350. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37
- Grooms S.Y. (2000) Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 3631–3636. https://doi.org/10.1073/pnas.050586497
- Sommer C., Roth S.U., Kiessling M. (2001) Kainate-induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 and AMPA receptor binding protein in the rat hippocampus. Acta Neuropathol. 101: 460–468. https://doi.org/10.1007/s004010000310
- 52. Sanchez R.M., Koh S., Rio C., Wang C., Lamperti E.D., Sharma D., Corfas G., Jensen F.E. (2001) Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. J. Neurosci. 21: 8154–8163. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-20-08154.2001
- 53. Friedman L.K. (1998) Selective reduction of GluR2 protein in adult hippocampal CA3 neurons following status epilepticus but prior to cell loss. Hippocampus. 8: 511–525. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:5<511::AID-HIPO9>3.0.CO;2-W
- 54. Malkin S.L., Amakhin D.V., Veniaminova E.A., Kim K.K., Zubareva O.E., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2016) Changes of ampa receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. Neuroscience. 327: 146–155. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024
- 55. *Pellegrini-Giampietro D.E., Gorter J.A., Bennett M.V.L., Zukin R.S.* (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. Trends Neurosci. 20: 464–470. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01100-4

- Hu Y., Jiang L., Chen H., Zhang X.P. (2012) Expression of AMPA receptor subunits in hippocampus after status convulsion. Child's Nerv. Syst. 28: 911–918. https://doi.org/10.1007/s00381-012-1747-3
- 57. Russo I., Bonini D., Via L.La, Barlati S., Barbon A. (2013) AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuromol. Med. 15: 324–338. https://doi.org/10.1007/s12017-013-8221-6
 - https://doi.org/10.100//s1201/-013-8221-6
- Zaitsev A.V., Kim K.K, Frolova E.V., Lavrent'eva V.V., Lukomskaya N.Y., Magazanik L.G. (2014) Anticonvulsant activities of antagonists of NMDA and calcium-permeable AMPA receptors in a model of maximum electroshock in rats. Neurochem. J. 8: 301–305. https://doi.org/10.1134/S1819712414040138
- 59. Szczurowska E., Mares P. (2015) An antagonist of calcium permeable AMPA receptors, IEM1460: Anticonvulsant action in immature rats? Epilepsy Res. 109: 106–113. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.10.020
- Szczurowska E., Mareš P. (2013) NMDA and AMPA receptors: Development and status epilepticus. Physiol. Res. 62: 21–38. https://doi.org/10.33549/physiolres.932662
- Konen L.M., Wright A.L., Royle G.A., Morris G.P., Lau B.K., Seow P.W., Zinn R., Milham L.T., Vaughan C.W., Vissel B. (2020) A new mouse line with reduced GluA2 Q/R site RNA editing exhibits loss of dendritic spines, hippocampal CA1-neuron loss, learning and memory impairments and NMDA receptor-independent seizure vulnerability. Mol. Brain. 13: 27. https://doi.org/10.1186/s13041-020-0545-1
- Rakhade S.N., Zhou C., Aujla P.K., Fishman R., Sucher N.J., Jensen F.E. (2008) Early Alterations of AMPA Receptors Mediate Synaptic Potentiation Induced by Neonatal Seizures. J. Neurosci. 28: 7979–7990. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1734-08.2008
- Lippman-Bell J.J., Rakhade S.N., Klein P.M., Obeid M., Jackson M.C., Joseph A., Jensen F.E. (2013) AMPA Receptor antagonist NBQX attenuates later-life epileptic seizures and autisticlike social deficits following neonatal seizures. Epilepsia. 54: 1922–1932. https://doi.org/10.1111/epi.12378
- 64. Krestel H.E., Shimshek D.R., Jensen V., Nevian T., Kim J., Geng Y., Bast T., Depaulis A., Schonig K., Schwenk F., Bujard H., Hvalby Ø., Sprengel R., Seeburg P.H. (2004) A Genetic Switch for Epilepsy in Adult Mice. J. Neurosci. 24: 10568–10578. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4579-03.2004
- 65. Brusa R., Zimmermann F., Koh D.-S., Feldmeyer D., Gass P., Seeburg P.H., Sprengel R. (1995) Early-Onset Epilepsy and Postnatal Lethality Associated with an Editing-Deficient GluR-B Allele in Mice. Science. 270: 1677–1680. https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1677
- Lorgen J.-Ø., Egbenya D.L., Hammer J., Davanger S. (2017) PICK1 facilitates lasting reduction in GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy. Epilepsy Res. 137: 25–32. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.08.012
- 67. Pirker S., Schwarzer C., Czech T., Baumgartner C., Pockberger H., Maier H., Hauer B., Sieghart W., Furtinger S., Sperk G. (2003) Increased Expression of GABA A Receptor β-Subunits in the Hippocampus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62: 820–834. https://doi.org/10.1093/inep/62.8.820
 - https://doi.org/10.1093/jnen/62.8.820
- Loup F., Wieser H.-G., Yonekawa Y., Aguzzi A., Fritschy J.-M. (2000) Selective Alterations in GABA A Receptor Subtypes in Human Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 20: 5401–5419. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05401.2000
- Loddenkemper T., Talos D.M., Cleary R.T., Joseph A., Sánchez Fernández I., Alexopoulos A., Kotagal P., Najm I., Jensen F.E. (2014) Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. Epilepsy Res. 108: 605–615. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.01.015
- Mathern G.W., Pretorius J.K., Kornblum H.I., Mendoza D., Lozada A., Leite J.P., Chimelli L.M.C., Fried I., Sakamoto A.C., Assirati J.A., Lévesque M.F., Adelson P.D., Peacock W.J. (1997) Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. Brain. 120: 1937–1959.
 https://doi.org/10.1003/hrain/120.11.1027
 - https://doi.org/10.1093/brain/120.11.1937
- Talos D.M., Kwiatkowski D.J., Cordero K., Black P.M., Jensen F.E. (2008) Cell-specific alterations of glutamate receptor expression in tuberous sclerosis complex cortical tubers. Ann. Neurol. 63 :454–465. https://doi.org/10.1002/ana.21342
- 72. Sánchez Fernández I., Loddenkemper T. (2014) Subunit Composition of Neurotransmitter Receptors in the Immature and in the Epileptic Brain. Biomed. Res. Int. 2014: 1–11. https://doi.org/10.1155/2014/301950

- Möddel G., Jacobson B., Ying Z., Janigro D., Bingaman W., González-Martínez J., Kellinghaus C., Prayson R.A., Najm I.M. (2005) The NMDA receptor NR2B subunit contributes to epileptogenesis in human cortical dysplasia. Brain Res. 1046: 10–23. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.042
- 74. Klatte K., Kirschstein T., Otte D., Pothmann L., Müller L., Tokay T., Kober M., Uebachs M., Zimmer A., Beck H. (2013) Impaired D-serine-mediated cotransmission mediates cognitive dysfunction in epilepsy. J. Neurosci. 33: 13066–13080. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5423-12.2013
- Egbenya D.L., Hussain S., Lai Y.-C., Xia J., Anderson A.E., Davanger S. (2018) Changes in synaptic AMPA receptor concentration and composition in chronic temporal lobe epilepsy. Mol. Cell Neurosci. 92: 93–103. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.004
- 76. Kitaura H., Sonoda M., Teramoto S., Shirozu H., Shimizu H., Kimura T., Masuda H., Ito Y., Takahashi H., Kwak S., Kameyama S., Kakita A. (2017) Ca 2+ -permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. Epilepsia. 58: e59–e63. https://doi.org/10.1111/epi.13700
- 77. Prince H.C., Tzingounis A.V., Levey A.I., Conn P.J. (2000) Functional downregulation of GluR2 in piriform cortex of kindled animals. Synapse. 38: 489–498. https://doi.org/10.1002/1098-2396(20001215)38:4<489::AID-SYN15>3.0.CO;2-N
- Brooks-Kayal A.R., Pritchett D.B. (1993) Developmental changes in human gamma-aminobutyric acidA receptor subunit composition. Ann. Neurol. 34: 687–693. https://doi.org/10.1002/ana.410340511
- Poulter M.O., Brown L.A., Tynan S., Willick G., William R., McIntyre D.C. (1999) Differential Expression of α 1, α 2, α 3, and α 5 GABA A Receptor Subunits in Seizure-Prone and Seizure-Resistant Rat Models of Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 19: 4654–4661. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04654.1999
- Galanopoulou A.S., Moshé S.L. (2014) Does Epilepsy Cause a Reversion to Immature Function? Adv. Exp. Med. Biol. 813: 195–209. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1 16
- Citri A., Malenka R.C. (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. Neuropsychopharmacology. 33: 18–41. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559
- Lepeta K., Lourenco M.V., Schweitzer B.C., Martino Adami P.V., Banerjee P., Catuara-Solarz S., de La Fuente Revenga M., Guillem A.M., Haidar M., Ijomone O.M., Nadorp B., Qi L., Perera N.D., Refsgaard L.K., Reid K.M., Sabbar M., Sahoo A, Schaefer N., Sheean R.K., Suska A., Verma R., Vicidomini C., Wright D., Zhang X.-D., Seidenbecher C. (2016) Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students. J. Neurochem. 138: 785–805. https://doi.org/10.1111/jnc.13713
- Bliss T.V.P., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 361: 31–39. https://doi.org/10.1038/361031a0
- Neves G., Cooke S.F., Bliss T.V.P. (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. Nat. Rev. Neurosci. 9: 65–75. https://doi.org/10.1038/nrn2303
- Brown T.H., Chapman P.F., Kairiss E.W., Keenan C.L. (1988) Long-term synaptic potentiation. Science. 242: 724–728. https://doi.org/10.1126/science.2903551
- Shah P., Bassett D.S., Wisse L.E.M., Detre J.A., Stein J.M., Yushkevich P.A., Shinohara R.T., Pluta J.B., Valenciano E., Daffner M., Wolk D.A., Elliott M.A., Litt B., Davis K.A., Das S.R. (2018) Mapping the structural and functional network architecture of the medial temporal lobe using 7T MRI. Hum. Brain Mapp. 39: 851–865. https://doi.org/10.1002/hbm.23887
- Mathern G.W., Adelson P.D., Cahan L.D, Leite J.P. (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. Prog. Brain. Res. 135: 237–51. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)35023-4
- Postnikova T.Y., Amakhin D.V., Trofimova A.M., Zaitsev A.V. (2020) Calcium-permeable AMPA receptors are essential to the synaptic plasticity induced by epileptiform activity in rat hippocampal slices. Biochem. Biophys. Res. Commun. 529: 1145–1150. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.121
- Plant K., Pelkey K.A., Bortolotto Z.A., Morita D., Terashima A., McBain C.J., Collingridge G.L., Isaac J. T.R. (2006) Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. Nat. Neurosci. 9: 602–604. https://doi.org/10.1038/nn1678
- 90. Zhou J.-L., Shatskikh T.N., Liu X., Holmes G.L. (2007) Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. Eur. J. Neurosci.

25: 3667-77.

https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05598.x

- Suárez L.M., Cid E., Gal B., Inostroza M., Brotons-Mas J.R., Gómez-Domínguez D., de la Prida L.M., Solís J.M. (2012) Systemic Injection of Kainic Acid Differently Affects LTP Magnitude Depending on its Epileptogenic Efficiency. PLoS One. 7: e48128. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048128
- Cunha A.O.S., de Oliveira J.A.C., Almeida S.S., Garcia-Cairasco N., Leão R.M. (2015) Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. Neuroscience. 310: 114–127. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.040
- 93. Kryukov K.A., Kim K.K., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2016) Status epilepticus alters hippocampal long-term synaptic potentiation in a rat lithium-pilocarpine model. Neuroreport. 27: 1191–1195. https://doi.org/10.1097/WNR.00000000000656
- 94. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Rusakov D.A., Semyanov A. (2018) Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat. Hippocampus. Front. Mol. Neurosci. 11: 215.

https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00215

- 95. Postnikova T.Y., Trofimova A.M., Ergina J.L., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Zaitsev A.V. (2019) Transient Switching of NMDA-Dependent Long-Term Synaptic Potentiation in CA3– CA1 Hippocampal Synapses to mGluR1-Dependent Potentiation After Pentylenetetrazole-Induced Acute Seizures in Young Rats. Cell Mol. Neurobiol. 39: 287–300. https://doi.org/10.1007/s10571-018-00647-3
- 96. Guli X., Tokay T., Kirschstein T., Köhling R. (2016) Status Epilepticus Enhances Depotentiation after Fully Established LTP in an NMDAR-Dependent but GluN2B-Independent Manner. Neural. Plast. 2016: 6592038. https://doi.org/10.1155/2016/6592038
- 97. O'Leary H., Bernard P.B., Castano A.M., Benke T.A. (2016) Enhanced long term potentiation and decreased AMPA receptor desensitization in the acute period following a single kainate induced early life seizure. Neurobiol. Dis. 87: 134–144. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.005
- Müller L., Tokay T., Porath K., Köhling R., Kirschstein T. (2013) Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B. Neurobiol. Dis. 54: 183–193. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.011
- Ivanov A.D., Zaitsev A.V. (2017) NMDAR-independent hippocampal long-term depression impairment after status epilepticus in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Synapse. 71: e21982.
 https://doi.org/10.1002/cm.21082
 - https://doi.org/10.1002/syn.21982
- 100. Barria A., Malinow R. (2005) NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. Neuron. 48: 289–301. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.034
- 101. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. 14: 383–400. https://doi.org/10.1038/nrn3504
- 102. Parsons M.P., Raymond L.A. (2014) Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. Neuron. 82: 279–93. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.030
- 103. Franchini L., Carrano N., Di Luca M., Gardoni F. (2020) Synaptic GluN2A-Containing NMDA Receptors: From Physiology to Pathological Synaptic Plasticity. Int. J. Mol. Sci. 21: 1538. https://doi.org/10.3390/ijms21041538
- 104. Li R., Huang F.S., Abbas A.K., Wigström H. (2007) Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. BMC Neurosci. 8: 55. https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-55
- 105. Liu L., Wong T.P., Pozza M.F., Lingenhoehl K., Wang Y.T., Sheng M., Auberson Y.P., Wang Y.T. (2004) Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. Science. 304: 1021–1024. https://doi.org/10.1126/science.1096615
- 106. Massey P.V., Johnson B.E., Moult P.R., Auberson Y.P., Brown M.W., Molnar E., Collingridge G.L., Bashir Z.I. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. J. Neurosci. 24: 7821–7828. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004
- 107. Bartlett T.E., Bannister N.J., Collett V.J., Dargan S.L., Massey P.V., Bortolotto Z.A., Fitzjohn S.M., Bashir Z.I., Collingridge G.L., Lodge D. (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus.

Neuropharmacology. 52: 60–70.

https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.013

- 108. Xu Z., Chen R.Q., Gu Q.H., Yan J.Z., Wang S.H., Liu S.Y., Lu W. (2009) Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. J. Neurosci. 29: 8764–8773. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1014-09.2009
- 109. Fox C.J., Russell K.I., Wang Y.T., Christie B.R. (2006) Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. Hippocampus. 16: 907–915. https://doi.org/10.1002/hipo.20230
- Scheefhals N., MacGillavry H.D. (2018) Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. Mol.Cell Neurosci. 91: 82–94. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.05.002
- Any V. (2009) Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. Neuropharmacology. 56: 735–740. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.002
- O'neill N., McLaughlin C., Komiyama N., Sylantyev S. (2018) Biphasic modulation of NMDA receptor function by metabotropic glutamate receptors. J. Neurosci. 38: 9840–9855. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1000-18.2018
- 113. Lai T.K.Y., Zhai D., Su P., Jiang A., Boychuk J., Liu F. (2019) The receptor-receptor interaction between mGluR1 receptor and NMDA receptor: a potential therapeutic target for protection against ischemic stroke. FASEB J. 33: 14423–14439. https://doi.org/10.1096/fj.201900417R
- Merlin L.R., Wong R.K.S. (1997) Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. J. Neurophysiol. 78: 539–544. https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.1.539
- 115. Lapointe V., Morin F., Ratté S., Croce A., Conquet F., Lacaille J.C. (2004) Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurones regulates mouse hippocampal inhibition. J. Physiol. 555: 125–135. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053603
- 116. Perez Y, Morin F, Lacaille J.C. (2001) A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9401– 9406.

https://doi.org/10.1073/pnas.161493498

 Akbar M. T., Rattray M., Powell J.F., Meldrum B.S. (1996) Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. Mol. Brain. Res. 43: 105–116.

https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00162-3

- 118. Blümcke I., Suter B., Behle K., Kuhn R., Schramm J., Elger C.E., Wiestler O.D. (2000) Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. Epilepsia. 41. Suppl 6: S174–180. https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01577.x
- 119. Vizuete A.F.K., Hansen F., Negri E., Leite M.C., de Oliveira D.L, Gonçalves C.-A. (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. J. Neuroinflam. 15: 68. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1109-5
- 120. Stogsdill J.A., Eroglu C. (2017) The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. Curr. Opin. Neurobiol. 42: 1–8. https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.09.016
- 121. Patel D.C., Tewari B.P., Chaunsali L., Sontheimer H. (2019) Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. Nat. Rev. Neurosci. 20: 282–297. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0126-4
- 122. Croft W., Dobson K.L., Bellamy T.C. (2015) Plasticity of Neuron-Glial Transmission: Equipping Glia for Long-Term Integration of Network Activity. Neural. Plast. 2015: 765792. https://doi.org/10.1155/2015/765792
- 123. *Hol E.M., Pekny M.* (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. Curr. Opin. Cell Biol. 32: 121–130. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004
- 124. Sofroniew M.V., Vinters H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 119: 7–35.
 - https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8
- 125. Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neurosci. Lett 565: 30–38. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071
 - https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071
- 126. Kandratavicius L., Peixoto-Santos J.E., Monteiro M.R., Scandiuzzi R.C., Carlotti C.G., Assirati J.A., Hallak J.E., Leite J.P. (2015) Mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities: A place

for differential neuroinflammatory interplay. J. Neuroinflam. 12: 1–12. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0266-z

- 127. *Hubbard J.A., Szu J.I., Yonan J.M., Binder D.K.* (2016) Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. Exp. Neurol. 283: 85–96.
 - https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.003
- 128. Rossi A.R., Angelo M.F., Villarreal A., Lukin J., Ramos A.J. (2013) Gabapentin Administration Reduces Reactive Gliosis and Neurodegeneration after Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. PLoS One. 8: e78516. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078516
- Steinhäuser C., Grunnet M., Carmignoto G. (2016) Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. Neuroscience. 323: 157–169. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.047
- 130. Zaitsev A.V., Smolensky I.V., Jorratt P., Ovsepian S.V. (2020) Neurobiology, Functions, and Relevance of Excitatory AminoAcid Transporters (EAATs) to Treatment of Refractory Epilepsy. CNS Drugs. 34: 1089–1103. https://doi.org/10.1007/s40263-020-00764-y
- 131. *Boison D., Steinhäuser C.* (2018) Epilepsy and astrocyte energy metabolism. Glia 66: 1235–1243. https://doi.org/10.1002/glia.23247
- 132. Kong Q., Takahashi K., Schulte D., Stouffer N., Lin Y., Lin C.-L.G. (2012) Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces epileptogenic processes following pilocarpineinduced status epilepticus. Neurobiol. Dis. 47: 145–154. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.032
- 133. Heuser K., Nome C.G., Pettersen K.H., Åbjørsbråten K.S., Jensen V., Tang W., Sprengel R., Taubøll E., Nagelhus E.A., Enger R. (2018) Ca²⁺ Signals in Astrocytes Facilitate Spread of Epileptiform Activity. Cereb. Cortex 28: 4036–4048. https://doi.org/10.1093/cercor/bhy196
- 134. Ding S., Fellin T., Zhu Y., Lee S.-Y., Auberson Y.P., Meaney D.F., Coulter D.A., Carmignoto G., Haydon P.G. (2007) Enhanced Astrocytic Ca2+ Signals Contribute to Neuronal Excitotoxicity after Status Epilepticus. J. Neurosci. 27: 10674–10684. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2001-07.2007
- 135. Wetherington J., Serrano G., Dingledine R. (2008) Astrocytes in the Epileptic Brain. Neuron
- 136. Eilert-Olsen M., Hjukse J.B., Thoren A.E., Tang W., Enger R., Jensen V., Pettersen K.H., Nagelhus E.A. (2019) Astroglial endfeet exhibit distinct Ca²⁺ signals during hypoosmotic conditions. Glia. 67: 2399–2409. https://doi.org/10.1002/glia.23692
- 137. Petravicz J., Boyt K.M., McCarthy K.D. (2014) Astrocyte IP3R2-dependent Ca2+ signaling is not a major modulator of neuronal pathways governing behavior. Front. Behav. Neurosci. 8: 384. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00384
- Bazan N.G. (2012) Neuroinflammation and proteostasis are modulated by endogenously biosynthesized neuroprotectin D1. Mol. Neurobiol. 46: 221–226. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8322-5
- Skaper S.D. (2007) The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. Ann. N Y Acad. Sci. 1122: 23–34. https://doi.org/10.1196/annals.1403.002
- 140. Devinsky O., Vezzani A., Najjar S., De Lanerolle N.C., Rogawski M.A. (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. Trends Neurosci. 36: 174–184. https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008
- 141. *Hiragi T., Ikegaya Y., Koyama R.* (2018) Microglia after Seizures and in Epilepsy. Cells. 7: 26. https://doi.org/10.3390/cells7040026
- 142. Kagitani-Shimono K., Kato H., Kuwayama R., Tominaga K., Nabatame S., Kishima H., Hatazawa J., Taniike M. (2021) Clinical evaluation of neuroinflammation in child-onset focal epilepsy: a translocator protein PET study. J. Neuroinflam. 18: 8. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02055-1
- 143. *Kinoshita S., Koyama R.* (2021) Pro- and anti-epileptic roles of microglia. Neural Regen. Res. 16: 1369.
 - https://doi.org/10.4103/1673-5374.300976
- 144. Eyo U.B., Peng J., Swiatkowski P., Mukherjee A., Bispo A., Wu L.-J. (2014) Neuronal Hyperactivity Recruits Microglial Processes via Neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y12 Receptors after Status Epilepticus. J. Neurosci. 34: 10528–10540. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014
- 145. Kumaria A., Tolias C.M., Burnstock G. (2008) ATP signalling in epilepsy. Purinergic Signal. 4: 339–346. https://doi.org/10.1007/s11302-008-9115-1

- 146. Morin-Brureau M., Milior G., Royer J., Chali F., Le Duigou C., Savary E., Blugeon C., Jourdren L., Akbar D., Dupont S., Navarro V., Baulac M., Bielle F., Mathon B., Clemenceau S., Miles R. (2018) Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe. Brain. 141: 3343–3360. https://doi.org/10.1093/brain/awy276
- 147. Ransohoff R.M. (2009) Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. Immunity. 31: 711–721. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.010
- 148. Yeo S.-I., Kim J.-E., Ryu H.J., Seo C.H., Lee B.C., Choi I.-G., Kim D.-S., Kang T.-C. (2011) The roles of fractalkine/CX3CR1 system in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus. J. Neuroimmunol. 234:93–102. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.03.005
- 149. Ueno M., Fujita Y., Tanaka T., Nakamura Y., Kikuta J., Ishii M., Yamashita T. (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. Nat. Neurosci. 16: 543–551. https://doi.org/10.1038/nn.3358
- 150. Rappold P.M., Lynd-Balta E., Joseph S.A. (2006) P2X7 receptor immunoreactive profile confined to resting and activated microglia in the epileptic brain. Brain Res. 1089: 171–178. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.040
- 151. Jimenez-Pacheco A., Diaz-Hernandez M., Arribas-Blázquez M., Sanz-Rodriguez A., Olivos-Oré L.A., Artalejo A.R., Alves M., Letavic M., Miras-Portugal M.T., Conroy R.M., Delanty N., Farrell M.A., O'Brien D.F., Bhattacharya A., Engel T., Henshall D.C. (2016) Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 36: 5920–5932. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4009-15.2016
- 152. Kim J.-E., Kang T.-C. (2011) The P2X7 receptor-pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor-mediated seizure susceptibility in mice. J. Clin. Invest. 121: 2037–2047. https://doi.org/10.1172/JC144818
- 153. Raghunatha P., Vosoughi A., Kauppinen T.M., Jackson M.F. (2020) Microglial NMDA receptors drive pro-inflammatory responses via PARP-1/TRMP2 signaling. Glia. 68: 1421–1434. https://doi.org/10.1002/glia.23790
- 154. Matsuda T., Murao N., Katano Y., Juliandi B., Kohyama J., Akira S., Kawai T., Nakashima K. (2015) TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. Nat. Commun. 6: 6514. https://doi.org/10.1038/ncomms7514
- 155. Klement W., Garbelli R., Zub E., Rossini L., Tassi L., Girard B., Blaquiere M., Bertaso F., Perroy J., de Bock F., Marchi N. (2018) Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature. Neurobiol. Dis. 113: 70–81. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.002
- 156. Takeuchi H., Jin S., Wang J., Zhang G., Kawanokuchi J., Kuno R., Sonobe Y., Mizuno T., Suzumura A. (2006) Tumor Necrosis Factor-α Induces Neurotoxicity via Glutamate Release from Hemichannels of Activated Microglia in an Autocrine Manner. J. Biol. Chem. 21: 21362– 21368.
 - https://doi.org/10.1074/jbc.M600504200
- 157. *Stellwagen D., Beattie E.C, Seo J.Y., Malenka R.C.* (2005) Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-α. J. Neurosci. 25: 3219–3228. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005
- 158. Viviani B., Bartesaghi S., Gardoni F., Vezzani A., Behrens M.M., Bartfai T., Binaglia M., Corsini E., Di Luca M., Galli C.L., Marinovich M. (2003) Interleukin-1β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J. Neurosci. 23: 8692–8700.

https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-25-08692.2003

- 159. Roseti C., van Vliet E.A., Cifelli P., Ruffolo G., Baayen J.C., Di Castro M.A., Bertollini C., Limatola C., Aronica E., Vezzani A., Palma E. (2015) GABAA currents are decreased by IL-1β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: Implications for ictogenesis. Neurobiol. Dis. 82: 311–320. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.003
- 160. Dyomina A.V., Zubareva O.E., Smolensky I.V., Vasilev D.S., Zakharova M.V., Kovalenko A.A., Schwarz A.P., Ischenko A.M., Zaitsev A.V. (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. Pharmaceuticals. 13: 340. https://doi.org/10.3390/ph13110340
- 161. Noe F.M., Polascheck N., Frigerio F., Bankstahl M., Ravizza T., Marchini S., Beltrame L., Banderó C.R., Löscher W., Vezzani A. (2013) Pharmacological blockade of IL-1β/IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. 59: 183–193. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.015

- 162. Wan Y., Feng B., You Y., Yu J., Xu C., Dai H., Trapp B.D., Shi P., Chen Z., Hu W. (2020) Microglial Displacement of GABAergic Synapses Is a Protective Event during Complex Febrile Seizures. Cell Rep. 33: 108346. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108346
- 163. Mukherjee S., Arisi G.M., Mims K., Hollingsworth G., O'Neil K., Shapiro L.A. (2020) Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy. J. Neuroinflam. 17: 193. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01854-w
- 164. Boche D., Perry V.H., Nicoll J.A.R. (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl. Neurobiol. 39: 3–18. https://doi.org/10.1111/nan.12011
- 165. Benson M.J., Manzanero S., Borges K. (2015) Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. Epilepsia. 56: 895–905. https://doi.org/10.1111/epi.12960
- 166. Zhao X., Liao Y., Morgan S., Mathur R., Feustel P., Mazurkiewicz J., Qian J., Chang J., Mathern G.W., Adamo M.A., Ritaccio A.L., Gruenthal M., Zhu X., Huang Y. (2018) Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. Cell. Rep. 22: 2080–2093. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.004
- 167. Zhao X.-F., Liao Y., Alam M.M., Mathur R., Feustel P., Mazurkiewicz J.E., Adamo M.A., Zhu X.C., Huang Y. (2020) Microglial mTOR is Neuronal Protective and Antiepileptogenic in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 40: 7593–7608. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2754-19.2020
- 168. Zhou Q.-G., Nemes A.D., Lee D., Ro E.J., Zhang J., Nowacki A.S., Dymecki S.M., Najm I.M., Suh H. (2018) Chemogenetic silencing of hippocampal neurons suppresses epileptic neural circuits. J. Clin. Invest. 129: 310–323. https://doi.org/10.1172/JCI95731
- 169. Luo C., Koyama R., Ikegaya Y. (2016) Microglia engulf viable newborn cells in the epileptic dentate gyrus. Glia. 64: 1508–1517. https://doi.org/10.1002/glia.23018
- 170. Yang F., Liu Z.-R., Chen J., Zhang S.-J., Quan Q.-Y., Huang Y.-G., Jiang W. (2010) Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. J. Neurosci. Res. 88: 519–529. https://doi.org/10.1002/jnr.22224
- 171. Heo K., Cho Y.-J., Cho K.-J., Kim H.-W., Kim H.-J., Shin H.Y., Lee B.I., Kim G.W. (2006) Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. Neurosci. Lett. 398: 195–200. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.027
- 172. Wang N., Mi X., Gao B., Gu J., Wang W., Zhang Y., Wang X. (2015) Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuroscience. 287: 144–156. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.021
- 173. Andoh M., Ikegaya Y., Koyama R. (2019) Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy. J. Clin. Med. 8: 2170. https://doi.org/10.3390/jcm8122170
- 174. Wyatt-Johnson S.K., Brewster A.L. (2020) Emerging Roles for Microglial Phagocytic Signaling in Epilepsy. Epilepsy Curr. 20: 33–38. https://doi.org/10.1177/1535759719890336
- 175. Najjar S., Pearlman D., Miller D.C., Devinsky O. (2011) Refractory Epilepsy Associated With Microglial Activation. Neurologist. 17:249–254. https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31822aad04
- 176. Aronica E., Gorter J.A., Redeker S., Ramkema M., Spliet W.G.M., van Rijen P.C., Leenstra S., Troost D. (2005) Distribution, characterization and clinical significance of microglia in glioneuronal tumours from patients with chronic intractable epilepsy. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 31: 280–291. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00636.x
- 177. Milior G., Morin-Brureau M., Chali F. Le Duigou C., Savary E., Huberfeld G., Rouach N., Pallud J., Capelle L., Navarro V., Mathon B., Clemenceau S., Miles R. (2020) Distinct P2Y Receptors Mediate Extension and Retraction of Microglial Processes in Epileptic and Peritumoral Human Tissue. J. Neurosci. 40: 1373–1388. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0218-19.2019

Synaptic Dysfunction in Epilepsy

A. V. Zaitsev^a, *, D. V. Amakhin^a, A. V. Dyomina^a, M. V. Zakharova^a, J. L. Ergina^a, T. Y. Postnikova^a, G. P. Diespirov^a, and L. G. Magazanik^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia *e-mail: aleksey zaitsev@mail.ru

Epilepsy is one of the prevalent cerebral diseases, and despite intensive research of this pathology for many years, modern medicine cannot effectively control seizure manifestations in almost a third of patients. In epilepsy, there is a reorganization of neuronal networks, which is the result of the death of some neurons and the formation of new neuronal connections with altered properties. In this review, we focused on the analysis of changes in the properties of a key element of neural networks, the chemical synapse, immediately after epileptic activity, during epileptogenesis, and in chronic epilepsy. Since the synapse includes not only neuronal pre- and postsynaptic parts, but also glial components, our consideration includes changes in the properties of astrocytes and microglia. Epileptic activity causes numerous modifications in synapse function: changes in the probability of mediator release, the alteration of subunit composition of postsynaptic receptors, impairments of synaptic plasticity, and the changes in morphology and activity of astrocytes and microglia. Glial cells release several gliatransmitters and cytokines, which in turn modify synaptic transmission. In some cases, the combination of these changes is favorable and allows to compensate almost completely the consequences of epileptic activity on the nervous system. However, often these changes, on the contrary, trigger a process leading to epilepsy and long-term disturbances in the functioning of neural networks. Over the past 10 years, significant progress has been made in deciphering these changes and their mechanisms, which is covered in our review. However, until now, researchers have not established a clear concept of which particular modifications in the functioning of synapses provide the best compensation and are able to prevent epileptogenesis. This knowledge could be the basis for the development of effective methods of epileptogenesis prevention and epilepsy treatment.

Keywords: synapse, NMDA receptor, astrocyte, microglia, epileptogenesis, epilepsy model

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 518-532

= обзоры ===

ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОГО СИНАПСА: МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-ЗАВИСИМОЙ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ

© 2021 г. Н. В. Гуляева^{1, 2, *}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия ²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, Россия *E-mail: nata gul@ihna.ru

> Поступила в редакцию 21.01.2021 г. После доработки 31.01.2021 г. Принята к публикации 01.02.2021 г.

Глюкокортикоиды, высвобождающиеся из коры надпочечников при действии стрессорных факторов, являются важнейшими медиаторами интегративной регуляции адаптивной пластичности мозга, осуществляемой нейрогуморальной гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой. Возбуждающие синапсы рассматриваются как ключевые участники синаптической пластичности и поведенческой адаптации. В обзоре представлены накопленные к настоящему времени данные о механизмах глюкокортикоидной регуляции глутаматергического синапса, в первую очередь, на примерах гиппокампа и префронтальной коры. Глюкокортикоиды, запуская трансдукцию сигнала через минералокортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы, локализованные на синаптических мембранах и в цитозоле глутаматергических нейронов, регулируют пластичность синапса на уровне пре- и постсинаптического компартментов. Глюкокортикоиды модулируют возбудимость синапса за счет изменений везикулярного транспорта и высвобождения глутамата, опосредуют изменения экспрессии, состава и свойств ионотропных NMDA- и AMPA- и других глутаматных рецепторов. Представлена подробная схема множественных регуляторных механизмов, реализуемых в глутаматергическом синапсе при связывании глюкокортикоидов со специфическими рецепторами.

Ключевые слова: кортизол, кортикостерон, стресс, гиппокамп, префронтальная кора, амигдала, минералокортикоидный рецептор, глюкокортикоидный рецептор, АМРА-рецептор, NMDA-рецептор

DOI: 10.31857/S0869813921040099

ВВЕДЕНИЕ: ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ – РЕГУЛЯТОРЫ СТРЕСС-ЗАВИСИМОЙ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ

Stress is the spice of life. Hans Selye

Эмоционально окрашенные переживания в стрессорных ситуациях запоминаются лучше, чем в ситуациях с менее выраженной эмоциональной компонентой, и это адаптивный феномен, поскольку он способствует преодолению сопоставимых

Принятые сокращения: AMPA-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; BDNF – мозговой нейротрофический фактор; NMDA-рецептор – N-метил-D-аспартатный рецептор; TrkB – тропомиозин киназа В; ГГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось; ГК – глюкокортикоидный гормон (глюкокортикоиды); ГР – глюкококортикоидный рецептор; КС – кортикостерон; КРГ – кортикотропин-рилизинг гормон; МР – минералокортикоидный рецептор.

ситуаций в будущем. Нейроэндокринный ответ на действие стрессорных факторов, наряду с активацией вегетативной нервной системы, включает реакцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО): высвобождение гипоталамического кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ), который стимулирует высвобождение адренокортикотропного гормона (АКТГ) из гипофиза и, наконец, высвобождение глюкокортикоидных гормонов (ГК) из коры надпочечников (кортикостерона у большинства грызунов; кортизола у человека) [1]. ГК поступают в кровообращение, осуществляя как периферическое, так и центральное действие, достигая однотипных рецепторов практически во всех органах и тканях, включая мозг (ГК свободно проходят гемато-энцефалический барьер). Клеточные эффекты КС опосредованы глюкокортикоидными рецепторами (ГР) и минералокортикоидными рецепторами (MP), которые существуют в цитоплазматической/ядерной и мембранной формах и отвечают соответственно за медленные геномные и быстрые негеномные эффекты ГК. ГР экспрессируются в большинстве структур и регионов мозга, в то время как MP экспрессированы, в основном, в тех регионах мозга, которые имеют решающее значение для формирования памяти и эмоций, таких как гиппокамп, миндалина и префронтальная кора [2]. Высокоаффинные МР связаны с ГК при низком уровне гормонов, а сродство ГР к кортикостерону (КС) на порядок ниже, поэтому активация этих рецепторов происходит главным образом при повышении уровня ГК, в частности, при стрессорной реакции. Преимущественно благодаря трансдукции сигнала через мембранные МР, ГК запускают быстрые негеномные эффекты на возбудимость и активацию нейронов в гиппокампе, гипоталамусе, амигдале и префронтальной коре, таким образом в течение минут оказывая влияние на когнитивные функции, адаптивное поведение и нейроэндокринную систему. Трансдукция сигнала ГК через их рецепторы дает возможность всем клеткам мозга, и в первую очередь, нейронам, адекватно отвечать на действие разнообразных стрессорных факторов. Опосредованный ГК сигналинг регулирует и интегрирует ответы различных систем (нейротрансмиттерных, нейротрофиновой, цитокиновой и др.), обеспечивая их взаимодействие в процессе поддержания и настройки нейропластичности. Это, в частности, обеспечивается сбалансированностью работы системы "один гормон/два рецептора", способной модулировать широкий спектр активностей ЦНС [1, 2]. В частности, это достигается за счет того, что ГК могут регулировать синаптическую функцию с помощью геномных и негеномных эффектов как через активацию МР, так и ГР [3].

Стрессорные факторы оказывают существенное влияние на обучение и память, в частности, через действие ГК на пластичность мозга на субклеточном, клеточном и сетевом уровне [1, 4]. Исследования последних лет показали, что ГК вместе с катехоламинами очень динамично регулируют синаптическую функцию и синаптическую пластичность, лежащие в основе обучения и памяти [5]. ГК модулируют формирование памяти и кодирование информации, в первую очередь через сигнальные механизмы, опосредованные МР, и способствуют длительной консолидации через активацию ГР. Дисфункция ГГНО и кортикостероидных рецепторов приводит к неадекватной реакции организма на стрессорные факторы и развитие как психопатологий, так и неврологических заболеваний [1].

ВОЗБУЖДАЮЩИЕ СИНАПСЫ ГИППОКАМПА КАК МИШЕНЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

В этой связи особое внимание привлекает гиппокамп, ключевая структура, участвующая в переработке когнитивной и эмоциональной информации. Селективная чувствительность гиппокампа к действию различных стрессорных факторов рассматривается как основа для развития вызванной стрессом поведенческой дисфункции [6, 7]. При этом результаты многочисленных работ свидетельствуют о том, что хронический избыток ГК, в первую очередь при хроническом стрессе, вызывает специфический синаптический дефицит в гиппокампе. Важнейшую роль в этом играют возбуждающие синапсы, ключевые участники синаптической передачи, синаптической пластичности и поведенческой адаптации [8, 9]. Настройка глутаматергической передачи является важным механизмом коммуникации между нейронами. Накапливается все больше доказательств, что патофизиология нервно-психических расстройств, включая расстройства настроения и памяти, связана с нарушением функции и регуляции глутаматергической системы. Избыточные глутаматергические токи в гиппокампе лежат в основе развития деменции, и их нормализация в экспериментальных исследованиях позволяет предотвращать нарушения памяти [10]. В данном обзоре рассмотрены накопленные к настоящему времени данные о механизмах глюкокортикоидной регуляции глутаматергического синапса, в первую очередь, на примере гиппокампа.

В 1988 г. Halpain и McEwen [11] показали, что КС снижает связывание ³Н-глутамата в гиппокампе (на срезах мозга крыс и в синаптических мембранах). Связывание ³Н-глутамата с областями дорсального гиппокампа было значительно снижено у адреналэктомированных животных после введения КС, который однако не изменял связывание ³Н-глутамата в других областях мозга. Эти результаты были первыми, которые показали, что КС может избирательно изменять сайты связывания возбуждающих аминокислот в ткани гиппокампа. В 1990 г. группа Sapolsky показала, что повреждающее действие КС на нейроны гиппокампа зависит от NMDA-рецептора [12]. ГК снижали способность нейронов гиппокампа выживать в патологических для мозга ситуациях (включая гипоксию-ишемию и судорожную активность), опосредованных избытком возбуждающих нейромедиаторов, в первую очередь, глутамата, активацией NMDA-рецепторов и избыточной мобилизацией цитозольного кальшия в постсинапсе. Авторы показали, что повреждающее действие ГК на нейроны гиппокампа опосредовано усилением глутаматергической трансмиссии и/или повышением уязвимости нейронов к избытку глутамата. В качестве возможного объяснения была предложена гипотеза о том, что ГК ингибируют поглощение глюкозы нейронами гиппокампа, а многочисленные этапы рецепторного каскада NMDA усиливаются, когда запасы энергии нейронов уменьшаются. Действительно, это группа далее показала, что ГК ингибируют транспорт глюкозы и захват глутамата астроцитами гиппокампа, и этот феномен может быть одним из факторов нейротоксичности ГК [13]. Позже Sandi [14], обсуждая роль и механизмы участия ГК в хранении памяти, констатировал, что стероидные гормоны надпочечников модулируют процессы обучения и памяти, взаимодействуя со специфическими рецепторами ГК в различных областях мозга, и выдвинул гипотезу о роли ГК, действующих через эти рецепторы, в механизмах консолидации памяти. Были рассмотрены возможные ассоциированные с действием ГК через глутаматергическую передачу и молекулы клеточной адгезии молекулярные механизмы, которые могут опосредовать влияние ГК на синаптическую пластичность, способствующую формированию долговременной памяти. За последние два десятилетия получены многочисленные подтверждения влияния ГК на глутаматергические синапсы и раскрыты некоторые механизмы эффектов ГК.

ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПЕ

Показано, что стресс/ГК динамически модулируют синаптическую пластичность на уровне глутаматергических синапсов взрослого мозга. Karst и Joëls исследовали влияние хронического стресса на синаптические ответы гранулярных нейронов зубчатой извилины крыс на стимуляцию перфорантного пути в срезах гиппокампа [15]. Стресс не влиял на базовые синаптические ответы, однако синаптические ответы хронически стрессированных и контрольных крыс на активацию ГР кортикостероном *in vitro* различались. В среде без магния с добавлением селективных антагонистов глутаматных рецепторов максимальный ответ на синаптическую активацию нейронов при потенциале -70 мВ был значительно усилен после введения КС в срезах стрессированных, но не контрольных животных. Соответственно амплитуда токов, опосредованных АМРА-, но не NMDA-рецепторами, в присутствии КС была выше у стресссированных крыс во всем диапазоне потенциалов. КС также уменьшал время достижения пика токов АМРА, но этот эффект не зависел от предшествующего стрессорного воздействия. Усиленный под действием ГК синаптический ток может способствовать усиленному возбуждению проекционных областей зубчатой извилины, особенно области САЗ гиппокампа. Принято считать, что в височно-гиппокампальном (temporoammonic) возбуждающем синапсе (ТА-СА1) вызванное стрессом повышение уровня ГК запускает развитие синаптической дисфункции. Хронически повышенные уровни КС у крыс приводили к снижению возбуждения, опосредованного АМРА-рецепторами, в синапсах ТА-СА1 и снижению экспрессии белка субъединицы 1 АМРА-рецепторов. Эти изменения предотвращались аппликацией ингибитора синтеза КС метирапона, который также предотвращал вызванные хроническим стрессом нарушения консолидации пространственной памяти [16]. Авторы работы заключили, что КС достаточен и необходим для развития глутаматергической дисфункции, лежащей в основе стресс-индуцированных синаптических и поведенческих фенотипов.

АМРА-рецепторы играют критическую роль в зависимой от активности пластичности и гиппокамп-зависимом обучении. Показано, что КС избирательно увеличивает поверхностную экспрессию субъединицы GluR2 AMPA-рецепторов в первичных культурах гиппокампа через активацию ГР и механизм, зависящий от синтеза белка. КС также резко увеличивал долю экспрессируемой на поверхности мембраны субъединицы GluR2, способной к латеральной диффузии [17]. При этом КС способствовал зависимому от NMDA-рецепторов эндоцитозу как синаптической, так и экстрасинаптической GluR2 в условиях, ослабляющих синаптическую передачу. Индуцированное КС повышение мобильности АМРА-рецепторов, обеспечивающее синаптический транспорт AMPA-рецепторов, содержащих GluR2, может как способствовать рекрутированию этих рецепторов, так и, при соответствующих условиях, снижению плотности синаптических АМРА-рецепторов и развитию длительной депрессии. Эти процессы могут лежать в основе как облегчающего, так и подавляющего действия ГК на синаптическую пластичность, обучение и память. Groc и соавт. также показали, что КС через различные рецепторы ГК вызывает зависимое от времени увеличение поверхностной подвижности субъединицы GluR2 AMPA-рецепторов и содержания GluR2 на синаптической поверхности; при этом важно, что KC также потенцирует увеличение содержания GluR2 на синаптической поверхности в условиях длительной потенциации, что указывает на участие ГК в трафике АМРА-рецепторов [18]. В экспериментах с пространственным обучением мышей в условиях умеренного стресса показано облегчение обучения под действием стресса и ассоциация с усиленной синаптической экспрессией субъединицы GluA2 AMPA в гиппокампе. Ингибитор синтеза ГК метирапон блокировал как облегчение обучения, так и усиление трафика GluA2. Внутримозговое введение пептида pep2m, который блокирует синаптический трафик GluA2, нарушало немедленное воспроизведение при обучении, а также долгосрочную память, что свидетельствует о ключевой роли синаптического транспорта GluA2 в вызванном стрессом облегчении обучения и памяти [19]. В опытах *in vivo* и *in vitro* показано, что опосредованное ГК сопряжение эндоплазматического ретикулума и митохондрий снижает трафик AMPA-рецепторов и митохондрий в синапсы за счет дестабилизации микротрубочек, ассоциированных с митохондриальными ГР [20].

ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПЕ

Модуляция синаптической пластичности ГК в гиппокампе связана с пластическими изменениями синаптических NMDA-рецепторов, которые, наряду с АМРА-рецепторами, являются критическими для синаптической функции и необходимы для индукции многих форм синаптической пластичности. Наряду с влиянием на синаптическую пластичность путем изменения функциональных свойств АМРА-рецепторов, включая изменения их подвижности в мембране и функционирования, ГК регулируют синаптическую пластичность, динамически модулируя функцию синаптических NMDA-рецепторов. Понимание того, как ГК регулируют функцию NMDA-рецепторов, недостаточно, возможно, из-за принятого мнения, что функция NMDA во взрослом мозге стабильна. Функционирование NMDA-рецепторов во взрослом гиппокампе чувствительно даже к кратковременному воздействию ГК, а события, происходящие в раннем возрасте, могут ре-программировать развитие гиппокампа, повышая его чувствительность к модуляции функции NMDA-рецептора ГК. Модуляция функции NMDA-рецепторов опосредует динамическую регуляцию синаптической пластичности и адаптации при стрессе, однако усиленная функция этих рецепторов может быть вовлечена в механизмы связанных со стрессом психопатологий, включая депрессию [21].

КС через МР регулирует поверхностную динамику субъединицы GluN2B NMDA-рецептора и состав синапса. Показано, что внеклеточный КС увеличивает экспрессию GluN2B в синапсах, при этом функционально потенцирование содержания АМРА-рецепторов в синапсах, вызванное КС, ассоциировано с изменениями поверхностной динамики NMDA-рецепторов [22]. Эти данные, полученные путем визуализации с высоким разрешением, показали, что в гиппокампальных сетях ГК являются естественными, мощными, быстрыми и специфическими регуляторами мембранного трафика GluN2B субъединицы NMDA-рецептора, модулирующими зависимые от NMDA-рецептора адаптации синапсов. В срезах гиппокампа взрослых крыс КС потенцировал опосредованные NMDA-рецепторами быстрые вызванные синаптические ответы, а затем происходило медленное увеличение синаптической экспрессии субъединицы GluN2A NMDA-рецепторов [23]. Параллельно с усилением функции NMDA-рецепторов при аппликации КС происходило преходящее облегчение как длительной потенциации, так и длительной депрессии, свидетельствующее о разнонаправленных изменениях пластичности и прекращающееся, когда синаптическая экспрессия GluN2A повышалась. Опосредованное ГК медленное увеличение GluN2A в синапсах гиппокампа может быть гомеостатическим механизмом нормализации синаптической пластичности после быстрой стресс-индуцированной фасилитации.

Кгидегѕ и соавт. [24] исследовали *in vitro* синаптическое потенцирование в области CA1 срезов гиппокампа мышей с низким базальным уровнем КС. Они показали, что ГК быстро настраивают синаптические NMDA-рецепторы за счет мембранной динамики и сигналинга через MP. Введение КС способствовало синаптическому потенцированию, зависимому от активации потенциал-зависимых кальциевых каналов, одновременно ухудшая синаптическую пластичность, опосредованную активаци-ей NMDA-рецептора. Антагонист ГР RU 38486 блокировал оба эти эффекта КС.

По-видимому, окончательный эффект ГР на синаптическую пластичность определяется балансом между различными типами потенцирования, который может быть регион-специфичным и зависит от условий эксперимента. Можно предположить, что эти различные эффекты на синаптическую эффективность участвуют в противоположно направленной модуляции когнитивных функций кортикостероидными гормонами. КС быстро снижал активность NMDA-рецепторов в культивируемых нейронах гиппокампа, а при введении в мозг подавлял длительную потенциацию в области СА1 гиппокампа [25]. При этом ГК действовали на рецептор, зависимый от G белка, активируя несколько сигнальных путей в нейронах гиппокампа. Быстрое подавление активности NMDA-рецепторов ГК зависело от фосфолипазы С и соответствующего пути трансдукции сигнала. В срезах гиппокампа взрослых крыс КС, даже в низких концентрациях, индуцирует быстрое увеличение плотности шипиков пирамидных нейронов CA1 гиппокампа. Аппликация RU486, антагониста ГР, препятствовала действию КС. Блокирование любой из киназ – МАРК, РКА, РКС или PI3K, или NMDA-рецепторов подавляло индуцированное КС усиление образования шипиков [26]. Таким образом, стресс/ГК модулируют обновление шипиков через синаптические ГР и множественные киназные пути.

ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДРУГИХ ТИПОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПЕ

Наряду с АМРА- и NMDA-рецепторами, функция других глутаматных рецепторов также регулируется ГК, хотя такая регуляция остается недостаточно изученной. Острый стресс/КС путем стимуляции ГР облегчал долговременную депрессию, вызванную агонистом метаботропного глутаматного рецептора (mGluR) группы 1 (R,S)-3,5-дигидроксифенилглицина (DHPG) в нейронах CA1 гиппокампа [27]. Поскольку считается, что в основе обучения и хранения памяти лежат процессы, аналогичные долговременной потенциации и долговременной депрессии синаптической эффективности. двум основным формам синаптической пластичности, это указывает на потенциальную вовлеченность mGluR в глюкокортикоидную регуляцию обучения и памяти. Каинатные рецепторы – класс ионотропных глутаматных рецепторов, которые играют важную роль в модуляции высвобождения глутамата и синаптической пластичности в гиппокампе крыс. Адреналэктомия приводила к увеличению экспрессии в гиппокампе мРНК субъединиц KA1, GluR6 и GluR7, и этот эффект блокировался КС в случае KA1 и GluR7 и альдостероном в случае GluR6. Хронический иммобилизационный стресс повышал экспрессию субъединицы КА1, но не оказывал влияния на экспрессию других субъединиц, а хроническое введение умеренных доз КС также увеличивало экспрессию мРНК КА1 в зубчатой извилине, тогда как высокая доза не оказывала эффекта [28]. Таким образом, ГК влияют на состав каинатных рецепторов гиппокампа и селективно модулируют субъединицу КА1 в зубчатой извилине и СА3, принимая тем самым участие в вызванной стрессом адаптивной структурной пластичности.

ГК высвобождаются не только в результате действия стрессорных факторов, но и в ходе ультрадианных и циркадианных импульсов и ассоциированы с ритмическими гипофизарно-надпочечниковыми взаимодействиями. Ритмическая активность появления ГК в крови, контролируемая супрахиазматическим ядром гипоталамуса, связана с специфическими для клеточного типа структурными и функциональными изменениями, которые происходят с циркадианной ритмичностью в нейронах и астроцитах в области CA1 гиппокампа. В пирамидных нейронах изменяется поверхностная экспрессия NMDA-рецепторов, изменяется расстояние астроцитов до синапсов, вместе эти события изменяют клиренс глутамата, активацию рецепторов и интеграцию временно кластеризованных возбуждающих синаптических входов, в конечном счете модифицируя гиппокамп-зависимое обучение *in vivo* [29]. При этом уровень ГК является ключевым фактором изменения синаптической силы. Эффекты повторных импульсов КС на характеристики глутаматергической трансмиссии в нейронах гиппокампа зависят от предистории поступления КС [30, 31]. Например, первый импульс вызывает преходящее увеличение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов, трафика AMPAрецепторов и синаптической пластичности, в то время как базальные вызванные полевые потенциалы остаются неизменными. При последующих аппликациях КС реакции становятся более вариабельными, ослабевают или даже меняют знак с течением времени, в зависимости от времени после аппликации.

ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ДРУГИХ СТРУКТУРАХ МОЗГА

Эффекты ГК/стресса на синаптическую пластичность продемонстрированы не только в гиппокампе, но и в других структурах мозга, ключевых для когнитивной функции и эмоционального состояния. Ряд исследований влияния ГК/стресса на пластичность глутаматергических синапсов касается префронтальной коры. Это ключевая область мозга, вовлеченная в реализацию обучения и эмоций, чрезвычайно чувствительна к стрессорным воздействиям. В то время как хронический стресс часто оказывает пагубное воздействие, острый стресс может стимулировать обучение и память, и эти эффекты опосредованы эффектами ГК на глутаматергические синапсы префронтальной коры. Было обнаружено, что поведенческие стрессоры *in vivo* вызывают длительное опосредованное ГР потенцирование синаптических токов через NMDA- и AMPA-рецепторы избирательно в пирамидных нейронах префронтальной коры. Этот эффект сопровождался повышенной экспрессией субъединиц NMDA- и АМРА-рецепторов в острой фазе стресса [32]. Кроме того, поведенческие тесты показали, что рабочая память, ключевая функция, основанная на рекуррентном возбуждении в сетях нейронов префронтальной коры, усиливается при остром стрессе за счет ГР-зависимых механизмов. Иными словами, была выявлена форма ГР-зависимого долговременного потенцирования синаптической передачи в префронтальной коре, индуцированной естественными стимулами *in vivo*. Исследования последнего десятилетия подтвердили, что стресс, в первую очередь, за счет изменения секреции ГК и ГК-зависимого сигналинга, вызывает сложные изменения в трансдукции глутаматергического сигнала в префронтальной коре, модулируя когнитивные процессы [33]. Модификации глутаматергической системы, вызванные стрессом, в префронтальной коре, по-видимому, являются двухфазными: в то время как быстрая реакция на стресс предполагает увеличение числа возбуждающих синапсов, синаптической передачи и рабочей памяти, долгосрочные адаптационные изменения, в том числе связанные с хроническим стрессом, вызывают противоположные эффекты. Считают, что действие стресса/ГК на глутаматергическую трансмиссию имеет "U-образную форму" в зависимости от продолжительности и тяжести действия стрессора, при этом двухфазная реакция в условиях острого и хронического стресса отражает адаптивные и дезадаптивные реакции на стрессорные стимулы. Как и в гиппокампе, стресс-индуцированная модуляция возбуждающей синаптической передачи включает изменения в пресинаптическом высвобождении глутамата, постсинаптическом трафике и деградации мембранных глутаматных рецепторов, структуре шипиков и сети цитоскелета, а также эпигенетическом контроле экспрессии генов. В префронтальной и лобной коре острый стресс индуцирует усиление высвобождения глутамата и глутаматной нейротрансмиссии, зависящие от активации рецепторов ГК, причем

увеличение легко высвобождаемого пула глутаматных везикул опосредовано синаптическим, негеномным действим ГК, в первую очередь, через МР [34]. Более медленные, частично геномные механизмы задействованы в усилении глутаматной нейротрансмиссии, вызванной стрессом. Изменения в высвобождении глутамата и нейротрансмиссии опосредуют ремоделирование дендритов и другие стрессзависимые морфологические изменения.

Bonini и соавт. [35] обнаружили, что острый неизбегаемый электроболевой стресс (footshock), хотя и не индуцирует никаких транскрипционных изменений субъединиц АМРА- и NMDА-ионотропных рецепторов, оказывает быстрые преходящие эффекты на экспрессию их белков, фосфорилирование (увеличение для Ser(845) GluA1 и Ser(880) GluA2) и локализацию в постсинаптических шипиках префронтальной и лобной коры. В постсинаптических шипиках стресс индуцировал быстрое снижение экспрессии GluA2 вместе с увеличением его фосфорилирования по Ser(880), что свидетельствует об интернализации GluA2-содержащих АМРА-рецепторов. Экспрессия субъединиц NMDA-рецепторов GluN1 и GluN2A была повышена в постсинаптических шипиках. Эти результаты свидетельствуют о раннем и преходящем усилении опосредованных АМРА-рецепторами токов с последующей преходящей активацией NMDA-рецепторов [36]. Острый неизбегаемый электроболевой стресс стимулирует вызванное деполяризацией высвобождение глутамата в префронтальной и лобной коре на фоне повышения циркулирующих уровней КС, который, связываясь с мембранными рецепторами ГК, индуцирует быстрое повышение уровня глутамата в синаптической щели за счет усиления трафика везикул и увеличения пула высвобождаемого глутамата в перфорированных синапсах, плотность которых в префронтальной коре увеличивается [37]. Индуцированный стрессом *ех пого* синаптогенез асимметричных синапсов обнаруживается уже через 40 мин после начала стрессорного воздействия, а через 1-14 дней наблюдается значительная атрофия и ремоделирование апикальных дендритов. Таким образом, острый стресс может вызвать быстрые структурные/функциональные изменения в глутаматных синапсах префронтальной коры. Интересно, что стресс в раннем возрасте нарушает гомеостаз глутаматергических синапсов при взрослении. На модели раннего стресса материнской депривации у мышей показаны повышение базального уровня КС, концентрации глутамата и нейронной активности в соматосенсорной коре. В отличие от контрольных животных, дополнительная стрессорная нагрузка у депривированных в раннем возрасте крыс, не вызывая нормального дополнительного повышения уровня КС, тем не менее, повышала уровень глутамата, а также вызывала отличные от контрольных изменения экспрессии АМРА- и NMDA-рецепторов [38].

Как было отмечено выше, в гиппокампе высокие уровни ГК, в том числе в результате стресс-реакции, быстро и обратимо усиливают глутаматергическую передачу через негеномные эффекты, зависимые от МР. Затем ГК медленно нормализуют функцию клеток гиппокампа за счет сигнализации через ядерные/цитоплазматические ГР. Метапластические ответы базолатеральной миндалины на КС существенно отличаются от эффектов ГК в гиппокампе. Вначале происходит быстрое МР-зависимое усиление глутаматергической передачи в нейронах. В отличие от гиппокампа это быстрое усиление является длительным, потенциально позволяя расширить окно для кодирования эмоциональных реакций во время стрессорных событий [39]. Важно отметить, что длительное изменение состояния нейронов миндалевидного тела значительно модифицирует ответную реакцию на последующие повышения уровня КС, вызывая быстрое подавление глутаматергической передачи, опосредованное ГР. Таким образом, реакция нейронов базолатеральной миндалины на ГК зависит от предшествующих стрессорных событий. Делеция ГР у мышей специфически в глутаматергических, но не в ГАМКергических нейронах индуцировала гиперактивность ГГНО и снижала проявления поведения, связанного со страхом и тревогой. Это сопровождалось снижением ГР-зависимых электрофизиологических реакций в базолатеральной миндалине [40]. Полученная при помощи вирусной конструкции делеция ГР дополнительно показала, что именно реакция страха, но не тревоги, регулируется ГР в глутаматергических нейронах базолатеральной миндалины. По-видимому, патологическая тревожность является результатом измененной передачи сигналов ГР в глутаматергических цепях нескольких областей переднего мозга, в то время как модуляция поведения, связанного со страхом, в значительной степени может быть опосредована передачей сигналов ГР в глутаматергических нейронах базолатеральной миндалины. Таким образом, при регуляции поведения страха и тревожности вклад ГР значителен в ключевую возбуждающую, но не тормозную нейромедиаторную систему мозга, и этот факт принципиально важен для нашего понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе тревожных расстройств.

Глюкокортикоиды, секретируемые в ответ на стрессорную активацию ГГНО, попадают и в гипоталамус, где обеспечивают быстрое подавление нейроэндокринной активации, включая секрецию окситоцина и вазопрессина. Хронический стресс стимулирует экспрессирующие КРГ нейроны в гипоталамусе и приводит к гиперактивности ГГНО. Хронический непредсказуемый стресс у крыс повышал экспрессию субъединицы GluN1 NMDA-рецепторов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и усиливал синаптическую активность NMDA-рецепторов, способствуя гиперактивности экспрессирующих КРГ нейронов паравентрикулярного ядра и активации ГГНО [41].

Как уже упоминалось, стресс вызывает различные, иногда противоположные изменения в глутаматергической системе в разных областях мозга, в том числе в структурах лимбической системы, а именно в префронтальной коре, гиппокампе и миндалевидном теле. АМРА-рецепторы — ионотропные глутаматные рецепторы, опосредующие быструю синаптическую передачу, фосфорилирование специфических сериновых остатков на субъединицах которых (GluA1 и GluA2) считаются критическими посттрансляционными модификациями, регулирующими активность и субклеточный трафик AMPA-рецепторов. Caudal и соавт. [42] исследовали динамику фосфорилирования трех остатков серина субъединиц АМРА-рецепторов (Ser831-GluA1, Ser845-GluA1 и Ser880-GluA2) в четырех областях мозга крысы (миндалевидное тело, медиальная префронтальная кора, дорсальный гиппокамп и вентральный гиппокамп) в течение часа после поведенческого стресса. Оба остатка серина субъединицы GluA1 демонстрировали повышенное фосфорилирование после стресса, однако введение антагонистов кортикостероидных рецепторов снижало этот эффект только для Ser831-GluA1. Напротив, Ser880-GluA2 проявлял зависимую от времени тенденцию к раннему снижению фосфорилирования (которое избирательно усиливалось обработкой антагонистом ГР мифепристоном в миндалевидном теле и медиальной префронтальной коре стрессированных животных) с последующим повышением фосфорилирования. В другой работе на модели острого неизбегаемого стресса у крыс обнаружили противоположные эффекты на фосфорилирование рецепторов АМРА в медиальной префронтальной коре и дорсальном гиппокампе по сравнению с миндалиной и вентральным гиппокампом. После стресса фосфорилирование Ser831-GluA1 было заметно снижено в первых двух областях, тогда как фосфорилирование Ser845-GluA1 было увеличено в миндалевидном теле и вентральном гиппокампе [43]. Стресс вызывал снижение фосфорилирования остатков Tyr876-GluA2 и Ser880-GluA2 в миндалевидном теле и увеличение фосфорилирования Ser880-GluA2 в медиальной фронтальной коре. Эти результаты показывают, что острый стресс вызывает специфические в отношении субъединиц и регион-специфичные изменения глутаматергической трансмиссии, которые, вероятно, приводят к снижению синаптической эффективности в медиальной фронтальной коре и дорсальном гиппокампе и к увеличению активности в миндалевидном теле и вентральном гиппокампе. Модификации фосфорилирования глутаматных рецепторов могут опосредовать патологическое действие стресса на когнитивные функции, а также противоположные эффекты, которые стресс оказывает на синаптическую пластичность в этих областях. Ранний стресс, вызванный выращиванием потомства мышей с ограниченным гнездовым и подстилочным материалом, вызывал нарушения решения гиппокамп-зависимых задач, сопровождающийся снижением соотношения опосредованных NMDA- и AMPA-рецепторами возбуждающих постсинаптических токов и вероятности высвобождения глутамата в нейронах CA1 гиппокампа, но не в базолатеральной миндалине [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ОПОСРЕДОВАННЫЕ РЕЦЕПТОРАМИ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТНОГО СИНАПСА

Обзор имеющихся данных показывает, что влияние ГК на глутаматергический синапс зависит от типа и продолжительности стресса (а следовательно, уровня и динамики ГК), оно в определенной степени регион-специфично и зависит от возраста. Высокая пластичность глутаматергических синапсов определятся большим числом точек приложения прямого или опосредованного влияния ГР и в связи с этим множественностью механизмов, вовлеченных в реакцию на ГК в каждой конкретной ситуации. Наличие как мембранных, так и цитоплазматических форм рецепторов ГК (МР и ГР) в глутаматергическом синапсе существенно увеличивает число возможных путей регуляции синаптической пластичности. Такая множественность, несомненно, лежащая в основе экстраординарных пластических свойств глутаматергического синапса, тем не менее, создает существенные трудности для исследования и формирования полноценного представления об этих процессах. На рис. 1 схематически представлены доказанные экспериментальными исследованиями множественные пути регуляции глутаматергического синапса, опосредованные рецепторами ГК, с подробным объяснением и перечислением этих путей. Одной из ключевых систем, вовлеченных в регуляцию синаптической пластичности и тесно связанной различными механизмами с ГГНО, ГК и их рецепторами, является нейротрофиновая система, в первую очередь, связанная с мозговым нейротрофическим фактором (BDNF) [1]. Нейропластичность требует тонко настроенного взаимодействия сосуществующих в ЦНС систем BDNF и ГК на всех уровнях, включая синаптический. Недавно мы проанализировали множественные взаимодействия между системами BDNF и глутамата [48], показав, как ГК изменяют экспрессию и сигнальную трансдукцию BDNF. На приведенной схеме (рис. 1) дополнительно представлены основные пути ГК-зависимой координации функционирования BDNF/TrkB в глутаматных синапсах.

Гиппокамп, ассоциированный как с когнитивной функцией, так и с эмоциями, является ярким примером высокопластичного региона мозга. Процессы пластичности на молекулярном, синаптическом, клеточном и сетевом уровнях образуют сложную пирамиду взаимосвязанных как вертикально, так и горизонтально механизмов [1]. Связи и координацию этих уровней осуществляют ГК через сигнализацию, опосредованную МР и ГР, при этом ГК одновременно обеспечивают интегративный нейрогуморальный контроль нейропластичности со стороны ГГНО. Высокая адаптивная пластичность отделов мозга, ответственных за его интегративную функцию, в том числе обучение и память (в частности, гиппокампа), в зна**Рис. 1.** Механизмы синаптических эффектов глюкокортикоидов, опосредованные минералокортикоидными и глюкокортикоидными рецепторами, в глутаматергическом синапсе [1, 3, 9, 45–49].

Взаимодействие ГК (Cortisol, Corticosterone) с минералокортикоидными рецепторами (MR) и глюкокортикоидными рецепторами (GR) лежит в основе координации и взаимодействия гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (НРАА) со всеми основными системами, важными для синаптической пластичности. ГК связываются с разным сродством с MR и GR, которые существуют в мембраносвязанной и цитоплазматической/ядерной формах и опосредуют соответственно быстрые и отложенные эффекты ГК. Негеномные механизмы опосредованы мембранными рецепторами ГК. Выброс ГК при активации ГГНО в результате действия стрессорного фактора или циркадианного повышения уровня ГК (1) за счет связывания с высокоаффинными MR в пресинапсе регулирует возбудимость и высвобождение везикул (2), а частота высвобождения глутамата (Glu) регулируется опосредованным G-белком (GPr) сигнальным путем ERK1/2 (внеклеточные киназы, регулируемые сигналом, 1/2; extracellular signalregulated kinase 1/2) (3). В постсинапсе мембранные MR ингибируют активацию калиевых каналов KCh (I_A) (4). Мембранные постсинаптические GR, связанные с GPr, ингибируют кальциевые каналы (CaCh) L-типа (5) и N-типа (6), а также ингибируют протеинкиназу С (РКС), снижая приток кальция в клетку (7). Мембранные постсинаптические GR непрямым образом, через протеинкиназу A (PKA), ингибируют ионотропные N-метил-D-аспартатные рецепторы (NMDAR) (8), а также повышают гиперполяризацию, регулируя ионотропные рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (GABA A) (9). Геномные механизмы действия ГК реализуются главным образом в постсинаптическом компартменте и опосредованы, как правило, цитоплазматическими GR и реже MR. ГК, диффундируя через клеточную мембрану, связываются в цитоплазме с MR и GR, которые димеризуются при участии белков теплового шока (HSPs) (10). После диссоциации HSPs гомодимер рецептора транслоцируется в ядро и связывается со специфическими участками ДНК glucocorticoid response elements (GREs) (11, 12). Затем с областью GREs, с которой связан гомодимер рецептора, могут ассоциироваться кофакторы и гистон-модифицирующие элементы (histone-modifying elements), инициируя транскрипцию и синтез белка. В случае связывания с таким участком факторов IRF-3, NF-кВ и AP1 транскрипция и экспрессия генов ингибируются. Исключениями, когда геномный эффект ГК осуществляется через мембранный рецептор, являются пути, в которых мембранный GR в комплексе с GPr и RACK1 транслоцируется в ядро и вызывает трансрепрессию (13), а также запускаемая мембранным GR ERK1/2-зависимая транскрипция генов, требующая PKC и cRafl (14). Индуцированные ГК геномные эффекты включают модуляцию экспрессии субъединиц NMDAR и ионотропных рецепторов α-амино-3-гидрокси-5-метил-4изоксазолпропионовой кислоты (AMPAR) (15), а также метаболизма и транспорта глюкозы за счет изменения активности ее мембранных транспортеров (на схеме не указано). Важно, что ГК регулируют также синтез, процессинг, трафик, секрецию и сигналинг мозгового нейротрофического фактора (BDNF), одного из основных регуляторов состояния глутаматергического синапса [45]. Глюкокортикоидная регуляция синтеза и функционирования BDNF происходит на разных уровнях, от регуляции транскрипции определенных экзон-специфичных транскриптов Bdnf до сигнальной трансдукции в постсинаптическом нейроне. Транскрипция Bdnf модулируется GR либо через описанный выше путь связывания с GREs на промотерных областях (16), либо за счет подавления действия других факторов, участвующих в транскрипции Bdnf, например, комплекса AP1 и фактора CREB (сAMP response element binding protein). ГК могут влиять на трансляцию гена Bdnf, модулируя активность трансляционного аппарата. BDNF синтезируется в виде проформы (proBDNF), которая в результате протеолиза превращается в зрелый белок BDNF (mBDNF), и это важное превращение опосредовано многими внутри- и внеклеточными протеазами, модуляция которых глюкокортикоидами в конце концов регулирует уровни доступного mBDNF (17). Геномные эффекты ГК связаны также с регуляцией экспрессии рецептора BDNF тропомиозин киназы В (TrkB) (18). Взаимодействие BDNF с TrkB запускает несколько сигнальных путей, стимулирующих выживание, рост и дифференцировку нейронов, с участием митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), фосфолипазы (PLC) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), результатом которых является функциональная модуляция молекул-мишеней, участвующих в синаптической пластичности, выживании нейрона и клеточной возбудимости. Например, активация пути PLC приводит к изменению транскрипции генов за счет опосредованного Ca²⁺/кальмодулин-зависимой киназой II (CAMKII) фосфорилирования CREB (19).

чительной степени обеспечивается динамичностью и гибкостью регуляции глутаматергического синапса. Однако ценой высокой пластичности является селективная чувствительность таких структур мозга к развитию патологических процессов [50], и это также в полной мере относится к глутаматергическому синапсу, дис-



функция которого приводит к гиперглутаматергической трансдукции сигнала и развитию патологических изменений мозга [10].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-65-47029.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор не имеет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gulyaeva N.V. (2019) Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. Biochemistry (Mosc). 84(11): 1306–1328. https://doi.org/10.1134/S0006297919110087
- de Kloet E.R., Meijer O.C., de Nicola A.F., de Rijk R.H., Joëls M. (2018) Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. Front. Neuroendocrinol. 49: 124–145. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.003
- Prager E.M., Johnson L.R. (2009) Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. Sci. Signal. 2(86): re5. https://doi.org/10.1126/scisignal.286re5
- Gulyaeva N.V. (2017) Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. Biochemistry (Mosc). 82: 237–242. https://doi.org/10.1134/S0006297917030014

- 5. Xiong H., Krugers H.J. (2015) Tuning hippocampal synapses by stress-hormones: Relevance for emotional memory formation. Brain Res. 1621: 114-120. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.010
- 6. Gulvaeva N. (2019) Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress. Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. Neurochem. Res. 44: 1306–1322. https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0
- 7. Podgorny O.V., Gulyaeva N.V. (2020) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: Contribution of subgranular neurogenesis. J. Neurochem. https://doi.org/10.1111/jnc.15265
- 8. Kessels H.W., Malinow R. (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behaviour. Neuron. 61: 340 - 350.

https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015

- 9. Timmermans W., Xiong H., Hoogenraad C.C., Krugers H.J. (2013) Stress and excitatory synapses: from health to disease. Neuroscience. 248: 626-636. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.043
- 10. Gulyaeva N.V. (2020) Hippocampal hyperglutamatergic signaling matters: Early targeting glutamate neurotransmission as a preventive strategy in Alzheimer's disease: An. Editorial. Highlight for "Riluzole attenuates glutamatergic tone and cognitive decline in ABPP/PS1 mice". J. Neurochem.

https://doi.org/10.1111/jnc.15238

- 11. Halpain S., McEwen B.S. (1988) Corticosterone decreases 3H-glutamate binding in rat hippocampal formation. Neuroendocrinology. 48: 235-241. https://doi.org/10.1159/000125017
- 12. Armanini M.P., Hutchins C., Stein B.A., Sapolsky R.M. (1990) Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. Brain Res. 532: 7–12. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91734-x
- 13. Virgin C.E. Jr, Ha T.P., Packan D.R., Tombaugh G.C., Yang S.H., Horner H.C., Sapolsky R.M. (1991) Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. J. Neurochem. 57: 1422–1428. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08309.x
- 14. Sandi C. (1998) The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. Neural. Plast. 6: 41-52. https://doi.org/10.1155/NP.1998.41
- 15. Karst H., Joëls M. (2003) Effect of chronic stress on synaptic currents in rat hippocampal dentate gyrus neurons. J. Neurophysiol. 89: 625–633. https://doi.org/10.1152/jn.00691.2002
- 16. Kvarta M.D., Bradbrook K.E., Dantrassy H.M., Bailey A.M., Thompson S.M. (2015) Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses. J. Neurophysiol. 114: 1713-1724. https://doi.org/10.1152/jn.00359.2015
- 17. Martin S., Henley J., Holman D., Zhou M., Wiegert O., van Spronsen M., Joëls M., Hoogenraad C.C., Krugers H.J. (2009) Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity. PLoS One. 4(3): e4714. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004714
- 18. Groc L., Choquet D., Chaouloff F. (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. Nat. Neurosci. 11: 868-870. https://doi.org/10.1038/nn.2150
- 19. Conboy L., Sandi C. (2010) Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action. Neuropsychopharmacology. 35(3): 674–685. https://doi.org/10.1038/npp.2009.172
- 20. Choi G.E., Oh J.Y., Lee H.J., Chae C.W., Kim J.S., Jung Y.H., Han H.J. (2018) Glucocorticoidmediated ER-mitochondria contacts reduce AMPA receptor and mitochondria trafficking into cell terminus via microtubule destabilization. Cell Death Dis. 9: 1137. https://doi.org/10.1038/s41419-018-1172-v
- 21. Tse Y.C., Bagot R.C., Wong T.P. (2012) Dynamic regulation of NMDAR function in the adult brain by the stress hormone corticosterone. Front. Cell Neurosci. 6: 9. https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00009
- 22. Mikasova L., Xiong H., Kerkhofs A., Bouchet D., Krugers H.J., Groc L. (2017) Stress hormone rapidly tunes synaptic NMDA receptor through membrane dynamics and mineralocorticoid signalling. Sci. Rep. 7: 8053. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08695-3
- 23. Tse Y.C., Bagot R.C., Hutter J.A., Wong A.S., Wong T.P. (2011) Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. PLoS One. 6: e27215. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027215

- Krugers H.J., Alfarez D.N., Karst H., Parashkouhi K. van Gemert N., Joëls M. (2005) Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions. Hippocampus. 15: 697–703. https://doi.org/10.1002/hipp.20002
 - https://doi.org/10.1002/hipo.20092
- 25. Zhang Y., Sheng H., Qi J., Ma B., Sun J., Li S., Ni X. (2012) Glucocorticoid acts on a putative G protein-coupled receptor to rapidly regulate the activity of NMDA receptors in hippocampal neurons. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 302: E747–E58. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00302.2011
- Komatsuzaki Y., Hatanaka Y., Murakami G., Mukai H., Hojo Y., Saito M., Kimoto T., Kawato S. (2012) Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. PLoS One. 7: e34124. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034124
- Chaouloff F, Hémar A., Manzoni O. (2008) Local facilitation of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression by corticosteroneand dexamethasone. Psychoneuroendocrinology. 33: 686–691. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.12.013
- Hunter R.G., Bellani R., Bloss E., Costa A., McCarthy K., McEwen B.S. (2009) Regulation of kainate receptor subunit mRNA by stress and corticosteroids in the rat hippocampus. PLoS One. 4: e4328. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004328
- McCauley J.P., Petroccione M.A., D'Brant L.Y., Todd G.C., Affinnih N., Wisnoski J.J., Zahid S., Shree S., Sousa A.A., De Guzman R.M., Migliore R., Brazhe A., Leapman R.D., Khmaladze A., Semyanov A., Zuloaga D.G., Migliore M., Scimemi A. (2020) Circadian Modulation of Neurons and Astrocytes Controls Synaptic Plasticity in Hippocampal Area CA1. Cell Rep. 33: 108255.
- https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108255
 Sarabdjitsingh R.A., Jezequel J., Pasricha N., Mikasova L., Kerkhofs A., Karst H., Groc L., Joëls M. (2014) Ultradian corticosterone pulses balance glutamatergictransmission and synaptic plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 111: 14265–14270.
- https://doi.org/10.1073/pnas.1411216111
- Sarabdjitsingh R.A., Pasricha N., Smeets J.A., Kerkhofs A., Mikasova L., Karst H., Groc L., Joëls M. (2016) Hippocampal Fast Glutamatergic Transmission Is Transiently Regulated by Corticosterone Pulsatility. PLoS One. 11: e0145858. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145858
- 32. Yuen E.Y., Wei J., Yan Z. (2017) Molecular and Epigenetic Mechanisms for the Complex Effects of Stress on Synaptic Physiology and Cognitive Functions. Int. J. Neuropsychopharmacol. 20(11): 948–955.
 - https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx052
- 33. *Musazzi L., Treccani G., Popoli M.* (2015) Functional and structural remodeling of glutamate synapses in prefrontal and frontal cortex induced by behavioral stress. Front. Psychiatry. 6: 60. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2015.00060
- 34. Bonini D., Mora C., Tornese P., Sala N., Filippini A., La Via L., Milanese M., Calza S., Bonanno G., Racagni G., Gennarelli M., Popoli M., Musazzi L., Barbon A. (2016) Acute Footshock Stress Induces Time-Dependent Modifications of AMPA/NMDA Protein Expression and AMPA Phosphorylation. Neural. Plast. 2016: 7267865. https://doi.org/10.1155/2016/7267865
- 35. Nava N., Treccani G., Liebenberg N., Chen F., Popoli M., Wegener G., Nyengaard J.R. (2014) Chronic desipramine prevents acute stress-induced reorganization of medial prefrontal cortex architecture by blocking glutamate vesicle accumulation and excitatory synapse increase. Int. J. Neuropsychopharmacol. 18: pyu085. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu085
- Musazzi L., Tornese P., Sala N., Popoli M. (2017) Acute stress is not acute: sustained enhancement of glutamate release after acute stress involves readily releasable pool size and synapsin I activation. Mol. Psychiatry. 22: 1226–1227. https://doi.org/10.1038/mp.2016.175
- Toya S., Takatsuru Y., Kokubo M., Amano I., Shimokawa N., Koibuchi N. (2014) Early-life-stress affects the homeostasis of glutamatergic synapses. Eur. J. Neurosci. 40: 3627–3634. https://doi.org/10.1111/ejn.12728
- Karst H., Berger S., Erdmann G., Schütz G., Joëls M. (2010) Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 107: 14449–14454. https://doi.org/10.1073/pnas.0914381107
- Hartmann J., Dedic N., Pöhlmann M.L., Häusl A., Karst H., Engelhardt C., Westerholz S., Wagner K.V., Labermaier C., Hoeijmakers L., Kertokarijo M., Chen, Joëls M., Deussing J.M., Schmidt M.V. (2017) Forebrain glutamatergic, but not GABAergic, neurons mediate anxiogenic effects of the glucocorticoid receptor. Mol. Psychiatry. 22: 466–475. https://doi.org/10.1038/mp.2016.87

- Zhou J.J., Gao Y., Zhang X., Kosten T.A., Li D.P. (2018) Enhanced Hypothalamic NMDA Receptor Activity Contributes to Hyperactivity of HPA Axis in Chronic Stress in Male Rats. Endocrinology. 159: 1537–1546. https://doi.org/10.1210/en.2017-03176
- Caudal D., Rame M., Jay T.M., Godsil B.P. (2016) Dynamic Regulation of AMPAR Phosphorylation In Vivo Following Acute Behavioral Stress. Cell. Mol. Neurobiol. 36: 1331–1342. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0332-9
- 42. Caudal D., Godsil B.P., Mailliet F., Bergerot D., Jay T.M. (2010) Acute stress induces contrasting changes in AMPA receptor subunit phosphorylation within the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus. PLoS One. 5: e15282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015282
- 43. Pillai A.G., Arp M., Velzing E., Lesuis S.L., Schmidt M.V., Holsboer F., Joëls M., Krugers H.J. (2018) Early life stress determines the effects of glucocorticoids and stress on hippocampal function: Electrophysiological and behavioral evidence respectively. Neuropharmacology. 133: 307–318. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.001
- 44. *Gulyaeva N.V.* (2017) Interplay between Brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. Biochemistry (Mosc.). 82: 301–307.

https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.015

- 45. Joëls M., Pasricha N., Karst H. (2013) The interplay between rapid and slow corticosteroid actions in brain. Eur. J. Pharmacol. 719: 44–52.
- 46. Joëls M., de Kloet E.R. (2017) 30 Years of the mineralocorticoid receptor: The brain mineralocorticoid receptor: a saga in three episodes. J. Endocrinol. 234: T49–T66. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0660
- 47. Le Menuet D., Lombès M. (2014). The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. Steroids. 91: 11–19.
- https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00066
- 48. *Suri D., Vaidya V.A.* (2013). Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. Neuroscience. 239: 196–213.
- Гуляева Н.В. (2020) Физиологический континуум пластичности и патологии нервной системы. Интегративная физиология. 1: 294–302. [*Gulyaeva N.V.* (2020) Physiological continuum of plasticity and pathology of the nervous system. Integrative. Physiol. 1: 294–302. (In Russ)]. https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-4-294-302

Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity

N. V. Gulyaeva^{*a*, *b*, *}

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bScientific Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia

*e-mail: nata_gul@ihna.ru

Glucocorticoids released from the adrenal cortex under the influence of stress factors are the most important messengers in the integrative regulation of adaptive plasticity of the brain, executed by the neurohumoral hypothalamic-pituitary-adrenal system. Excitatory synapses are considered as key participants in synaptic plasticity and behavioral adaptation. The review presents the accumulated data on the mechanisms of glucocorticoid regulation of the glutamatergic synapse, primarily on the examples of the hippocampus and prefrontal cortex. Glucocorticoids, by triggering signal transduction through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors located on synaptic membranes and in the cytosol of glutamatergic neurons, regulate synapse plasticity at the level of pre – and postsynaptic compartments. Glucocorticoids modulate synapse excitability through changes in vesicular transport and glutamate release, and mediate changes in the expression, composition, and properties of ionotropic NMDA and AMPA receptors as well as other glutamate receptors. A detailed scheme of multiple regulatory mechanisms implemented in the glutamatergic synapse during the binding of glucocorticoids to specific receptors is presented.

Keywords: cortisol, corticosterone, glutamate receptors, glucocorticoid receptors, stress, mineralocorticoid receptors, glucocorticoid receptors, AMPA receptors, NMDA receptors

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 533-567

= обзоры ==

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ КАК ФАКТОРА ЭКСПОЗОМА НА РАБОТУ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2021 г. А. А. Федотова^{1, 2}, А. Б. Тяглик², А. В. Семьянов^{1, 2, 3, *}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

*E-mail: alexeysemyanov@gmail.com

Поступила в редакцию 29.01.2021 г. После доработки 17.02.2021 г. Принята к публикации 20.02.2021 г.

В обзоре рассмотрена концепция экспозома, который представляет собой совокупность взаимодействующих друг с другом факторов среды, оказывавших влияние на организм в течение всей жизни. Приведена классификация факторов экспозома, объединенных в три основные группы: внутренняя среда, образ жизни, внешняя среда. Особое внимание уделено анализу влияния диеты как фактора экспозома на работу головного мозга. Рассмотрены три основных режима питания, различающихся в зависимости от количества калорий и соотношения макронутриентов (жиров, белков и углеводов), входящих в их состав. Проанализированы основные молекулярные и клеточные механизмы кетогенной диеты, ограничения калорий и западной диеты в отношении функционирования головного мозга. Обсуждается ограниченность накопленных данных о влиянии диеты на нейрон-астроцитарные взаимодействия в мозге. Отдельная глава посвящена рассмотрению взаимосвязей между различными факторами экспозома в контексте влияния диеты, что часто упускают в исследованиях. Указывается на необходимость комплексного анализа работы головного мозга, позволяющего проследить функциональные взаимосвязи на разных уровнях организации (молекулярном, клеточном, органном). Это поможет систематизировать накопленные знания и положит начало разработке терапевтических подходов на основе индивидуального экспозома.

Ключевые слова: экспозом, кетогенная диета, ограничение калорий, западная диета, нейрон, астроцит

DOI: 10.31857/S0869813921040087

Принятые сокращения: АТФ – аденозинтрифосфат, АФК – активные формы кислорода, ацетил-КоА – ацетилкофермент А, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, НАД⁺ – окисленная форма никотинамиадениндинуклеотида, ЦНС – центральная нервная система, А1-рецептор – подтип 1 аденозинового рецептора, АМРК – adenosine monophosphate-activated protein kinase (протеинкиназа, активируемая аденозинмонофосфатом), BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга), IGF-1 – insulin-like growth factor 1 (инсулиноподобный фактор 1), К_{АТР}-каналы – АТФ-зависимые калиевые каналы, МСТ – monocarboxylate transporter (транспортер (переносчик) монокарбоксилата), mTOR – mechanistic target of гаратусіп (механистическая мишень рапамицина), VGLUT2 – vesicular glutamate transporter 2 (везикулярный транспортер глутамата 2).

ГЛОССАРИЙ

Внешняя среда — совокупность физических, химических и биологических факторов окружающей среды, влияющих на организм (например, радиация, климатические условия, химическое загрязнение, инфекционные агенты, микробиота).

Внутренняя среда — совокупность эндогенных факторов, которые определяются генетической программой организма и эпигеномом (например, гормональный фон, пол, возраст, уровень метаболизма).

Диета с сокращением числа потребляемых калорий (ограничение калорий) — диета, характеризующаяся ограничением среднего дневного потребления калорий ниже обычного (на 10–50%), без нарушения баланса основных питательных веществ.

Западная диета — диета, характеризующаяся превышением необходимого для жизнедеятельности организма количества потребляемых калорий, при этом 30—35% энергии обеспечивается за счет потребляемых жиров, 50—55% — за счет углеводов, 15% — за счет белков.

Кетогенная диета — диета, состав которой характеризуется кетогенным соотношением макронутриентов (жиров, белков, углеводов), при котором 70–80% энергии обеспечивается за счет потребляемых жиров, 15–25% — за счет белков, 5% — за счет углеводов.

Кетогенное соотношение диеты — это соотношение количества (выраженного в граммах) жиров к углеводам и белкам; чем выше значение данного показателя, тем сильнее степень кетоза.

Кетоз — метаболическое состояние, характеризующееся увеличением в крови уровня кетоновых тел, при котором снабжение организма энергией зависит в большей степени от жировых запасов, чем от глюкозы.

Метаболизм — совокупность всех химических превращений, происходящих в живой системе посредством серии последовательных катализируемых ферментами реакций (метаболических путей).

Образ жизни — совокупность индивидуальных привычек организма, включающих такие факторы, как употребление наркотических веществ, диета, уровень стресса и физической активности.

Ось взаимодействия — функциональная взаимосвязь между различными элементами организма, существующая на разных уровнях организации (органном, клеточном, молекулярном).

Экспозом — совокупность взаимодействующих между собой факторов (внешней среды, внутренней среды и образа жизни), оказывавших влияние на организм в течение всей жизни.

 Ca^{2+} события – ограниченные во времени и пространстве области повышения уровня Ca^{2+} в клетке или клеточных сетях [1].

введение

Концепция экспозома возникла как стратегия изучения взаимодействия генов и окружающей среды [2, 3]. Дополняя геном, экспозом обеспечивает исчерпывающее описание истории воздействия среды на онтогенез организма. Экспозом – это совокупность взаимодействующих между собой факторов, оказывавших влияние на организм в течение всей жизни. В структуре экспозома можно выделить три группы воздействий на организм: внутренняя среда, образ жизни, внешняя среда (рис. 1а). К первой группе относятся эндогенные факторы, характеризующие внутреннее состояние организма (метаболизм, гормональный профиль, воспаление, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, процесс старения). Вторая группа объединяет широкий спектр воздействий на организм, связанных с образом

жизни (наркотические вещества, физическая активность, диета, стресс, медицинские вмешательства, прием лекарственных препаратов, прививки и т.д.). К третьей группе относятся факторы окружающей среды (микробиота, инфекции, химические загрязнения, радиация, климатические факторы, социальное окружение). Одни и те же факторы могут быть отнесены к разным группам, например, микробиота может рассматриваться как фактор образа жизни или как фактор внешней среды. Следовательно, важно принимать во внимание перекрытия между тремя основными группами факторов экспозома и рассматривать их как взаимосвязанные.

Концепция экспозома получила широкое распространение в области психиатрии, где экспозом определяется как совокупность факторов внешней среды, которые вносят вклад в развитие психических заболеваний [4]. Описан аддитивный эффект взаимодействия между риском развития шизофрении при полигенной предрасположенности и влиянием факторов экспозома. Данный результат указывает на необходимость учитывать экспозом в патогенезе заболевания и корректировать его в терапевтических целях [5]. Недавно в сфере поведенческой нейронауки был предложен термин "психоэкспозом", описывающий воздействие факторов окружающей среды на степень психологической устойчивости. Предлагается использование данных детального анализа влияния психоэкспозома на поведение человека, которое ляжет в основу разработки образовательных и терапевтических программ, способствующих развитию адаптивного поведения [6]. Концепция экспозома также была применена для описания факторов, влияющих на развитие болезни Альцгеймера [7].

Функционирование отдельных органов описывают в рамках специфических разделов физиологии и зачастую не принимают во внимание их взаимодействия (нервные, гуморальные, гормональные) с другими органами. Такие взаимодействия между органами в ответ на воздействие факторов экспозома также называют осями взаимодействия (рис. 1b). Однако факторы экспозома могут оказывать воздействия и на оси, формируемые на клеточном уровне. Таким образом, можно определить макрооси как взаимодействия на уровне органов и микрооси как взаимодействия на уровне клеток (рис. 1b, с). Например, макроось легкие-мозг вовлечена в проникновение нейротоксинов в организм человека при наличии загрязнения воздуха и табачного дыма; макроось почки-сосудистая система-мозг вовлекается в снижение почечной функции, обусловленное нарушениями питания и артериальной гипертензией [7]. Аналогичные связи существуют между ЦНС и кишечником, в основе двустороннего взаимодействия которых лежат нейроэндокринные и иммунологические процессы. Кишечный микробиом, рассматриваемый специалистами гастроэнтерологии как часть кишечного экспозома, является одним из основных компонентов макрооси микробиота-кишечник-мозг [8]. Данная макроось отвечает за контроль и интеграцию функций кишечника и головного мозга и связывает эмоциональные и когнитивные центры мозга с функциями кишечника, включая иммунный ответ, кишечную проницаемость и нейроэндокринную регуляцию [9]. Таким образом, представляется актуальным исследование работы мозга в рамках концепции экспозома.

Диета является одним из ключевых факторов экспозома, оказывающих влияние на функционирование ЦНС. Метаболиты, поступающие в организм с пищей в виде липидов, белков и углеводов, используются клетками мозга в качестве основных источников энергии. Растущее число случаев ожирения по всему миру и связанные с ним когнитивные дисфункции [10] указывают на острую необходимость анализа эффектов, вызываемых различными диетами в отношении работы ЦНС.

Долгое время предпринимались попытки описать функции головного мозга только с точки зрения функционирования нейронов. Однако мозг является сложной системой, состоящей из разных типов клеток, взаимодействующих друг с другом и отвечающих на изменения окружающей среды [11]. К этим клеткам относятся глиальные клетки и клетки кровеносной системы. Глиальные клетки — это гетерогенная морфологически и функционально группа клеток, включающая микроглию и макроглию. Макроглия включает астроциты и олигодендроциты. На клеточном уровне могут быть определены микрооси взаимодействия. Например, микроось нейрон—астроцит—кровеносный сосуд (рис. 1с) регулирует локальный кровоток в зависимости от активности конкретной области головного мозга. Микроось олигодендроцит—астроцит—микроглия регулирует формирование, повреждение и восстановление миелина (рис. 1с) [12]. Факторы экспозома также оказывают свое действие посредством таких клеточных микроосей. Целью настоящего обзора является рассмотрение и обобщение имеющихся научных данных об изменениях, происходящих в ЦНС под влиянием различных режимов питания как одного из факторов экспозома, в частности, в контексте микрооси нейрон—астроцит.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА В МОЗГЕ

Метаболизм — совокупность всех химических превращений, происходящих в живой системе посредством серии последовательных катализируемых ферментами реакций (метаболических путей). Превращение предшественника в конечный продукт идет через серию промежуточных продуктов, или метаболитов. Ацетилко-фермент А (ацетил-КоА) является ключевым промежуточным продуктом метаболизма: он возникает при распаде белков, липидов и углеводов, служит в качестве предшественника многих соединений (жирных кислот, из которых из которых впоследствии синтезируются жиры, гликолипиды, фосфолипиды и другие производные, кетоновых тел, изопреноидов) и поглощается в катаболическом пути, известном как цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот) (рис. 2) [13].

В условиях, когда расщепление липидов и углеводов сбалансировано, ацетил-КоА включается в цикл Кребса. Процесс зависит от доступности оксалоацетата. В отсутствие углеводов или при нарушении их использования концентрация оксалоацетата снижается, поскольку оксалоацетат расходуется на образование глюкозы и поэтому не может конденсироваться с ацетил-КоА в цикле Кребса. В таких условиях расщепление жиров преобладает, и путь метаболизма ацетил-КоА смещается

Рис. 1. Экспозом и примеры функциональных макро- и микроосей взаимодействия, на которые он воздействует. (а) – схема экспозома как совокупности факторов, оказывавших влияние на организм человека в течение жизни (в центре). Факторы разделены на три группы: образ жизни, внутренняя среда и внешняя среда, которые представлены в виде перекрывающихся кругов. Область перекрытия кругов показывает, что факторы из разных групп сложным образом взаимодействуют друг с другом. Эффект каждого фактора на организм зависит от наличия и истории взаимодействия с другими факторами экспозома, например, факторы образа жизни дают разный эффект в зависимости от пола и возраста. К первой группе факторов относятся эндогенные факторы, характеризующие внутреннее состояние организма (метаболизм, гормональный профиль, окислительный стресс, процесс старения и т.д.). Вторая группа объединяет широкий спектр воздействий на организм, связанных с образом жизни организма (употребление наркотических веществ, физическая активность, диета, стресс и т.д.). К третьей группе относятся факторы окружающей среды (микробиота, инфекции, химические загрязнения, радиация, климатические факторы и т.д.). (b) – оси взаимодействия между органами (макрооси): микробиотакишечник-мозг, отвечает за контроль и интеграцию функций кишечника и головного мозга, включая иммунный ответ, кишечную проницаемость и нейроэндокринную регуляцию; почки-сосудистая система-мозг, вовлекается в снижение почечной функции, обусловленное нарушениями питания и артериальной гипертензией. (с) – оси взаимодействия между клетками (микрооси): нейрон-астроциткровеносный сосуд, вовлекается в регулирование локального кровотока в зависимости от активности конкретной области головного мозга; олигодендроцит-астроцит-микроглия, регулирует формирование, повреждение и восстановление миелина.





Рис. 2. Взаимосвязь обмена белков, жиров и углеводов. Под действием ферментов желудочно-кишечного тракта белки расщепляются до аминокислот (протеолиз). Аминокислоты участвуют в дальнейших превращениях. Выделяют кетогенные и глюкогенные аминокислоты. Глюкогенные аминокислоты при деградации образуют пируват и другие вещества, являющиеся промежуточными метаболитами цикла Кребса (2-оксоглутарат, сукцинил-КоА, фумарат, оксалоацетат, не показаны). Эти вещества при недостатке углеводов в организме превращаются в глюкозу (глюконеогенез). Глюкоза может запасена в виде гликогена, который в дальнейшем может расщепляться с образованием глюкозы. Продукты распада кетогенных аминокислот (ацетоацетат и ацетил-КоА) используются для синтеза кетоновых тел (ацетоацетата, β -гидроксибутирата и ацетона). Жиры метаболизируются с образованием глицерина и жирных кислот. Фосфорилирование глицерина приводит к образованию промежуточных продуктов (не показаны), включаемых в реакции глюконеогенеза. Катаболизм жирных кислот приводит к образованию ацетоацетил-КоА и ацетил-КоА, способных превращаться друг в друга. Они метаболизируется с образованием кетоновых тел. Углеводы расщепляются в пищеварительной системе до моносахаридов. Основным моносахаридом является глюкоза. Глюкоза метаболизируется с образованием ацетил-КоА, вступающего в цикл Кребса.

в сторону образования кетоновых тел — ацетоацетата и β -гидроксибутирата. Ацетон, образующийся из ацетоацетата, также является кетоновым телом. Кетоновые тела служат в качестве метаболического источника энергии, а также как субстраты процессов синтеза холестерина, жирных кислот и миелиногенеза. В ранний постнатальный период ацетоацетат и β -гидроксибутират, образующиеся в результате окисления содержащихся в материнском молоке липидов, являются предпочтительными субстратами [14]. Это обусловлено высокими энергетическими затратами, которые требуются для развития и процессов миелинизации в тканях мозга. Основным органом для образования кетоновых тел является печень. Из митохондрий печени кетоновые тела диффундируют в кровь и переносятся к периферическим тканям. Сердечная мышца и корковый слой почек предпочтительно используют в качестве источника энергии ацетоацетат, а не глюкозу. В противоположность этому глюкоза является главным энергетическим субстратом для мозга в условиях сбалансированного питания. При голодании и диабете мозг адаптируется к использованию ацетоацетата [14]. Среди диет, приводящих к смещению метаболизма в сто-

	Кетогенная диета	Ограничение калорий	Западная диета
Особенности состава диеты	Диета с кетогенным соот- ношением макронутриен- тов, при котором 70–80% энергии обеспечивается за счет жиров, 15–25% – за счет белков, 5% – за счет углеводов [16]	Сбалансированный состав, ограничение потребляе- мых калорий (на 10–50%) [20]	Превышение необходимо- го для жизнедеятельности организма количества по- требляемых калорий, при этом 30–35% энергии обес- печивается за счет жиров, 50–55% – за счет уплево- дов, 15% – за счет белков [23, 24]
Гликолиз	Снижение	Снижение	Увеличение
Липидный обмен	Активация липолиза и β-окисления жирных кислот	Активация липолиза и β-окисления жирных кислот	Подавление липолиза, запасание жиров

Таблица 1. Особенности кетогенной диеты, ограничения калорий и западной диеты

рону образования кетоновых тел (состояние кетоза), наиболее распространенными являются две – кетогенная диета и диета с сокращением числа потребляемых калорий (далее, ограничение калорий) (табл. 1). При этом развивается кетоз — метаболическое состояние, при котором снабжение организма энергией зависит в большей степени от жировых запасов, чем от глюкозы [15]. Кетогенная диета является низкоуглеводной диетой, состав которой характеризуется кетогенным соотношением макронутриентов, при котором 70-80% энергии обеспечивается за счет жиров, 15–25% – за счет белков, 5% – за счет углеводов [16]. Кетогенное соотношение показывает отношение количества жиров (выраженного в граммах) к углеводам и белкам; чем выше значение данного показателя, тем сильнее степень кетоза [17, 18]. Кетогенное соотношение позволяет определить, по какому пути будет протекать метаболизм: глюкоцентрическому или липоцентрическому. Критическим является процент белка в пище, поскольку высокое содержание белка может приводить к глюконеогенезу в условиях стресса и недостатка питательных веществ, увеличивая глюкоцентричность метаболизма [19]. Ограничение калорий заключается в ограничении среднего дневного потребления калорий ниже обычного (на 10-50%), без нарушения баланса основных питательных веществ [20-22].

Жиры являются основной формой депонирования энергии. Важной особенностью жиров является то, что при их гидролизе образуются два функционально различных продукта – жирные кислоты и глицерин. Глицерин в условия голодания или ограничения калорий используется в процессе глюконеогенеза и тем самым участвует в обеспечении глюкозой клеток мозга и других глюкозозависимых клеток. При окислении жирных кислот образуется аденозинтрифосфат (АТФ), используемый большинством тканей. В норме у взрослых животных количество жира в организме сохраняется в течение длительного времени на относительно постоянном уровне. Постоянство поддерживается, поскольку биосинтез и окисление триацилглицеролов (нейтральных жиров) протекают одновременно (для этих процессов устанавливается стационарное состояние). При ограничении калорий и в условиях кетогенной диеты активируется липолиз в жировой ткани, что приводит к увеличению концентрации жирных кислот в крови. Около 50% жирных кислот перерабатывается в печени в кетоновые тела. Однако мозг использует их в качестве источника энергии в меньшей степени, что связано с двумя факторами. Во-первых, скорость продукции $AT\Phi$ в результате окисления жирных кислот меньше, чем при использовании в качестве энергетического субстрата глюкозы. Во-вторых, процесс переноса жирных кислот через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) относительно медленный [25, 26]. Тем не менее, после прохождения через ГЭБ жирные

кислоты могут быть использованы как астроцитами, так и нейронами. Изменения метаболизма жирных кислот в астроцитах могут быть связаны с развитием патологий (болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера) [27]. Модуляция процесса окисления жирных кислот предлагается в качестве терапевтического подхода при лечении ишемии и глиобластомы [27]. Кетоновые тела поступают в мозг, используя облегченную диффузию при помощи переносчиков монокарбоксилата (monocarboxylate transporter, MCT). Транспорт кетоновых тел через ГЭБ зависит от изоформы переносчика и концентрации кетоновых тел в крови. Транспорт кетоновых тел, в отличие от транспорта глюкозы, не увеличивается при повышенной нейрональной активности [28]. Исследования на грызунах показали, что МСТ представлены во всем мозге, хотя экспрессия МСТ сильно варьирует в зависимости от типа клеток. Изоформа МСТ1 экспрессируется в эндотелиальных клетках и астроцитах [29]. Астроциты также экспрессируют МСТ4. МСТ1 и МСТ4 обладают низким сродством к β-гидроксибутирату [30]. Нейроны почти исключительно экспрессируют изоформу МСТ2, которая обладает высоким сродством к β-гидроксибутирату. Наличие МСТ2 в постсинапсе вместе с повышенной плотностью митохондрий [31] позволяет предположить, что эта изоформа играет важную роль в синаптической передаче. Таким образом, нейроны и (в меньшей степени) астроциты обладают способностью поглощать кетоновые тела. Профиль экспрессии МСТ1 и МСТ2 в различных структурах мозга консервативен у людей и грызунов [32].

Для полного понимания энергетических процессов в клетках мозга необходимо рассмотреть сотни различных реакций, однако мы остановимся только на ключевых процессах. Человеческий мозг составляет около 2% от общей массы тела, но энергетические затраты, необходимые для его работы, составляют примерно 25% от общих энергетических потребностей организма. Основным энергетическим субстратом для мозга является глюкоза. Метаболизм глюкозы в головном мозге аналогичен метаболизму в других тканях и включает три основных направления: гликолиз, протекающий в цитозоле клеток мозга, запасание глюкозы в форме гликогена и пентозофосфатный путь окисления глюкозы [33].

Гликолиз – это универсальный центральный путь катаболизма глюкозы. Ферментативное расщепление молекулы глюкозы в процессе гликолиза приводит к образованию пирувата. В зависимости от условий пируват может превращаться в лактат (анаэробные условия) или в ацетил-КоА (аэробные условия). Глиальные клетки, в особенности астроциты и олигодендроциты, метаболизируют глюкозу преимущественно гликолитическими путями, образуя из глюкозы лактат и пируват [33]. Лактат и пируват проникают через специализированный транспортер МСТ2 в нейроны, где метаболизируются в митохондриях в ходе цикла Кребса и окислительного фосфорилирования с образованием АТФ. В цитозоле нейронов присутствуют разные изоформы фермента лактатдегидрогеназы, катализирующего реакцию превращения лактата в пируват. Поддержание работы нейронов и нейропередачи в отсутствие глюкозы за счет лактата и пирувата играет нейропротекторную роль в условиях гипогликемии и ишемии [14]. Увеличение лактата встречается и в норме в ходе интенсивной физической нагрузки, концентрация лактата в крови может составлять от 3 до 10 мМ, а уровень окисления лактата в мозге может составлять до 20-25% от общей энергетической потребности мозга [14]. Высказываются различные гипотезы относительно использования лактата в головном мозге [34]. Ранее считалось, что даже при достаточном количестве глюкозы лактат является основным субстратом для поддержания активности нейронов [35]. Согласно современным данным, глюкоза также используется нейронами в качестве источника энергии, причем окисление глюкозы происходит в равной степени в астроцитах и нейронах *in vivo* [36, 37]. Усиление работы Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатазы (Na⁺/K⁺-АТФ-азы) в результате активации нейронов приводит к увеличению потребления АТФ, что активирует
как гликолитический путь, так и окислительное фосфорилирование в нейронах и астроцитах. Производство лактата в головном мозге во время активности нейронов происходит в результате гликолитического метаболизма, временно превышающего скорость окислительного фосфорилирования. Накопление лактата рассматривается как потенциально вредное, поэтому лактат должен либо удаляться через кровоток. либо потребляться клетками мозга, находящимися в неактивном состоянии [34]. Напротив, гипотеза лактатного шаттла предполагает, что глутамат, помимо модуляции возбудимости нейронов, стимулирует гликолиз, то есть утилизацию глюкозы [38]. Увеличение потребления глюкозы, вызванное активностью мозга, происходит в основном в астроцитах. Они метаболизируют глюкозу в процессе гликолиза для производства лактата. Специфический профиль экспрессии генов в астроцитах определяет тот факт, что в процессе аэробного гликолиза пируват преимущественно превращается в лактат и почти не используется в цикле Кребса [33]. Образуемый астроцитами лактат расходуется впоследствии для поддержания окислительного метаболизма активных нейронов [34, 39]. Основная критика гипотезы лактатного шаттла заключается в отсутствие прямых данных о том, что мозг использует лактат как основной источник энергии *in vivo* [40, 41]. Отмечается, что клеточные источники лактата в мозге остаются неизвестными и рискованно полагать, что лактат всегда образуется в астроцитах [40]. Накопленные экспериментальные данные скорее подтверждают, что в ответ на стимуляцию нейроны обладают способностью увеличивать собственный гликолиз, а также экспортировать, а не импортировать лактат [37].

Астроциты, в отличие от нейронов, могут сохранять запасы энергии в виде гликогена при избытке энергетического субстрата (глюкозы, пирувата или лактата). Использование гликогена в головном мозге может быть напрямую связано с низким уровнем внеклеточной глюкозы. Гликоген впоследствии может быть мобилизован с помощью гликогенфосфорилазы в виде глюкозы и метаболизирован до пирувата [42]. Хотя в нейронах активно работает ген, кодирующий гликогенсинтазу (ключевой фермент в метаболизме гликогена), готовая гликогенсинтаза постоянно расщепляется убиквитиновой системой клетки. Тем не менее гликоген способен накапливаться в нейронах в небольших количествах и полностью метаболизироваться с помощью гликогенфосфорилазы [43]. Накопление гликогена в нейронах сопровождает некоторые неврологические заболевания, например, болезнь Лафора [44]. Причиной агрегации гликогена при этом заболевании являются мутации в генах, кодирующих белки, участвующие в метаболизме гликогена (лафорин и малин) [45, 46]. Заболевание характеризуется нейродегенерацией, наличием генерализованных и фокальных эпилептических приступов, экстрапирамидными нарушениями, расстройством высших психических функций, деменцией [47].

Метаболизм мозга считается практически полностью окислительным [42]. Тем не менее, гетерогенность клеток мозга предполагает наличие в них разных метаболических систем. Для разных типов клеток характерен индивидуальный метаболических профиль, который меняется с возрастом. Например, нейроны могут использовать кетоновые тела, лактат и пируват в качестве альтернативных источников энергии, тогда как астроциты во взрослом мозге в большей степени зависят от глюкозы. В ранний постнатальный период (10 дней) альтернативные субстраты энергии усиливают активность астроцитов [48]. При развитии мозга источники энергии (глюкоза, кетоновые тела) используются для биосинтеза макромолекул, необходимых для пролиферации нейронов, образования синапсов и миелинизации [49]. Самым энергозатратным процессом во взрослом головном мозге является поддержание ионных градиентов через плазматическую мембрану, необходимые для генерации потенциала действия и нейротрансмиссии. Поддержание градиентов преимущественно происходит за счет работы Na⁺/K⁺-ATФ-азы, локализован-

ной в мембране нейронов и астроцитов. На работу данного ионного насоса приходится примерно 50% энергии, образующейся при окислении глюкозы в нервной системе. 80–85% от общей потребляемой энергии отражает нейротрансмиссию глутамата, а 10–15% – энергетические затраты на поддержание потенциала покоя. Нейроны представляют собой более энергозатратный тип клеток (80–85% потребностей мозга в энергии), чем клетки глии (5–15% потребностей) [14]. В астроцитах энергия используется для поддержания ионного обмена, работы транспортеров (например, для выведения лактата через МСТ4) и поддержания гомеостаза во внеклеточном пространстве [50].

При высоком кетогенном соотношении макронутриентов метаболизм сдвигается в сторону расщепления жиров, и мозг использует альтернативные источники энергии — кетоновые тела (β-гидроксибутират, ацетоацетат, ацетон). Образующийся βгидроксибутират метаболизируется в ацетил-КоА и поступает в цикл Кребса [30]. Важно отметить, что на данный момент нет однозначных данных о снижении уровня глюкозы при кетогенной диете в мозге здоровых животных [51]. Потребление глюкозы клетками мозга здоровых людей при кетогенной диете снижается, поскольку часть потребности митохондрий в глюкозе реализуется за счет использования в качестве источника энергии кетоновых тел. У людей с болезнью Альцгеймера в условиях кетогенной диеты, напротив, несмотря на наличие кетоза и метаболизацию кетоновых тел, потребление глюкозы клетками мозга не снижается [52–54].

Когда углеводы, липиды или белки поступают в количествах, превосходящих энергетические потребности организма, избыток калорий запасается в виде триацилглицеролов (жиров). Накопленный таким образом жир может быть в будущем использован для получения энергии, что позволяет организму адаптироваться к условиям голодания. Одной из диет, при которой потребление калорий превышает необходимое для жизнедеятельности организма, является западная диета. Она характеризуется превышением необходимого для жизнедеятельности организма количества потребляемых калорий, при этом энергия обеспечивается в основном за счет углеводов (50–55%) и жиров (30–35%) и в меньшей степени за счет белков (15%) [23, 24]. Таким образом, в отличие от кетогенной диеты, для западной диеты наряду с высоким содержанием жиров характерно высокое содержание углеводов. В организме имеется механизм, препятствующий перерасходу питательных веществ. Избыточное окисление жирных кислот ингибирует окисление глюкозы, а ее избыток подавляет распад жиров и окисление жирных кислот (при этом сама глюкоза переходит в жиры) [13]. В результате западная диета приводит к ожирению.

Хотя нейроны и астроциты различаются по метаболическому профилю, для них характерно метаболическое взаимодействие. Метаболизм глюкозы находится в пространственно-временной зависимости от нейрональной активности в областях мозга, задействованных в выполнении конкретных задач. У крыс во время плавания наблюдается увеличение метаболизма в мозжечке (область мозга, участвующая в координации движений) в области нейропиля [55]. В этой области колокализуются пресинаптические и постсинаптические окончания нейронов и астроциты, окружающие синаптические контакты. Такая морфологическая связь между астроцитами и нейронами, получившая название трехчастного синапса [56], усиливается функциональной взаимосвязью. В ответ на высвобождаемый нейронами глутамат, астроциты выделяют полученный из глюкозы лактат. Лактат используется для поддержания активности нейронов в качестве энергетического субстрата. Глюкоза обеспечивает основу для обновления нейронального пула глутамата. С помощью астроцитарной глутаминсинтазы глутамат превращается в глутамин. Глутамат, захватываемый астроцитами во время синаптической передачи, проходит такой же путь (глутамат-глутаминовый цикл). Таким образом, глутаматергическая передача

осуществляется благодаря тесному морфофункциональному взаимодействию астроцитов и нейронов [14].

Астроциты образуют сеть посредством соединения через щелевые контакты, что обеспечивает поддержание внеклеточного гомеостаза за счет буферизации ионов Ca²⁺, K⁺, молекул глутамата и глюкозы [57]. Считается, что астроциты критически вовлечены в транспорт глюкозы во внеклеточное пространство и поддержание концентрации глюкозы на постоянном уровне (0.5–1.5 мМ). Капилляры головного мозга окружены тонкими астроцитарными отростками, посредством которых происходит поглощение энергетических субстратов. Чтобы достичь областей мозга, удаленных от кровоснабжения, энергетические субстраты могут проходить через астроцитарные щелевые контакты, проницаемые для глюкозы, лактата, глутамата, глутамина. Образующиеся при активации нейронов промежуточные продукты метаболизма выступают в роли сигнальных молекул, вовлеченных в метаболическую передачу сигналов о необходимости пополнения запасов энергетических субстратов и усилении местного кровотока. Основными сигнальными агентами являются ионы К⁺ (высвобождаемые после потенциалов действия и во время синаптической передачи), глутамат (захватываемый астроцитами через глутаматные транспортеры, а также оказывающий влияние посредством активации расположенных на мембране астроцитов метаботропных рецепторов к глутамату), аммиак, уровень лактата, концентрация кислорода и агенты, способные к диффузии (NO, H₂O₂, супероксид-анион) [50].

Таким образом, нейроны и астроциты различаются по метаболическому профилю, однако образуемая ими микроось нейрон—астроцит—сосуд представляет собой единую метаболическую единицу. Диеты с различным содержанием жиров, белков и углеводов вызывают смещение метаболизма в сторону образования кетоновых тел (кетогенная диета, ограничение калорий) или в сторону усиления запасания жиров (западная диета) (табл. 1). В связи с этим необходимо провести анализ молекулярных механизмов кетогенной диеты, ограничения калорий и западной диеты и происходящих под их влиянием изменений в работе нейронов и астроцитов.

ВЛИЯНИЕ КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ НА РАБОТУ МОЗГА

Увеличение окислительного метаболизма кетоновых тел в митохондриях при кетогенной диете подавляет гликолиз (табл. 1, рис. 3) [58]. Происходит метаболический сдвиг, выражающийся в увеличении продукции АТФ митохондриями и уменьшении выработки АТФ в процессе гликолиза в цитоплазме.

Молекулярные эффекты кетогенной диеты

Воздействие кетогенной диеты на K_{ATP} -каналы. Производство АТФ в результате гликолиза играет важную роль в регуляции процессов на плазматической мембране, включая работу Na⁺/K⁺-ATФ-азы и АТФ-зависимых калиевых каналов (K_{ATP} -каналов) [59]. K_{ATP} -каналы широко представлены в головном мозге, в частности, в гипоталамусе [60] и гиппокампе [61], и являются связующим звеном между метаболизмом и возбудимостью нейронов. АТФ, образующийся в ходе гликолиза, ингибирует K_{ATP} -каналы [62]. При возбуждении в нейрон поступает избыток ионов Na⁺, которые затем удаляются Na⁺/K⁺-ATФ-азой для восстановления ионного баланса. Расходование молекул АТФ этим насосом в одном субмембранном компартменте с K_{ATP} -каналами приводит к их активации [61]. Например, повышенная активность респираторных нейронов ствола мозга мышей активирует K_{ATP} -каналы за счет работы Na⁺/K⁺-ATФ-азы [63]. Кетогенная диета



Рис. 3. Механизмы действия кетогенной диеты на работу мозга. Кетогенная диета смещает метаболизм в сторону образования кетоновых тел. (1) — в нейронах кетоновые тела метаболизируются в митохондриях. Происходит увеличение продукции АТФ митохондриями и уменьшение выработки АТФ в процессе гликолиза. В результате активируются АТФ-зависимые калиевые каналы, которые в нормальном состоянии заблокированы гликолитической АТФ. Повышение калиевой проводимости приводит к снижению возбудимости нейронов. (2) – кетогенная диета приводит к увеличению уровня ГАМК. Активация хлорных каналов ГАМКА-рецепторов вызывает гиперполяризацию нейронов и снижение их возбудимости. Активация аденозинкиназы на фоне кетогенной диеты приводит к повышению уровня аденозина. Аденозин подавляет нейрональную активность через А1-рецептор. (3) - кетогенная диета приводит к снижению возбуждающей передачи. Кетоновое тело ацетоацетат ингибирует везикулярный переносчик глутамата VGLUT2, что снижает эффективность загрузки глутамата в синаптические везикулы. (4) — кетоновые тела β-гидроксибутират и ацетоацетат выступают в роли антиоксидантов. β-гидроксибутират ингибирует продукцию АФК митохондриями и запускает антиоксидантную программу, приводящую к активации экспрессии антиоксидантных ферментов. (5) – кетогенная диета влияет на морфологию астроцитов. Наблюдается уменьшение разветвленности и размера астроцитов. При этом отсутствие маркеров глиоза не указывает на воспалительную реакцию, свидетельствуя о метаболической активации астроцитов в ответ на кетоз. АТ Φ – аденозинтрифосфат, А Φ K – активные формы кислорода, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, КАТР – АТФ-зависимые калиевые каналы, VGLUT2 – vesicular glutamate transporter 2 (везикулярный транспортер глутамата 2).

также приводит к уменьшению уровня АТФ вблизи мембраны, вызывая активацию K_{ATP} -каналов. Увеличение уровня β -гидроксибутирата усиливает активность K_{ATP} -каналов в гранулярных нейронах зубчатой фасции гиппокампа крыс [61], вероятно, за счет снижения уровня гликолитического АТФ. При этом блокада Na⁺/K⁺-ATФ-азы строфантидином предотвращает активацию K_{ATP} -каналов [61].

Таким образом, кетогенная диета приводит к изменению метаболического состояния нейронов и снижению их возбудимости за счет увеличения калиевой проводимости.

Влияние кетогенной диеты на путь mTOR. Путь mTOR (mechanistic target of rapamycin, механистическая мишень рапамицина) отвечает за контроль синтеза белков, транскрипции, аутофагии, метаболизма, биогенеза и сохранения органелл в клетке [64]. Белок mTOR выполняет роль сенсора питательных веществ, его активность может подавляться при снижении количества доступной глюкозы или увеличении уровня кетоновых тел [65]. Кетогенная диета в течение 16 нед. у мышей в возрасте 12-14 нед. снижает экспрессию белка mTOR и увеличивает уровень эндотелиальной синтазы оксида азота, которая регулирует работу макрооси сердечно-сосудистая система-мозг. На фоне диеты у мышей наблюдается усиление мозгового кровотока в области вентромедиального гипоталамуса, что может способствовать снижению риска развития болезни Альцгеймера за счет выведения β-амилоида [66]. Путь mTOR играет центральную роль в развитии рака [67]. Ингибирование пути mTOR является мощным противоопухолевым воздействием. В модели глиобластомы *in vivo* у мышей использование кетогенной диеты в течение одного месяца значительно снижает рост опухолевых клеток и увеличивает выживаемость животных. Опосредованные диетой противоопухолевые эффекты коррелируют со снижением экспрессии белка mTOR [68]. Таким образом, применение кетогенной диеты может значительно улучшить прогноз данного онкологического заболевания и увеличить процент выживаемости за счет ингибирования пути mTOR.

Антиоксидантное действие кетогенной диеты. Кетоновые тела играют важную роль в антиоксидантной защите, регулируя баланс активных форм кислорода (АФК) [69]. Как L-, так и D-изоформа β -гидроксибутирата и ацетоацетат выступают в роли антиоксидантов, нейтрализуя АФК [70]. Антиоксидантный эффект β -гидроксибутирата [71] обусловлен наличием гидроксильной группы [70]. Кроме того, β -гидроксибутирата и ацетоацетат выступают в роли антиохондриях нейронов неокортекса крыс показано, что сочетание β -гидроксибутирата и ацетоацетата снижает выработку АФК [72]. β -гидроксибутират также запускает антиоксидантную программу через регуляцию факторов транскрипции FOXO1, FOXO3 и NRF2, которые активируют экспрессию антиоксидантных ферментов [69].

Нейромедиаторы, вовлеченные в действие кетогенной диеты. Состояние кетоза активирует работу глутаматдекарбоксилазы – фермента, катализирующего преобразование глутамата в ГАМК. Это приводит к снижению уровня глутамата и повышению уровня ГАМК [73]. Последнее вызывает гиперполяризацию нейронов за счет увеличения хлорной проводимости через каналы ГАМК_д-рецепторов [73]. Гиперполяризация снижает возбудимость нейронов посредством влияния на потенциалзависимые каналы, участвующие в формировании потенциала действия. Кроме того, на фоне кетогенной диеты увеличивается захват глутамата астроцитами из синаптической щели и внеклеточного пространства [74]. Астроциты возвращают глутамат в пресинаптический нейрон в виде глутамина (глутамат-глутаминовый цикл). Ацетоацетат снижает высвобождение глутамата нейронами за счет блокады везикулярного переносчика глутамата VGLUT2 (который обеспечивает загрузку глутамата в везикулы), конкурируя с хлоридом за участок аллостерической регуляции. Это приводит к снижению возбуждающей передачи в нейронах поля СА1 гиппокампа [74]. Таким образом, влияние кетогенной диеты на уровни ГАМК и глутамата снижает возбудимость нейронов и способствует уменьшению возбуждающей глутаматергической передачи.

Влияние кетогенной диеты на аденозин. Кетогенная диета вызывает повышение уровня аденозина в головном мозге [75]. Известно, что увеличение количества аде-

нозина наблюдается при возрастании энергетических потребностей клеток мозга, например, при повышенной активности нейронов [76]. Кетогенная диета снижает уровень аденозинкиназы — фермента, катализирующего превращение аденозина в аденозинмонофосфат, что приводит к увеличению содержания внеклеточного аденозина в головном мозге [75]. В гиппокампе и коре головного мозга мышей внеклеточный аденозин подавляет активность нейронов через подтип 1 аденозинового рецептора (А1-рецептор), который расположен на пре- и постсинаптической мембранах [77]. Таким образом, опосредованные аденозином эффекты кетогенной диеты приводят к уменьшению возбудимости нейронов.

Клеточные эффекты кетогенной диеты

В мозге крыс в возрасте 6 мес. кетогенная диета приводит к морфологическим изменениям глиальных клеток. Происходит увеличение ветвления отростков микроглии и уменьшение размеров и разветвленности астроцитов [78]. Такие морфологические изменения астроцитов характерны для воспаления, однако маркеры глиоза в исследовании не обнаружены. Следовательно, изменения морфологии астроцитов следует интерпретировать как реакцию на кетоз, а не как воспалительный процесс. Это указывает на важную роль глиальных клеток в метаболизме мозга. Тем не менее, количество исследований, посвященных влиянию кетогенной диеты на морфофункциональные характеристики глии, ограничено. Основная часть работ по изучению клеточных механизмов кетогенной диеты посвящена нейронам. Нейропротекторный эффект кетогенной диеты показан в различных моделях заболеваний. В мышиной модели бокового амиотрофического склероза (линия SOD1-G93AB) кетогенная диета снижает степень атрофии двигательных нейронов в спинном мозге и замедляет развитие нарушений двигательной координации [79]. Митохондриальная дисфункция играет центральную роль в нейродегенерации при данном заболевании, которая компенсируется за счет способности β-гидроксибутирата стимулировать выработку АТФ [79]. В экспериментальных моделях инсульта и ишемии головного мозга кетогенная диета приводит к снижению степени атрофии нейронов у крыс [80, 81]. У мышей нейропротекторный эффект кетогенной диеты заключается в уменьшении объема ишемического инсульта и усилении местного кровотока [82] за счет увеличения уровня аденозина в головном мозге [76]. Кетоновые тела способствуют уменьшению глутаматергической передачи и предупреждают повреждение нервных клеток за счет снижения эксайтотоксичности глутамата [83].

Системные эффекты и терапевтическое значение кетогенной диеты

Кетогенная диета широко известна своим противоэпилептическим действием. Применение кетогенной диеты для лечения эпилепсии было предложено в начале 20-х годов прошлого века, и с 1990-х эта диета используется как способ лечения лекарственно-резистентных форм эпилепсии [84]. Уменьшение глутаматергической передачи на фоне кетогенной диеты приводит к снижению возбудимости нейронов [74]. В различных моделях эпилепсии противоконвульсивный эффект кетогенной диеты связывают со снижением порога возникновения, уменьшением интенсивности эпилептического приступа и его отсрочкой [85]. Тем не менее хроническое использование β -гидроксибутирата на органотипической культуре гиппокампа не приводит к блокаде фармакологически индуцированной эпилептиформной активности [86]. Это может быть связано с физиологическими особенностями органотипической ткани. Один из механизмов снижения возбудимости нейронов опосредован аденозиновой сигнализацией [87]. Так, в пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс на фоне кетогенной диеты наблюдается длительное снижение частоты воз

никновения приступов. Инъекция глюкозы или DPCPX, блокатора A1-рецептора, нивелирует этот эффект [88]. В той же модели эпилепсии у крыс наблюдается уменьшение количества дистальных отростков астроцитов и изменение кальциевой активности в этих клетках [89]. Следовательно, особую важность представляют исследования влияния кетогенной диеты на астроцитарную морфологию при эпилепсии. Данные клинических исследований указывают на снижение количества приступов у детей в краткосрочном (3 мес.) и долгосрочном (более 6 мес.) периодах на фоне кетогенной диеты [90, 91]. Остается нерешенным вопрос, какие молекулярные механизмы кетогенной диеты обеспечивают снижение эпилептической активности у людей.

Кетогенная диета может применяться при лечении нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [83] и болезнь Паркинсона [21]. Наблюдаемый у пациентов с болезнью Альцгеймера гипометаболизм глюкозы может быть частично компенсирован за счет кетогенной диеты, восполняющей уровень $AT\Phi$ за счет продукции кетоновых тел [83]. Поскольку нейродегенеративные заболевания сопровождаются окислительным стрессом, развивающемся за счет продукции АФК, антиоксидантный эффект кетоновых тел может играть важную роль для улучшения прогноза заболевания [92]. Кетогенная диета приводит к достоверному улучшению баллов унифицированной шкалы оценки заболевания Международного общества изучения двигательных расстройств (UPDRS) при болезни Паркинсона, способствует снижению тремора в состоянии покоя, улучшению равновесия, походки, эмоционального фона [93]. Защитный эффект β-гидроксибутирата против нейротоксичности, вызванной нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином, предполагает, что продолжительное увеличение уровня кетоновых тел помогает отсрочить прогрессирование идиопатической формы болезни Паркинсона [94, 95]. У детей в возрасте от 4 до 10 лет с расстройством аутистического спектра кетогенная диета приводит к достоверному улучшению показателей рейтинговой шкалы детского аутизма (CARS), однако диета менее эффективна при тяжелой форме заболевания [96].

Несмотря на отмеченное положительное влияние кетогенной диеты, ее долгосрочные эффекты могут быть негативными. В литий-пилокарпиновой модели эпилепсии у молодых крыс (в возрасте 53—57 дней на момент тестирования) обнаружено значительное уменьшение размеров головного мозга на фоне диеты [97], а также нарушение зрительно-пространственной памяти. Это проявляется в увеличении латентного периода при поиске скрытой платформы в водном лабиринте Морриса. Общая частота эпилептических приступов при этом снижается [97]. Необходимы дополнительные исследования для оценки долгосрочных последствий применения кетогенной диеты в отношении работы мозга.

Таким образом, влияние кетогенной диеты обусловлено производством кетоновых тел. Кетоновые тела усиливают митохондриальный метаболизм, снижают возбудимость нейронов (за счет активации К_{АТР}-каналов, увеличения уровней ГАМК и аденозина) и возбуждающую глутаматергическую передачу, являются антиоксидантами. Описанные молекулярные и клеточные механизмы опосредуют противоэпилептический и нейропротекторный эффект кетогенной диеты (рис. 3).

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С СОКРАЩЕНИЕМ ЧИСЛА ПОТРЕБЛЯЕМЫХ КАЛОРИЙ НА РАБОТУ МОЗГА

Ограничение калорий, как и кетогенная диета, приводит к переходу от углеводного метаболизма к липидному и сопровождается усиленным образованием кетоновых тел.

Молекулярные эффекты ограничения калорий

Выделяют четыре основных молекулярных механизма, лежащих в основе влияния ограничения калорий на работу мозга: (1) путь mTOR, (2) путь протеинкиназы, активируемой аденозинмонофосфатом (AMPK), (3) сигнальный путь IGF-1/инсулина (insulin-like growth factor 1, инсулиноподобный фактор 1) и (4) путь сиртуина [20].

Влияние ограничения калорий на путь mTOR. Мутации, встречающиеся в пути mTOR, связаны с дисплазией, эпилепсией, расстройствами развития ЦНС, включая туберозный склероз, синдром Каудена, нейрофиброматоз типа 1 [98]. Предполагается, что противоэпилептический эффект ограничения калорий может быть частично обусловлен ингибированием пути mTOR. Ограничение калорий на 15% уменьшает фосфорилирование протеинкиназы В и рибосомного белка S6 в неокортексе и гиппокампе у крыс, что свидетельствует об ингибировании каскада mTOR. Отмечается повышение порога потенциала действия, оказывающее противо-судорожный эффект [99]. Таким образом, ингибирование пути mTOR в результате ограничения калорий опосредует противоэпилептический эффект данной диеты.

Влияние ограничения калорий на путь AMPK. AMPK – это фермент, принимающий участие в регуляции энергетического гомеостаза клетки. При уменьшении энергетических запасов в клетке происходит переключение клеточной программы пролиферации и роста в сторону катаболизма питательных веществ. У мышей в возрасте 8 мес. при ограничении калорий на 20% в течение 2 мес. отмечается увеличение экспрессии фермента AMPK. На поведенческом уровне это проявляется в улучшении гиппокамп-зависимого пространственного обучения в водном лабиринте Морриса [100]. У крыс при индукции эпилепсии по типу киндлинга ограничение калорий на 15% вызывает увеличение фосфорилирования AMPK в гиппокампе и неокортексе. Повышенная активность AMPK приводит к ингибированию пути mTOR [64]. Такие молекулярные изменения опосредуют противосудорожный эффект ограничения калорий в этой модели эпилепсии [99]. Таким образом, за счет увеличения активности пути AMPK ограничение калорий оказывает нейропротекторное действие и противосудорожный эффект, опосредованный ингибированием пути mTOR.

Влияние ограничения калорий на сигнальный путь IGF-1/инсулина. Сигнальный путь IGF-1/инсулина играет важную роль в функционировании ЦНС. При развитии головного мозга активность пути IGF-1/инсулина обеспечивает выживаемость нейронов за счет активации нейротрофических факторов. При старении активность данного пути снижается, что связано с увеличением уровня окислительного стресса и необходимостью активации антиоксидантной защиты [101]. На фоне ограничения калорий на 30% у мышей при старении наблюдается снижение экспрессии белка IGF-1 и его рецептора в гиппокампе. Снижение активности пути IGF-1/инсулина приводит к увеличению экспрессии фактора транскрипции FOXO3 [101]. FOXO3 способствует снижению окислительного стресса, оказывая нейропротекторное действие. В модели инсульта у крыс линии Sprague-Dawley ограничение калорий на 30% приводит к значительному снижению уровня инсулина и IGF-1 в сыворотке крови [102]. Ограничение калорий в течение 8 нед. (начиная с возраста 20 мес.) перед индукцией инсульта улучшает восстановление, связанное с кожной чувствительностью, сенсомоторной интеграцией и пространственной памятью (тест на оценку функциональной асимметрии, тест "вращающийся стержень" и водный лабиринт Морриса соответственно) [102]. Таким образом, сигнальный путь IGF-1/инсулина опосредует нейропротекторный эффект ограничения калорий при старении и травмах головного мозга.

Влияние ограничения калорий на путь сиртуина. Сиртуиновые белки являются никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺)-зависимыми деацетилазами, которые регулируют активность белков, вовлеченных в метаболизм и обеспечение выжива-

емости клеток [20]. Сниженная экспрессия сиртуина 1 ассоциирована с процессами нейродегенерации. Например, уменьшение уровня сиртуина 1 наблюдается у пациентов с болезнью Альцгеймера [103]. Ограничение калорий, напротив, приводит к увеличению экспрессии данного белка в головном мозге мышей [104], что связывают с нейропротекторным эффектом данной диеты [20].

Клеточные эффекты ограничения калорий

Влияние ограничения калорий на процесс аутофагии. Аутофагия – катаболический процесс, который обеспечивает удаление неправильно свернутых или агрегированных белков и поддерживает гомеостаз органелл в цитоплазме клетки. Нарушение аутофагии сопровождает болезни Альцгеймера, Паркинсона, Крейтцфельдта-Якоба, мультисистемную атрофию, связанные с нарушением структуры белков и их аккумуляцией [105]. Между процессом аутофагии (катаболизм) и активностью пути mTOR (анаболизм) существует отрицательная обратная связь: увеличение активности пути mTOR ингибирует процесс аутофагии [106]. Ограничение калорий на 30% в течение 10 мес. у мышей уменьшает экспрессию mTOR в гиппокампе, что указывает на увеличение уровня аутофагии. В поведении это проявляется в виде улучшения пространственной памяти в водном лабиринте Морриса [107]. В модели черепно-мозговой травмы у мышей краткосрочное (1 мес.) ограничение калорий на 30% приводит к уменьшению экспрессии mTOR и глиального кислого фибриллярного белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) в гиппокампе. Это свидетельствует об увеличении процесса аутофагии и уменьшении реактивности астроцитов, что сопровождается улучшением гиппокамп-зависимой памяти в водном лабиринте Морриса [108]. Таким образом, ограничение калорий играет защитную роль при старении и травмах ЦНС за счет активации процесса аутофагии.

Влияние ограничения калорий на морфофункциональные свойства астроцитов. Недавно обнаружено, что ограничение калорий на 30% в течение одного месяца до начала эксперимента изменяет морфофункциональные характеристики астроцитов мышей в возрасте 2–3 мес. [109]. На фоне диеты отмечается увеличение объемной доли дистальных перисинаптических астроцитарных листочков. Изменение морфологии астроцитов способствует повышению эффективности захвата ими K⁺ и глутамата из синаптической щели. Эти изменения усиливают синаптическую пластичность, увеличивая амплитуду долговременной потенциации в гиппокампе. Наблюдается увеличение длительности Ca²⁺-событий в астроцитах одновременно с уменьшением их размера, снижается амплитуда интенсивности кальциевого сигнала. Изменение описанных пространственно-временных характеристик кальциевой динамики в астроцитах свидетельствует о функциональных перестройках астроцитов [109].

Системные эффекты и терапевтическое значение ограничения калорий

В многочисленных исследованиях, от дрозофилы до человека, ограничение калорий связывают с увеличением средней продолжительности жизни и замедлением ухудшения когнитивных функций в процессе старения [110]. Отмечается, что как небольшое ограничение калорий (на 10%), так и существенное ограничение (на 40%) увеличивают продолжительность жизни [111]. Поскольку известно, что ограничение потребления белка также может влиять на продолжительность жизни, важное значение имеет анализ экспериментальных работ с различной степенью ограничения калорий с учетом состава диеты. На основе такого комплексного анализа сделан вывод о том, что положительный эффект диеты с сокращением числа потребляемых калорий достигается именно за счет ограничения калорий, а не

вследствие снижения потребления белка (или сахарозы, и, возможно, жиров, в пище) [112].

Противоэпилептический эффект ограничения калорий. Ограничение калорий широко применяется в различных моделях эпилепсии в качестве терапии. Ограничение калорий на 40% в течение 6 мес. у крыс предотвращает дегенерацию ГАМКергических нейронов в гиппокампе и энторинальной коре, которая наблюдается после введения каиновой кислоты, вызывающей судорожные приступы [98]. У крыс при индукции эпилепсии по типу киндлинга в амигдале ограничение калорий на 15% увеличивает порог возникновения эпилептической активности и снижает ее продолжительность [99]. У мышей линии EL, используемой в качестве модели эпилепсии, ограничение калорий на 15% приводит к снижению частоты возникновения эпилептических приступов, что сопровождается понижением уровня глюкозы в крови [113]. Таким образом, ограничение калорий обладает противоэпилептическим действием, которое может быть опосредовано уменьшением гликолитического обмена в мозге.

Эффекты ограничения калорий при старении. С середины 30-х годов XX века известно, что длительное ограничение калорий (в течение 700-900 дней) увеличивает продолжительность жизни у крыс, причем у самцов эффект выражен сильнее, чем у самок [114]. Положительный эффект ограничения калорий при старении показан в 20-летнем лонгитюдном исследовании на макаках-резусах. При ограничении калорий наблюдается уменьшение числа случаев диабета и замедление атрофии серого вещества головного мозга [115], при этом возраст животных на момент начала диеты является определяющим фактором ее эффективности [116]. Ограничение калорий на 40% у самок мышей препятствует возрастным нарушениям двигательно-моторной координации в тесте "вращающийся стержень" и оказывает положительный эффект на процессы формирования и хранения пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Позднее начало диеты (в возрасте 66 нед.) не приводит к улучшению пространственного обучения [117]. Ограничение калорий на 35% у крыс препятствует возрастному снижению пластичности в гиппокампе, сопровождающемуся нарушением долговременной потенциации. Замедление старения головного мозга при ограничении калорий связывают с поддержанием нормального кровотока и целостности белого вещества. Эффект обеспечивается за счет увеличения нейрогенеза в гиппокампе и снижения окислительного стресса при помощи нейропротекторных факторов, включая белок теплового шока HSP-70 и глюкозорегулируемый белок теплового шока GRP-78 [118].

Таким образом, ограничение калорий, как и кетогенная диета, приводит к образованию кетоновых тел. Это способствует снижению окислительного стресса и оказывает нейропротекторный эффект (рис. 4). В отличие от кетогенной диеты ограничение калорий не оказывает влияние на К_{АТР}-каналы [119]. Противосудорожное действие обеспечивается молекулярным путем mTOR, ингибирование которого может дополнительно происходить за счет активации AMPK. На клеточном уровне ограничение калорий усиливает процесс аутофагии и изменяет морфофункциональные характеристики астроцитов.

ВЛИЯНИЕ ЗАПАДНОЙ ДИЕТЫ НА РАБОТУ МОЗГА

В отличие от кетогенной диеты, западная диета характеризуется превышением необходимого для жизнедеятельности организма количества потребляемых калорий, при этом большая часть энергии обеспечивается за счет жиров и углеводов [23]. Это приводит к смещению метаболизма в сторону усиления запасания жиров.



Рис. 4. Механизмы действия диеты с сокращением числа потребляемых калорий. (1) – путь mTOR отвечает за контроль синтеза белков, транскрипции, аутофагии, метаболизма, биогенеза и сохранения органелл в клетке. Ограничение калорий приводит к ингибированию каскада mTOR. Отмечается повышение порога потенциала действия, что оказывает противосудорожный эффект. (2) – повышение активности AMPK при ограничении калорий также приводит к ингибированию пути mTOR, что оказывает противосудорожное действие. Кроме того, увеличение экспрессии АМРК на фоне ограничения калорий связывают с нейропротекторным эффектом. Снижение активности сигнального пути IGF-1/инсулина при ограничении калорий приводит к увеличению экспрессии фактора транскрипции FOXO3 (не показан). FOXO3 способствует снижению окислительного стресса, оказывая нейропротекторный эффект. Сиртуин регулирует активность белков, вовлеченных в метаболизм и обеспечение выживаемости клеток. Уровень сиртуина увеличивается при ограничении калорий, что связывают с нейропротекторным эффектом этой диеты. (3) – при ограничении калорий активируется процесс аутофагии. Аутофагия направлена на удаление неправильно свернутых или агрегированных белков и поддержание гомеостаза органелл в клетке. Повышение процесса аутофагии на фоне диеты, особенно при старении, опосредует нейропротекторный эффект. (4) - ограничение калорий влияет на морфофункциональные характеристики астроцитов. Происходит увеличение количества тонких астроцитарных отростков, что приводит к повышению эффективности захвата К⁺ и глутамата из синаптической щели и увеличению амплитуды синаптической потенциации. АМРК – протеинкиназа, активируемая аденозинмонофосфатом, IGF-1 – инсулиноподобный фактор 1, mTOR –механистическая мишень рапамицина.

Молекулярные эффекты западной диеты

Молекулярные механизмы западной диеты изучены мало. Западная диета может вызывать проявления воспалительной реакции, связанные с увеличением уровня окислительного стресса, что отрицательно влияет на когнитивные функции. Западная диета приводит к увеличению наработки мРНК, кодирующих провоспалительные цитокины в гиппокампе, включая фактор некроза опухоли-α и интерлейкин-1β. Изменения в воспалительном профиле гиппокампа проявляются в виде нарушения пространственного распознавания у крыс [120]. Увеличение уровня провоспалительных факторов при западной диете связывают со сниженной экспрессией BDNF (brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга) в гиппокампе и коре. BDNF контролирует процесс синаптической пластичности, лежащей в основе процессов обучения и памяти [121]. Механизм влияния западной диеты на уровень экспрессии BDNF остается неизвестным. Molteni с соавт. [121] показали, что физическая активность может модулировать эффекты западной диеты. Западная диета нарушает экспрессию белков, обеспечивающих нейропластичность (BDNF, синапсина 1, GAP-43 и CREB). Нарушение их экспрессии и пространственного восприятия не наблюдается, если крысам предоставлять доступ к беговому колесу в течение 2 мес. в ходе диеты. Наличие физической активности в условиях западной диеты снижает уровень окислительного стресса. Было выдвинуто предположение, что окислительный стресс является ранним эффектом такой диеты. В результате происходит формирование АФК, что приводит к уменьшению экспрессии BDNF и когнитивному дефициту (рис. 5) [122].

Клеточные эффекты западной диеты

Одним из ключевых последствий применения западной диеты является нарушение проницаемости ГЭБ, приводящее к метаболическим и когнитивным расстройствам [123–125]. Наблюдается снижение активного транспорта через ГЭБ гормонов гипоталамуса, участвующих в регуляции пищевого поведения – грелина [126], отвечающего за чувство голода, и лептина, контролирующего чувство насыщения [127]. Помимо гормональных изменений, нарушение проницаемости ГЭБ на фоне западной диеты связывают с когнитивным дефицитом в модели гиппокамп-зависимого ассоциативного обучения у крыс [123–125]. Дисфункция ГЭБ усугубляет течение болезни Альцгеймера, поскольку способствует накоплению β-амилоида в лимбической системе и неокортексе [128, 129]. β-амилоид является маркером данного заболевания и отражает степень патологии. Сопутствующее нейровоспаление, в свою очередь, может модулировать проницаемость ГЭБ [130–132].

Кроме того, западная диета приводит к повышению активации микроглии [133], что проявляется в снижении эффективности выполнения гиппокамп-зависимого теста "радиальный лабиринт" у крыс [134].

Системные эффекты западной диеты

Метаболический синдром и инсулинорезистентность. Инсулин контролирует необходимый уровень экспрессии транспортеров глюкозы и их доставку в клеточную мембрану [135], что важно для нормального функционирования мозга. Избыток веса, вызванный применением западной диеты, связан с нарушением инсулиновой сигнализации. У мышей это проявляется в снижении уровня экспрессии нейрональных транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT3 на 40% по сравнению с контролем, что вызывает дефицит поступления глюкозы в головной мозг [136]. У мышей в возрасте 2 мес., подвергнутых западной диете в течение 3 мес., наблюдается ожирение в сочетании с системной инсулинорезистентностью и нарушением регуляции липидного обмена. Животные демонстрируют депрессивно-подобное поведение, при этом признаки тревожности и ухудшения памяти отсутствуют [137]. Высокий уровень экспрессии рецептора инсулина в гиппокампе и коре головного мозга [138] указывает на важную роль инсулина в регуляции синаптической пластичности, лежащей в основе процессов обучения и памяти. Периферическая инсулинорезистентность, вызванная западной диетой, приводит к ухудшению этих процессов и связана с повышенным риском развития деменции у людей [139].



Рис. 5. Механизм действия западной диеты на работу мозга. На фоне западной диеты повышаются уровни провоспалительных факторов IL1 β и TNF- α . Провоспалительные факторы приводят к увеличению образования АФК, что способствует развитию окислительного стресса. Окислительный стресс запускает реактивную перестройку астроцитов. Морфологические и функциональные изменения астроцитов, связанные с реактивностью, приводят к нарушению синаптической пластичности. Это проявляется в уменьшении экспрессии BDNF в нейронах. АФК – активные формы кислорода. BDNF – brainderived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга), IL1 β – Interleukin 1 β (интерлейкин 1 β), TNF- α – tumor necrosis factor alpha (фактор некроза опухоли α).

У мышей западная диета приводит к ухудшению гиппокамп-зависимой памяти в тесте Y-образный лабиринт, при этом степень функциональных изменений в мозге зависит от процентного содержания жиров в пище [140]. Западная диета широко распространена в современном обществе и способствует росту случаев ожирения по всему миру. Под влиянием западной диеты развивается метаболический син-

дром, то есть состояние организма, при котором наблюдаются три или более из перечисленных патологических состояний: абдоминальное ожирение, высокое содержание глюкозы и/или холестерина в крови, повышенное кровяное давление, инсулинорезистентность [141]. Развитие инсулинорезистентности, одного из ключевых проявлений метаболического синдрома, традиционно рассматривается с глюкоцентрической точки зрения, согласно которой глюкотоксичность играет ведущую роль при данной патологии. Однако в настоящее время известно, что липотоксичность за счет увеличения уровня жирных кислот в крови также вносит значительный вклад в развитие инсулинорезистенции при метаболическом синдроме (липоцентрическая гипотеза) [142]. Вредное воздействие западной диеты обусловлено ее аддиктогенностью [143]. Часто на фоне ожирения двигательная активность организма снижается. Особенностью метаболизма углеводов является уменьшение расходования энергии в состоянии покоя. Таким образом, на фоне западной диеты организм переходит в режим быстрого насыщения как на метаболическом, так и на поведенческом уровне. Сокращение углеводов при кетогенной диете, напротив, приводит к снижению свободного потребления энергии и увеличению расхода энергии в покое и при активности [144].

Западная диета приводит к увеличению риска развития деменции [128]. Западная диета значительно усугубляет болезнь Альцгеймера, способствуя усилению процессов нейродегенерации [145] и увеличивая число реактивных астроцитов, то есть астроцитов, претерпевающих морфофункциональные перестройки в ответ на повреждение, заболевание или инфекцию ЦНС [146]. У мышей линии APPswe/PS1, являющихся моделью болезни Альцгеймера, на фоне западной диеты ухудшается формирование пространственной памяти (в тесте "T-образный лабиринт") и способности к обучению (в тесте на распознавание объектов) [147]. В модели нейродегенерации, вызванной повреждением спинного мозга, западную диету используют для оценки влияния метаболического синдрома на процессы восстановления после травмы. У мышей до индукции травмы западная диета (60% Ккал жира в течение 7 нед.) способствует астроглиозу и потере миелина в неповрежденном спинном мозге, а после травмы значительно ухудшает сенсомоторное восстановление, усугубляет потерю олигодендроцитов, уменьшает рост аксонов и увеличивает уровень микроглиоза [148].

Таким образом, западная диета увеличивает окислительный стресс и способствует нарушению проницаемости ГЭБ. При данной диете наблюдается снижение пластичности нейронов, астроглиоз, воспалительные процессы, что в совокупности приводит к ухудшению когнитивных функций и прогноза нейродегенеративных заболеваний.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ДИЕТЫ И ДРУГИХ ФАКТОРОВ ЭКСПОЗОМА

Помимо рассмотренных факторов экспозома (возраст, пол, состав и продолжительность режима питания, уровень физической активности), модулирующих эффекты диеты на работу ЦНС, существует ряд других факторов, изученных в меньшей степени (влияние материнской диеты на потомство, обогащение среды, стресс, микробиота).

Влияние режима питания на потомство

У мышей режим питания самок во время беременности и в период вскармливания оказывает влияние на работу мозга, поведение и метаболизм у потомства. Содержание самок в условиях западной диеты в эти периоды приводит к метаболическим изменениям у потомства. В краткосрочном и долгосрочном периодах эти изменения проявляются в переедании, развитии резистентности к лептину, увеличении массы тела и развитии предпочтения к еде, содержащей высокое количество жиров и углеводов [149]. На молекулярном уровне у потомства усиливаются воспалительные процессы и снижается уровень экспрессии BDNF в гиппокампе [149]. Применение западной диеты за несколько недель до наступления беременности и во время нее вызывает структурные изменения в мозге потомства, происходящие за счет нарушений в программе нейрональной дифференциации. Это приводит к потере пространственной идентичности и аксональной селективности кортикальных нейронов [150]. На поведенческом уровне отмеченные эффекты западной диеты проявляются в виде ухудшения пространственной памяти в гиппокамп-зависимых тестах (лабиринт Морриса, лабиринт Барнс) [149]. Отмечается изменение нормального социального поведения, связанное со снижением количества окситоцин-экспрессирующих нейронов у потомства мышей [151].

Влияние уровня обогащения среды

Условия содержания животных также оказывают влияние на процессы обучения и формирования памяти. Высокая степень обогащения среды оказывает положительное влияние (например, в ходе нормального старения), а низкая — отрицательное (например, при индуцированных травмах мозга). Следовательно, есть основания предполагать, что отрицательное влияние западной диеты может быть скорректировано при помощи обогащения стандартных лабораторных условий содержания животных. Нивелирование отрицательного эффекта западной диеты на инструментальное поведение крыс при содержании в условиях многофакторной стимулирующей среды подтверждает наличие отмеченного ранее взаимодействия между факторами экспозома [152]. Это имеет важное значение для применения данных подходов в клинической практике.

Влияние факторов стресса

Другой фактор экспозома – стресс – непосредственно связан с эффектами применения диеты в отношении работы головного мозга. Стресс вызывает изменения в макрооси гипоталамус-гипофиз-надпочечники, стимулируя выработку гормонов (инсулин, лептин, грелин), сигнализация которых нарушена при западной диете [153]. Эти гормоны вовлечены в пищевое поведение и активируют области мозга, отвечающие за мотивацию и ответ на стресс. Увеличение количества гормонов (глюкокортикоиды, кортикорелин) и нейротрансмиттеров (норадреналин) в ответ на воздействие стрессогенных факторов может приводить к активации системы вознаграждения в мозге (прилежащее ядро, полосатое тело). Это способствует увеличению потребления жирной и сладкой пищи, характерной для западной диеты [153]. Долговременное ограничение калорий приводит к развитию психологического стресса, что на молекулярном уровне соответствует увеличению уровня кортизола. В поведенческих тестах при долговременном ограничении калорий наблюдается повышение тревожности у мышей. Это проявляется в снижении количества посещений открытых рукавов в тесте "приподнятый крестообразный лабиринт" и уменьшении спонтанной двигательной активности [117]. Таким образом, в зависимости от типа диеты стресс может быть либо причиной, либо следствием изменений в функционировании нервной системы.

Влияние микробиоты

Эффекты диеты на работу ЦНС невозможно рассматривать отдельно от влияния кишечной микробиоты — фактора экспозома, входящего в состав макрооси микробиота—кишечник—мозг (рис. 1b). В головном мозге и пищеварительном тракте за-

падная диета вызывает снижение передачи сигналов, регулируемых ретиноевой кислотой и желчными кислотами, рецепторы которых участвуют в контроле метаболизма и процессов воспаления. Дисбактериоз и нарушение регуляции синтеза желчных кислот в печени на фоне западной диеты сопровождаются системным воспалением, активацией микроглии и снижением нейропластичности [133]. Дисбактериоз, связанный с сокращением числа бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты [154] на фоне западной диеты в сочетании с социальной изоляцией может приводить к депрессивно-подобному поведению у мышей [155]. Пропионовая кислота, относящаяся к классу короткоцепочечных жирных кислот, в модели рассеянного склероза уменьшает воспаление в ЦНС и приводит к снижению уровня демиелинизации, способствуя сокращению степени атрофии аксонов [154].

Таким образом, при изучении влияния диеты на работу мозга необходимо принимать во внимание комбинацию факторов экспозома и степень их взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение физиологии организма с позиции экспозома позволяет определить причинно-следственные связи между комбинацией факторов, оказывавших влияние на организм в течение его жизни. Рассмотренные в обзоре механизмы диет как одного из факторов экспозома, а также анализ их применения позволяют выделить молекулярные механизмы их воздействия на работу головного мозга. Кетогенная диета и ограничение калорий имеют сходные молекулярные механизмы, поскольку обе приводят к метаболическому сдвигу в сторону образования кетоновых тел из жирных кислот. Обе диеты оказывают нейропротекторный эффект в условиях недостатка углеводов (рис. 3, 4). При западной диете, напротив, избыток жиров на фоне большого количества углеводов увеличивает окислительный стресс. Это способствует нарушению проницаемости ГЭБ и развитию астроглиоза, который приводит к снижению пластичности у нейронов. Несмотря на наличие морфофункциональной связи между нейронами и астроцитами (рис. 1с), исследования влияния диеты на морфологию и физиологию астроцитов крайне немногочисленны. Данные об изменениях нейрон-глиальных взаимодействий под влиянием различных режимов питания практически отсутствуют.

Комплексный подход в изучении эффектов диеты на работу мозга также встречается редко. Следует учитывать, что диета может действовать через несколько одновременных механизмов, которые различаются в зависимости от типа клеток и области мозга. Исследование влияния диеты на работу мозга – активно развивающаяся область знаний, однако ряд научных вопросов остается не до конца решенным. Например, как изменяются свойства нейронов (глутаматергических, ГАМКергических) в случае использования ими в качестве источника энергии преимущественно кетоновых тел или глюкозы [156, 157]? Как различные метаболические состояния влияют на активность астроцитов и определенных подтипов нейронов [158]? Есть ли разница между глутаматергическими и ГАМКергическими нейронами в их реакции на метаболические изменения, вызванные диетами [159]? В какой степени гликолиз и окислительное фосфорилирование способствуют поддержанию активности нейронов в состоянии покоя и во время активации [160]? Влияет ли сдвиг метаболизма в сторону увеличения окислительного фосфорилирования в митохондриях и уменьшения гликолиза при кетогенной диете и ограничении калорий на возбудимость нейронов [161, 162]? Каковы хронические эффекты кетогенной диеты, ограничения калорий и западной диеты [21, 156]? Какие модели эпилепсии in vivo и in vitro лучше всего подходят для оценки эффектов и механизмов кетогенной диеты и ограничения калорий [163, 164]? За счет каких механизмов может отличаться эффективность применения различных диет при лечении лекарственно-резистентных форм эпилепсии [165, 166]?

Клинический потенциал использования диет в качестве поддерживающей терапии уже был показан для ряда заболеваний, таких как эпилепсия [85, 99], нейродегенерация [83, 115, 118], глиома [167]. Отсутствие дополнительной фармакологической нагрузки и простота применения делают специальные режимы питания идеальными кандидатами в качестве сопутствующей, поддерживающей, превентивной и облегчающей течение болезни терапии (например, в случае высокого генетического фактора риска развития нейродегенеративных заболеваний).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 21-54-53018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание и редактирование манускрипта, создание рисунков (А.А.Ф., А.Б.Т., А.В.С.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Рисунки выполнены с помощью BioRender.com.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Браже А.Р., Доронин М.С., Попов А.В., Денисов П.А., Семьянов А.В. (2019) Исследование паттернов кальциевой динамики в сетях астроцитов головного мозга. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова 105: 1436–1451. [Brazhe A.R., Doronin M.S., Popov A.V., Denisov P.A., Semyanov A.V. (2019) Issledovanie patternov kal'cievoj dinamiki v setyah astrocitov golovnogo mozga. Russ. J. Physiol. 105: 1436–1451 (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/s0869813919110037
- Wild C.P. (2005) Complementing the genome with an "exposome": The outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. Cancer. Epidemiol. Biomark and Prevention. 14: 1847–1850. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456
- 3. *Wild C.P.* (2012) The exposome: From concept to utility. International. J. Epidemiol. 41:24–32. https://doi.org/10.1093/ije/dyr236
- 4. *Guloksuz S., van Os J., Rutten B.P.F.* (2018) The Exposome Paradigm and the Complexities of Environmental Research in Psychiatry. JAMA Psychiatry. 75: 985–986. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.1211
- 5. Pries L.K., Dal Ferro G.A., van Os J., Delespaul P., Kenis G., Lin B.D., Luykx J.J., Richards A.L., Akdede B., Binbay T., Altlnyazar V., Yallnçetin B., Gümüş-Akay G, Cihan B., Soygür H., Ulaş H., Åžahin Cankurtaran E., Ulusoy Kaymak S. Mihaljevic M.M., Andric Petrovic S., Mirjanic T., Bernardo M., Mezquida G., Amoretti S., Bobes J., Saiz P.A., Garciá-Portilla M.P., Sanjuan J., Aguilar E.J., Santos J.L., Jiménez-López E., Arrojo M., Carracedo A., López G., González-Penãs J., Parellada M., Maric N.P., AtbaşoÄalu C., Ucok A., Alptekin K., Can Saka M., Arango C., O'Donovan M., Tosato S., Rutten B.P.F., Guloksuz S. (2020) Examining the independent and joint effects of genomic and exposomic liabilities for schizophrenia across the psychosis spectrum. Epidemiol. and Psych. Sci. 29: 1–10. https://doi.org/10.1017/S2045796020000943
- 6. Colomina M.T., Sánchez-Santed F., Conejo N.M., Collado P., Salvador A., Gallo M., Pinos H., Salas C., Navarro J.F., Adán A., Azpiroz A., Arias J.L. (2018) The psychoexposome: A holistic

perspective beyond health and disease. Psicothema. 30: 5–7. https://doi.org/10.7334/psicothema2017.244

- 7. Finch C.E., Kulminski A.M. (2019) The Alzheimer's Disease Exposome. Alzheimer's and Dementia. 15: 1123–1132.
- https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.3914
- 8. *Moon Y.* (2016) Microbiome-linked crosstalk in the gastrointestinal exposome towards host health and disease. Pediatric Gastroenterol, Hepatol. and Nutrition. 19: 221–228. https://doi.org/10.5223/pghn.2016.19.4.221
- Wang J., Jia H. (2016) Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome. Nat. Rev. Microbiol. 14: 508–522. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83
- 10. Sanchis-Gomar F, Lavie C.J., Mehra M.R., Henry B.M., Lippi G. (2020) Obesity and Outcomes in COVID-19: When an Epidemic and Pandemic Collide. Mayo. Clinic. Proc. 95: 1445–1453.
 - https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.05.006
- Semyanov A., Henneberger C., Agarwal A. (2020) Making sense of astrocytic calcium signals from acquisition to interpretation. Nature. Rev. Neurosci. 21: 551–564. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0361-8
- 12. *Domingues H.S., Portugal C.C., Socodato R., Relvas J.B.* (2016) Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. Front. Cell Develop. Biol. 4: 71. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00071
- 13. *Nelson D.L., Cox M.M.* (2017) Lehninger Principles of Biochemistry 7th. WH Freeman and Company.
- Magistretti P.J., Allaman I. (2013) Brain energy metabolism. In: Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. 1591–1620.
- Camberos-Luna L., Massieu L. (2020) Therapeutic strategies for ketosis induction and their potential efficacy for the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases. Neurochem Internat. 133: 104614. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104614
- Hall K.D., Chen K.Y., Guo J., Lam Y., Leibel R.L., Mayer L., Reitman M.L., Rosenbaum M., Smith S.R., Walsh B.T., Ravussin E. (2016) Energy expenditure and body composition changes after an isocaloric ketogenic diet in overweight and obese men. Am. J. Clin. Nutrit. 104: 324–333. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.133561.Dietary
- Wilson J.R., Levine S.Z., Rivkin H. (1926) the respiratory metabolism in infancy and in childhood: II. Ketosis and the respiratory exchange in children. Am. J. Diseas. Childr. 31: 335–356. https://doi.org/10.1001/archpedi.1926.04130030022003
- Woodyatt R.T. (1910) The action of glycol aldehyd and glycerin aldehyd in diabetes mellitus and the nature of antiketogenesis. J. Am. Med. Assoc. 55: 2109–2112. https://doi.org/10.1001/jama.1910.04330250005003
- Schutz Y. (2011) Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. Bern. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 81: 101–107. https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000064
- 20. Speakman J.R., Mitchell S.E. (2011) Caloric restriction. Mol. Aspects. Med. 32: 159–221. https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001
- Maalouf M., Rho J.M., Mattson M.P. (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. Brain. Res. Rev. 59: 293–315. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.09.002
- 22. *Masoro E.J.* (2010) History of Caloric Restriction, Aging and Longevity. In: *Everitt A.V., Rattan S.I.S., le Couteur D.G., de Cabo R.* (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, 3–14.
- Shively C.A., Appt S.E., Vitolins M.Z., Uberseder B., Michalson K.T., Silverstein-Metzler M.G., Register T.C. (2019) Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatosis in Nonhuman Primates. Obesity. 27: 777–784. https://doi.org/10.1002/oby.22436
- 24. Cordain L., Eaton S.B., Sebastian A., Mann N., Lindeberg S., Watkins B.A., O'Keefe J.H., Brand-Miller J. (2005) Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21st century. Am. J. Clin. Nutr. 81: 341–354. https://doi.org/10.1093/ajcn.81.2.341
- 25. Schönfeld P., Reiser G. (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 33: 1493–1499. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128

- 26. *Pifferi F., Cunnane S.C., Guesnet P.* (2020) Evidence of the role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in brain glucose metabolism. Nutrients. 12: 1–11. https://doi.org/10.3390/nu12051382
- Rose J., Brian C., Pappa A., Panayiotidis M.I., Franco R. (2020) Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. Front. Neurosci. 14: 1–20. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682
- Cunnane S.C., Courchesne-Loyer A., Vandenberghe C., St-Pierre V., Fortier M., Hennebelle M., Croteau E., Bocti C., Fulop T., Castellano C.A. (2016) Can ketones help rescue brain fuel supply in later life? Implications for cognitive health during aging and the treatment of alzheimer's disease. Front. Mol. Neurosci. 9: 53. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00053
- Pierre K., Pellerin L. (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function. J. Neurochem. 94: 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x
- 30. Achanta L.B., Rae C.D. (2017) β-Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. Neurochem. Res. 42: 35–49. https://doi.org/10.1007/s11064-016-2099-2
- 31. *Pierre K., Magistretti P.J., Pellerin L.* (2002) MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain. J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 22: 586–595. https://doi.org/10.1097/00004647-200205000-00010
- 32. Chiry O., Pellerin L., Monnet-Tschudi F., Fishbein W.N., Merezhinskaya N., Magistretti P.J., Clarke S. (2006) Expression of the monocarboxylate transporter MCT1 in the adult human brain cortex. Brain. Res. 1070: 65–70. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.064
- Magistretti P.J., Allaman I. (2018) Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. Nat. Rev. Neurosci. 19: 235–249. https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19
- Chi C.P., Roberts E.L. (2003) Energy Substrates for Neurons during Neural Activity: A Critical Review of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Hypothesis. J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 23: 1263–1281.

https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000081369.51727.6f

- 35. *Larrabee M.G.* (1996) Partitioning of CO2 production between glucose and lactate in excised sympathetic ganglia, with implications for brain. J. Neurochem. 67: 1726–1734. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67041726.x
- 36. Dienel G.A., Rothman D.L (2020) Reevaluation of Astrocyte-Neuron Energy Metabolism with Astrocyte Volume Fraction Correction: Impact on Cellular Glucose Oxidation Rates, Glutamate-Glutamine Cycle Energetics, Glycogen Levels and Utilization Rates vs. Exercising Muscle, and Na⁺/K⁺ Pumping. Neurochem. Res. 45: 2607–2630. https://doi.org/10.1007/s11064-020-03125-9
- 37. *Yellen G.* (2018) Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. J. Cell. Biol. 217:2235–2246. https://doi.org/10.1083/jcb.201803152
- Pellerin L., Magistretti P.J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 9:10625–10629.

https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625

- Bingul D., Kalra K., Murata E.M., Belser A., Dash M.B. (2020) Persistent changes in extracellular lactate dynamics following synaptic potentiation. Neurobiol. Learn. Mem. 175: 107314. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107314
- 40. *Dienel G.A.* (2019) Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. Physiol. Rev. 99: 949–1045.
 - https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017
- 41. *Dienel G.A.* (2017) Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. J. Neurosci. Res. 95: 2103–2125. https://doi.org/10.1002/jnr.24015
- Magistretti P.J., Allaman I. (2015) A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. Neuron. 86: 883–901. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035
- Saez I., Duran J., Sinadinos C., Beltran A., Yanes O., Tevy M.F., Martínez-Pons C., Milán M., Guinovart J.J. (2014) Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 34: 945–955. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.33

- 44. Gentry M.S., Guinovart J.J., Minassian B.A., Roach P.J., Serratosa J.M. (2018) Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism. J. Biol. Chem. 293: 7117–7125. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803064
- 45. Vilchez D., Ros S., Cifuentes D., Pujadas L., Vallès J., García-Fojeda B., Criado-García O., Fernández-Sánchez E., Medrão-Fernández I., Domínguez J., García-Rocha M., Soriano E., Rodríguez De Córdoba S., Guinovart J.J. (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. Nat. Neurosci. 10: 1407–1413. https://doi.org/10.1038/nn1998
- 46. DiNuzzo M., Schousboe A. (2019) Brain Glycogen Metabolism. Springer.
- Duran J., Gruart A., García-Rocha M., Delgado-García J.M., Guinovart J.J. (2014) Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in lafora disease. Hum. Mol. Genet. 23: 3147–3156. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu024
- 48. Лебедева А.В., Дембицкая Ю.В., Пимашкин А.С., Журавлева З.Д., Шишкова Е.А., Семьянов А.В. (2015) Роль энергетических субстратов в кальциевой активности астроцитов гиппокампа крыс раннего постнатального период. Соврем. технол. мед. [Lebedeva A.V., Dembitskaya Y.V., Pimashkin A.S., Zhuravleva Z.D., Shishkova E.A. (2015) The Role of Energy Substrates in Astrocyte Calcium Activity of Rat Hippocampus in Early Postnatal Ontogenesis. Sovrem. Tekhnologii. Med. 7: 14–19 (In Russ)]. https://doi.org/10.17691/stm2015.7.3.02
- 49. *Steiner P.* (2019) Brain Fuel Utilization in the Developing Brain. Ann. Nutr. Metab. 75(suppl 1): 8–18.
 - https://doi.org/10.1159/000508054
- Turner D.A., Adamson D.C. (2011) Neuronal-astrocyte metabolic interactions: Understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 70: 167–176. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820e1152
- Zilberter Y., Zilberter T. (2020) Glucose-Sparing Action of Ketones Boosts Functions Exclusive to Glucose in the Brain. eneuro 7: ENEURO.0303-20.2020. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0303-20.2020
- 52. Castellano C.-A., Nugent S., Paquet N., Tremblay S., Bocti C., Lacombe G., Imbeault H., Turcotte É., Fulop T., Cunnane S.C. (2015) Lower Brain 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake But Normal 11C-Acetoacetate Metabolism in Mild Alzheimer's Disease Dementia. J. Alzheimer's Dis. 43: 1343–1353. https://doi.org/10.3233/JAD-141074
- Croteau E., Castellano C.A., Fortier M., Bocti C., Fulop T., Paquet N., Cunnane S.C. (2018) A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. Exp. Gerontol. 107: 18–26.
- https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.004
 54. Croteau E., Castellano C.-.A., Richard M.A., Fortier M., Nugent S., Lepage M., Duchesne S., Whittingstall K., Turcotte É.E., Bocti C., Fülöp T., Cunnane S.C. (2018) Ketogenic Medium Chain Triglycerides Increase Brain Energy Metabolism in Alzheimer's Disease. J. Alzheimer's Dis. 64: 551–561.
 - https://doi.org/10.3233/JAD-180202
- 55. *Sharp F.R.* (1976) Relative cerebral glucose uptake of neuronal perikarya and neuropil determined with 2-deoxyglucose in resting and swimming rat. Brain. Res. 110: 127–139. https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90213-4
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. (1999) Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. Trends. Neurosci. 22: 208–215. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- 57. *Tabernero A., Medina J.M., Giaume C.* (2006) Glucose metabolism and proliferation in glia: Role of astrocytic gap junctions. J. Neurochem. 99: 1049–1061. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04088.x
- Devivo D.C., Leckie M.P., Ferrendelli J.S., McDougal D.B. (1978) Chronic ketosis and cerebral metabolism. Ann. Neurol. 3: 331–337. https://doi.org/10.1002/ana.410030410
- Ma W., Berg J., Yellen G. (2007) Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. J. Neurosci. 27: 3618–3625. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0132-07.2007
- 60. Chan O., Lawson M., Zhu W., Beverly J.L., Sherwin R.S. (2007) ATP-sensitive K⁺ channels regulate the release of GABA in the ventromedial hypothalamus during hypoglycemia. Diabetes. 56: 1120–1126. https://doi.org/10.2337/db06-1102

- 61. *Tanner G.R., Lutas A., Martínez-François J.R., Yellen G.* (2011) Single KATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. J. Neurosci. 31: 8689–8696. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5951-10.2011
- Mercer R.W., Dunham P.B. (1981) Membrane-bound ATP fuels the Na/K pump: Studies on membrane-bound glycolytic enzymes on inside-out vesicles from human red cell membranes. J. Gen. Physiol. 78: 547–568. https://doi.org/10.1085/jgp.78.5.547
- Haller M., Mironov S.L., Karschin A., Richter D.W. (2001) Dynamic activation of K ATP channels in rhythmically active neurons. J. Physiol. 537: 69–81. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0069k.x
- 64. *Lipton J.O., Sahin M.* (2014) The Neurology of mTOR. Neuron. 84: 275–291. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034
- Sengupta S., Peterson T.R., Laplante M., Oh S., Sabatini D.M. (2010) mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. Nature. 468: 1100–1104. https://doi.org/10.1038/nature09584
- 66. Ma D., Wang A.C., Parikh I., Green S.J., Hoffman J.D., Chlipala G., Murphy M.P., Sokola B.S., Bauer B., Hartz A.M.S., Lin A.-L. (2018) Ketogenic diet enhances neurovascular function with altered gut microbiome in young healthy mice. Sci. Rep. 8: 6670. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25190-5
- 67. Laplante M., Sabatini D.M. (2012) MTOR signaling in growth control and disease. Cell. 149: 274–293.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017

 Martuscello R.T., Vedam-Mai V., McCarthy D.J., Schmoll M.E., Jundi M.A., Louviere C.D., Griffith B.G., Skinner C.L., Suslov O., Deleyrolle L.P., Reynolds B.A. (2016) A Supplemented High-Fat Low-Carbohydrate Diet for the Treatment of Glioblastoma. Clin. Cancer. Res. 22: 2482–2495.

https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0916

- Rojas-Morales P., Pedraza-Chaverri J., Tapia E. (2020) Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis. Redox Biol. 29:101395. https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101395
- Haces M.L., Hernández-Fonseca K., Medina-Campos O.N., Montiel T., Pedraza-Chaverri J., Massieu L. (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. Exp. Neurol. 211: 85–96. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.029
- 71. Lu Y., Yang Y.Y., Zhou M.W., Liu N., Xing H.Y., Liu X.X., Li F. (2018) Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF-κB signaling pathways. Neurosci. Lett. 683: 13–18. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.016
- Maalouf M., Sullivan P.G., Davis L., Kim D.Y., Rho J.M. (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. Neuroscience. 145(1): 256–264. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.065
- Cheng C.M., Hicks K., Wang J., Eagles D.A., Bondy C.A. (2004) Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. J. Neurosci. Res. 77: 270–276. https://doi.org/10.1002/jnr.20144
- 74. Juge N., Gray J.A., Omote H., Miyaji T., Inoue T., Hara C., Uneyama H., Edwards R.H., Nicoll R.A., Moriyama Y. (2010) Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release. Neuron. 68: 99–112. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.002
- Ruskin D.N., Kawamura M., Masino S.A. (2020) Adenosine and Ketogenic Treatments. J. Caffeine Adenosine Res. 10: 104–109. https://doi.org/10.1089/caff.2020.0011
- 76. Fredholm B.B., Chen J.F., Cunha R.A., Svenningsson P., Vaugeois J.M. (2005) Adenosine and Brain Function. Int. Rev. Neurobiol. 63: 191–270. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)63007-3
- Kawamura M., Ruskin D.N., Masino S.A. (2010) Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and KATP channels. J. Neurosci. 30: 3886–3895. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0055-10.2010
- Gzielo K., Soltys Z., Rajfur Z., Setkowicz Z.K. (2019) The Impact of the Ketogenic Diet on Glial Cells Morphology. A Quantitative Morphological Analysis. Neuroscience. 412: 239–251. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.009

- Zhao Z., Lange D.J., Voustianiouk A., MacGrogan D., Ho L., Suh J., Humala N., Thiyagarajan M., Wang J., Pasinetti G.M. (2006) A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. BMC Neurosci. 7: 29. https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-29
- Tai K.K., Truong D.D. (2007) Ketogenic diet prevents seizure and reduces myoclonic jerks in rats with cardiac arrest-induced cerebral hypoxia. Neurosci. Lett. 425: 34–38. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.08.007
- Tai K.K., Nguyen N., Pham L., Truong D.D. (2008) Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. J. Neural. Transm. 115: 1011–1017. https://doi.org/10.1007/s00702-008-0050-7
- Yang Q., Guo M., Wang X., Zhao Y., Zhao Q., Ding H., Dong Q., Cui M. (2017) Ischemic preconditioning with a ketogenic diet improves brain ischemic tolerance through increased extracellular adenosine levels and hypoxia-inducible factors. Brain. Res. 1667: 11–18. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.04.010
- Hertz L., Chen Y., Waagepetersen H.S. (2015) Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, β-amyloid toxicity, and astrocyte function. J. Neurochem. 134: 7–20. https://doi.org/10.1111/jnc.13107
- Keene D.L. (2006) A systematic review of the use of the ketogenic diet in childhood epilepsy. Pediatr. Neurol. 35: 1–5. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.01.005
- Hallböök T., Ji S., Maudsley S., Martin B. (2012) The effects of the ketogenic diet on behavior and cognition. Epilepsy. Res. 100: 304–309. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.04.017
- Samoilova M., Weisspapir M., Abdelmalik P., Velumian A.A., Carlen P.L. (2010) Chronic in vitro ketosis is neuroprotective but not anti-convulsant. J. Neurochem. 113: 826–835. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06645.x
- Phillis J.W., Wu P.H. (1981) The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. Prog. Neurobiol. 16: 187–239. https://doi.org/10.1016/0301-0082(81)90014-9
- Masino S.A., Li T., Theofilas P., Sandau U.S., Ruskin D.N, Fredholm B.B., Geiger J.D., Aronica E., Boison D. (2011) A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A 1 receptors. J. Clin. Invest. 121: 2679–2683. https://doi.org/10.1172/JCI57813
- Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Rusakov D.A., Semyanov A. (2018) Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. Front. Mol. Neurosci. 11: 215.
 - https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00215
- 90. Neal E.G., Chaffe H., Schwartz R.H. Lawson M.S., Edwards N., Fitzsimmons G., Whitney A., Cross J.H. (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. Lancet. Neurol. 7: 500–506. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70092-9
- Patel A., Pyzik P.L., Turner Z., Rubenstein J.E., Kossoff E.H.(2010) Long-term outcomes of children treated with the ketogenic diet in the past. Epilepsia. 51: 1277–1282. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02488.x
- Jensen N.J. Wodschow H.Z., Nilsson M., Rungby J. (2020) Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases. Int. J. Mol. Sci. 21: 8767. https://doi.org/10.3390/ijms21228767
- VanItallie T.B., Nonas C., di Rocco A., Boyar K., Hyams K., Heymsfield S.B. (2005) Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: A feasibility study. Neurology. 64: 728–730. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000152046.11390.45
- 94. Tieu K., Perier C., Caspersen C., Teismann P., Wu D.C., Yan S. du, Naini A., Vila M., Jackson-Lewis V., Ramasamy R., Przedborski S. (2003) D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. J. Clin. Invest. 112: 892–901. https://doi.org/10.1172/JCI200318797
- 95. Kashiwaya Y., Takeshima T., Mori N., Nakashima K., Clarke K., Veech R.L. (2000) D-β-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97: 5440–5444. https://doi.org/10.1073/npag.97.10.5440
 - https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5440
- 96. Evangeliou A., Vlachonikolis I., Mihailidou H., Spilioti M., Skarpalezou A. Makaronas N., Prokopiou A., Christodoulou P., Liapi-Adamidou G., Helidonis E., Sbyrakis S., Smeitink J.

(2003) Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: Pilot study. J. Child. Neurol. 18: 113–118.

https://doi.org/10.1177/08830738030180020501

- Zhao Q., Stafstrom C.E., Fu D.D., Hu Y., Holmes G.L. (2004) Detrimental Effects of the Ketogenic Diet on Cognitive Function in Rats. Pediatr. Res. 55: 498–506. https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000112032.47575.D1
- Rubio C., Luna R., Rosiles A., Rubio-Osornio M. (2020) Caloric Restriction and Ketogenic Diet Therapy for Epilepsy: A Molecular Approach Involving Wnt Pathway and KATP Channels. Front. Neurol. 11: 584298. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.584298
- Phillips-Farfán B.V., Rubio Osornio M del C., Custodio Ramírez V., Paz Tres C., Carvajal Aguilera K.G. (2015) Caloric restriction protects against electrical kindling of the amygdala by inhibiting the mTOR signaling pathway. Front. Cell Neurosci. 9: 90. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00090
- Ma L., Wang R., Dong W., Zhao Z. (2018) Caloric restriction can improve learning and memory in C57/BL mice probably via regulation of the AMPK signaling pathway. Exp. Gerontol. 102: 28–35.

https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.013

- 101. Hadem I.K.H., Sharma R. (2017) Differential Regulation of Hippocampal IGF-1-Associated Signaling Proteins by Dietary Restriction in Aging Mouse. Cell. Mol. Neurobiol. 37: 985–993. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0431-7
- 102. Ciobanu O., Elena Sandu R., Tudor Balseanu A., Zavaleanu A., Gresita A., Petcu E.B., Uzoni A., Popa-Wagner A. (2017) Caloric restriction stabilizes body weight and accelerates behavioral recovery in aged rats after focal ischemia. Aging Cell 16: 1394–1403. https://doi.org/10.1111/acel.12678
- 103. Julien C., Tremblay C., Émond V., Lebbadi M., Salem N., Bennett D.A., Calon F. (2009) Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 68: 48–58.

https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181922348

- 104. Morris K.C., Lin H.W., Thompson J.W., Perez-Pinzon M.A. (2011) Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. J. Cereb. Blood Flow Metab. 31: 1003–1019. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.229
- 105. Bagherniya M., Butler A.E., Barreto G.E., Sahebkar A. (2018) The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. Ageing. Res. Rev. 47: 183–197. https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.08.004
- 106. Schmeisser K., Parker J.A. (2019) Pleiotropic effects of mTOR and autophagy during development and aging. Front. Cell Dev. Biol. 7: 192. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00192
- 107. Dong W., Wang R., Ma L.N., Xu B.L., Zhang J.S., Zhao Z.W., Wang Y.L., Zhang X. (2015) Autophagy involving age-related cognitive behavior and hippocampus injury is modulated by different caloric intake in mice. Int. J. Clin. Exp. Med. 8: 11843–11853.
- 108. Liu Y., Wang R., Zhao Z., Dong W., Zhang X., Chen X., Ma L. (2017) Short-term caloric restriction exerts neuroprotective effects following mild traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting astrocyte activation. Behav. Brain. Res. 331: 135–142. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.024
- 109. Popov A., Denisov P., Bychkov M., Brazhe A., Lyukmanova E., Shenkarev Z., Lazareva N., Verkhratsky A., Semyanov A. (2020) Caloric restriction triggers morphofunctional remodeling of astrocytes and enhances synaptic plasticity in the mouse hippocampus. Cell. Death. Dis. 11: 208. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2406-3
- 110. Rühlmann C., Wölk T., Blümel T., Stahn L., Vollmar B., Kuhla A. (2016) Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. Aging. 8: 2777–2789. https://doi.org/10.18632/aging.101086
- 111. Matyi S., Jackson J., Garrett K., Deepa S.S., Unnikrishnan A. (2018) The effect of different levels of dietary restriction on glucose homeostasis and metabolic memory. Geroscience. 40: 139–149. https://doi.org/10.1007/s11357-018-0011-5
- 112. Speakman J.R., Mitchell S.E., Mazidi M. (2016) Calories or protein? The effect of dietary restriction on lifespan in rodents is explained by calories alone. Exp. Gerontol. 86: 28–38. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.03.011

- Greene A.E., Todorova M.T., McGowan R., Seyfried T.N. (2001) Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic EL mice by reducing blood glucose. Epilepsia. 42: 1371–1378. https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.17601.x
- 114. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. (1989) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. Nutrition. 10: 63–79. https://doi.org/10.1093/jn/10.1.63
- 115. Colman R.J., Anderson R.M., Johnson S.C., Kastman E.K., Kosmatka K.J., Beasley T.M., Allison D.B., Cruzen C., Simmons H.A., Kemnitz J.W., Weindruch R. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science. 325: 201–204. https://doi.org/10.1126/science.1173635
- 116. Mattison J.A., Colman R.J., Beasley T.M., Allison D.B., Kemnitz J.W., Roth G.S., Ingram D.K., Weindruch R., de Cabo R., Anderson R.M. (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. Nat. Commun. 8: 14063. https://doi.org/10.1038/ncomms14063
- 117. Kuhla A., Lange S., Holzmann C., Maass F., Petersen J. Vollmar B., Wree A. (2013) Lifelong Caloric Restriction Increases Working Memory in Mice. PLoS One. 8: e68778. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068778
- Villeda S.A., Horowitz A.M. (2017) Therapeutic potential of systemic brain rejuvenation strategies for neurodegenerative disease. F1000Research. 6: 1291. https://doi.org/10.12688/f1000research.11437.1
- 119. *Aguilera K.G.C., Farfán B.V.P.* (2016) Caloric Restriction and Dietary Treatments of Epilepsy: Mechanistic Insights for Drug Discovery. 163–180.
- 120. Beilharz J.E., Maniam J., Morris M.J. (2014) Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. Brain. Behav Immun. 37: 134–141. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.016
- 121. Molteni R., Barnard R.J., Ying Z., Roberts C.K., Gómez-Pinilla F. (2002) A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. Neuroscience. 112: 803–814. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00123-9
- 122. *Beilharz J.E., Maniam J., Morris M.J.* (2015) Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. Nutrients. 7: 6719–6738. https://doi.org/10.3390/nu7085307
- 123. *Kanoski S.E., Zhang Y., Zheng W., Davidson T.L.* (2010) The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. J. Alzheimer's Dis. 21: 207–217. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091414
- 124. Davidson T.L., Monnot A., Neal A.U., Martin A.A., Horton J.J., Zheng W. (2012) The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. Physiol. Behav. 107: 26–33. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.015
- 125. Davidson T.L., Hargrave S.L., Swithers S.E., Sample C.H., Fu X., Kinzig K.P., Zheng W. (2013) Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function. Neuroscience. 253: 110–122. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.044
- 126. Banks W.A., Burney B.O., Robinson S.M. (2008) Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. Peptides. 29: 2061–2065. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.001
- 127. Banks W.A., Coon A.B., Robinson S.M., Moinuddin A., Shultz J.M., Nakaoke R., Morley J.E. (2004) Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. Diabetes. 53: 1253–1260. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1253
- 128. Hsu T.M., Kanoski S.E. (2014) Blood-brain barrier disruption: Mechanistic links between western diet consumption and dementia. Front. Aging Neurosci. 6: 88. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00088
- 129. Mulder M., Blokland A., van den Berg D.J., Schulten H., Bakker A.H.F., Terwel D., Honig W., de Kloet E.R., Havekes L.M., Steinbusch H.W.M., de Lange E.C.M. (2001) Apolipoprotein E protects against neuropathology induced by a high-fat diet and maintains the integrity of the blood-brain barrier during aging. Lab. Investig. 81: 953–960. https://doi.org/10.1038/labinvest.3780307
- 130. Abbott N.J. (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. Cell. Mol. Neurobiol. 20: 131–147. https://doi.org/10.1023/A:1007074420772

- Abbott N.J., Rönnbäck L., Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the bloodbrain barrier. Nat. Rev. Neurosci. 7: 41–53. https://doi.org/10.1038/nrn1824
- 132. Ek M., Engblom D., Saha S., Blomqvist A., Jakobsson P.-J., Ericsson-Dahlstrand A. (2001) Pathway across the blood-brain barrier. Nature. 410: 430–431. https://doi.org/10.1038/35068632
- 133. Jena P.K., Sheng L., di Lucente J., Jin L.W., Maezawa I., Wan Y.J.Y. (2018) Dysregulated bile acid synthesis and dysbiosis are implicated in Western diet-induced systemic inflammation, microglial activation, and reduced neuroplasticity. FASEB J. 32: 2866–2877. https://doi.org/10.1096/fj.201700984RR
- 134. Granholm A.C, Bimonte-Nelson H.A., Moore A.B., Nelson M.E., Freeman L.R., Sambamurti K. (2008) Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. J. Alzheimer's Dis. 14: 133–145. https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14202
- 135. Biessels G.J., Reagan L.P. (2015) Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. Nat. Rev. Neurosci. 16: 660–671. https://doi.org/10.1038/nrn4019
- 136. Kothari V., Luo Y., Tornabene T., O'Neill A.M., Greene M.W., Geetha T., Babu J.R. (2017) High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis. Dis. 1863: 499–508. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.006
- 137. Tsai S.F., Wu H.T., Chen P.C., Chen Y.W., Yu M., Wang T.F., Wu S.Y., Tzeng S.F., Kuo Y.M. (2018) High-fat diet suppresses the astrocytic process arborization and downregulates the glial glutamate transporters in the hippocampus of mice. Brain. Res. 1700: 66–77. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.07.017
- 138. Zhao W.Q., Alkon D.L. (2001) Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. Mol. Cell. Endocrinol. 177: 125–134. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00455-5
- Greenwood C.E., Winocur G. (2005) High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. Neurobiol. Aging. 26 Suppl: 42–45. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.017
- 140. Lizarbe B., Soares A.F., Larsson S. Duarte J.M.N. (2019) Neurochemical modifications in the hippocampus, cortex and hypothalamus of mice exposed to long-term high-fat diet. Front. Neurosci. 12: 985.
 - https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00985
- 141. Huang P.L. (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. Dis. Model Mech. 2: 231–237. https://doi.org/10.1242/dmm.001180
- 142. Mittra S., Bansal V.S., Bhatnagar P.K. (2008) From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. Drug. Discov. Today. 13: 211–218. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.01.006
- 143. Avena N.M., Gold M.S. (2011) Food and addiction sugars, fats and hedonic overeating. Addiction. 106: 1214–1215. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03373.x
- 144. Ebbeling C.B., Swain J.F., Feldman H.A., Wong W.W., Hachey D.L., Garcia-Lago E., Ludwig D.S.
- (2012) Effects of dietary composition on energy expenditure during weight-loss maintenance. JAMA. 307: 2627–2634. https://doi.org/10.1001/jama.2012.6607
- 145. Graham L.C., Harder J.M., Soto I., de Vries W.N., John S.W.M., Howell G.R. (2016) Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. Sci. Rep. 6: 21568. https://doi.org/10.1038/srep21568
- 146. Escartin C., Galea E., Lakatos A., O'Callaghan J.P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., Allen N.J., Araque A., Barbeito L., Barzilai A., Bergles D.E., Bonvento G., Butt A.M., Chen W.-T., Cohen-Salmon M., Cunningham C., Deneen B., de Strooper B., Díaz-Castro B., Farina C., Freeman M., Gallo V., Goldman J.E., Goldman S.A., Götz M., Gutiérrez A., Haydon P.G., Heiland D.H., Hol E.M., Holt M.G., Iino M., Kastanenka K.V., Kettenmann H., Khakh B.S., Koizumi S., Lee C.J., Liddelow S.A., MacVicar B.A., Magistretti P., Messing A., Mishra A., Molofsky A. v, Murai K.K., Norris C.M., Okada S., Oliet S.H.R. Oliveira J.F., Panatier A., Parpura V, Pekna M. Pekny M., Pellerin L., Perea G., Pérez-Nievas B.G., Pfrieger F.W., Poskanzer K.E., Quintana F.J., Ransohoff R.M., Riquelme-Perez M., Robel S., Rose C.R., Rothstein J.D. Rouach N., Rowitch D.H., Semyanov A., Sirko S., Sontheimer H., Swanson R.A., Vitorica J., Wanner I.-B., Wood L.B., Wu J., Zheng B., Zimmer E.R., Zorec R., Sofroniew M.V.,

Verkhratsky A. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat. Neurosci.

https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4

- 147. Thériault P., ElAli A., Rivest S. (2016) High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APPswe/PS1 mice. Oncotarget. 7: 67808–67827. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12179
- 148. Kim H.N., Langley M.R., Simon W.L., Yoon H., Kleppe L. Lanza I.R., LeBrasseur N.K., Matveyenko A., Scarisbrick I.A. (2020) A Western diet impairs CNS energy homeostasis and recovery after spinal cord injury: Link to astrocyte metabolism. Neurobiol. Dis. 141: 104934. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104934
- 149. Cordner Z.A., Tamashiro K.L.K. (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. Physiol. Behav. 152: 363–371. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.008
- 150. Cinquina V., Calvigioni D., Farlik M., Halbritter F., Fife-Gernedl V., Shirran S.L., Fuszard M.A., Botting C.H., Poullet P., Piscitelli F., Máté Z., Szabó G., Yanagawa Y., Kasper S., di Marzo V., Mackie K., McBain C.J., Bock C., Keimpema E. Harkany T. (2020) Life-long epigenetic programming of cortical architecture by maternal 'Western' diet during pregnancy. Mol. Psychiatry. 25: 22–36.
 - https://doi.org/10.1038/s41380-019-0580-4
- Buffington S.A., di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. (2016) Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. Cell. 165: 1762–1775. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001
- 152. *Winocur G., Greenwood C.E.* (2005) Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. Neurobiol. Aging. 26 Suppl: 46–49. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.003
- 153. López-Taboada I., González-Pardo H. Conejo N.M. (2020) Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. Front. Psychol. 11: 564413. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.564413
- 154. *Hirschberg S., Gisevius B., Duscha A., Haghikia A.* (2019) Implications of diet and the gut microbiome in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. Int. J. Mol. Sci. 20: 3109. https://doi.org/10.3390/ijms20123109
- 155. *Marrone M.C., Coccurello R.* (2020) Dietary fatty acids and microbiota-brain communication in neuropsychiatric diseases. Biomolecules. 10: 12. https://doi.org/10.3390/biom10010012
- 156. Li R.J., Liu Y., Liu H.Q., Li J. (2020) Ketogenic diets and protective mechanisms in epilepsy, metabolic disorders, cancer, neuronal loss, and muscle and nerve degeneration. J. Food Biochem. 44: 1–14. https://doi.org/10.1111/jfbc.13140
- 157. Guo Q., Liu S., Wang S., Wu M., Li Z., Wang Y. (2019) Beta-hydroxybutyric acid attenuates neuronal damage in epileptic mice. Acta Histochem. 121: 455–459. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.03.009
- 158. *Boison D., Steinhäuser C.* (2018) Epilepsy and astrocyte energy metabolism. Glia. 66: 1235–1243. https://doi.org/10.1002/glia.23247
- 159. Yudkoff M., Daikhin Y., Horyn O., Nissim I., Nissim I. (2008) Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. Epilepsia. 49: 73–75. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01841.x
- 160. Koppel S.J., Swerdlow R.H. (2018) Neuroketotherapeutics: A modern review of a century-old therapy. Neurochem. Int. 117: 114–125. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.019
- 161. Barzegar M., Afghan M., Tarmahi V., Behtari M., Rahimi Khamaneh S., Raeisi S. (2019) Ketogenic diet: overview, types, and possible anti-seizure mechanisms. Nutr. Neurosci. 1–10. https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1627769
- 162. *McNally M.A., Hartman A.L.* (2012) Ketone bodies in epilepsy. J. Neurochem. 121: 28–35. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x
- 163. *Masino S.A., Rho J.M.* (2012) Mechanisms of ketogenic diet action. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet] 4th edition.
- 164. Minlebaev M., Khazipov R. (2011) Antiepileptic effects of endogenous beta-hydroxybutyrate in suckling infant rats. Epilepsy Res. 95: 100–109. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.03.003
- 165. Yuen A., Sander L. (2014) Rationale for using intermittent calorie restriction as a dietary treatment for drug resistant epilepsy. Epilepsy Behav. 33: 110–114. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.02.026

- 166. Martin-McGill K.J., Jackson C.F., Bresnahan R., Levy R.G., Cooper P.N. (2018) Ketogenic diets for drug-resistant epilepsy. Cochrane database Syst. Rev.: CD001903–CD001903. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001903.pub4
- 167. Seyfried T.N., Sanderson T.M., El-Abbadi M.M., McGowan R. Mukherjee P. (2003) Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. Br. J. Cancer. 89: 1375–1382. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601269

Effect of Diet as a Factor of Exposome on Brain Function

A. A. Fedotova^{*a*, *b*}, A. B. Tiaglik^{*b*}, and A. V. Semyanov^{*a*, *b*, *c*, *}

^a Moscow State University, Moscow, Russia ^bShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia ^cSechenov First Moscow state Medical University, Moscow, Russia *e-mail: alexeysemvanov@gmail.com

In this review we discuss the concept of exposome which consists of groups of factors interacting with one another and exerting their influence on the organism throughout its lifespan. We classified these factors in three main groups: internal environment, life style, external environment. Particularly, we analyzed dietary influence on the brain function as a part of an exposome. We reviewed three types of diets, which vary in their calorie intake and lipid/carbohydrate ratio. We discussed molecular and cellular mechanisms underpinning ketogenic diet, calorie restriction and western diet action on the brain function. We emphasized the lack of data on how food regime influences the neural-astrocytic communication in the brain. Separate chapter is devoted to examining the relationships between various factors of an exposome, which is often overlooked in research. We propose a novel paradigm to study brain function from the exposome point of view, which implies consideration of all its factors and their interaction. This complex approach will allow researchers to trace functional relationship at different levels of organization including molecular, cellular and organ. This will allow systematization of collected data and will initiate the development of therapeutic approaches based on an individual exposome.

Keywords: exposome, ketogenic diet, calorie restriction, western diet, neuron, astrocyte

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 568-583

—— МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ —

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭКСПАНСИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В НЕЙРОБИОЛОГИИ

© 2021 г. К. З. Деревцова^{1, *}, Е. И. Пчицкая¹, А. В. Раковская¹, И. Б. Безпрозванный^{1, 2, **}

 ¹Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
 ²Отделение физиологии Юго-Западного Медицинского Центра Техасского университета, Даллас, США
 *E-mail: derevtcova 19@yandex.ru
 *E-mail: mnlabspb@gmail.com

> Поступила в редакцию 20.01.2021 г. После доработки 15.02.2021 г.

> Принята к публикации 16.02.2021 г.

Многие биологические исследования требуют анализа ультраструктурных изменений на уровне клеточных органелл и молекул. Разрешаюшая способность современных конфокальных микроскопов ограничена дифракционный пределом (200-300 нм), в связи с чем изучать с помощью стандартной флуоресцентной микроскопии столь малые объекты невозможно. Методы микроскопии сверхвысокого разрешения требуют дорогостоящего оборудования и являются технически трудными в использовании, что в свою очередь ограничивает их повсеместное применение. Однако в последнее время появились методы, позволяющие увеличить разрешение микроскопии не за счет усовершенствования системы регистрации изображения, а посредством физического изотропного расширения биологического образца с помощью управляемого химического процесса. Благодаря этому методу, получившему название экспансионная или расширительная микроскопия (ExM), стало возможным получать трехмерные изображения образцов с разрешением достаточным для изучения отдельных органелл клетки с использованием обычного конфокального микроскопа. В статье рассмотрены методические особенности применения ExM при изучении образцов тканей головного мозга с приведением алгоритма, по которому можно осуществлять адаптацию стандартного протокола под цели и задачи конкретного исследования. Кроме того, рассматривается история возникновения данного метода, его основные принципы и примеры использования в различных областях биологии и медицины, а также отражены будущие направления для совершенствования данной технологии.

Ключевые слова: экспансионная микроскопия, микроскопия сверхвысокого разрешения, полиэлектролитный гель, иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия

DOI: 10.31857/S0869813921040075

ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЕ МЕТОДА ЭКСПАНСИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

В 1970-х годах было открыто и исследовано явление расширения полиэлектролитных гелей с помощью воды [1]. Гель, представляющий собой сеть из полиэлек-

тролита, подвергается гидролизу, ионизируется и при помещении в воду образовавшиеся противоионы создают осмотическое давление, приводящее к увеличению геля в размере до десятков раз [2]. Профессор Boyden и его коллеги предприняли попытку заключить биологический образец в гель, после чего расширить его в воде, используя данную особенность [3]. Предварительно, для достижения анизотропности расширения, образец подвергался гидролизу белков с помощью протеиназы К. Для визуализации клеточных структур были использованы антитела, конъюгированные с содержащим флюрофор ДНК-олигонуклеотидом. ДНК-олигонуклеотид сшивался с гелем через метакрилоиловую группу (methacryloyl group), благодаря чему флуоресцентная метка сохраняла свою локализацию относительно геля при расширении. Такое физическое увеличение расстояния между наноразмерными структурами и молекулами позволяет разнести их в пространстве на большие расстояния и, таким образом, преодолеть дифракционный предел обычного конфокального микроскопа. Разработанный метод получил название экспансионная микроскопия (Expansion Microscopy, ExM) [3]. Авторы методики исследовали ее на предмет погрешности при расширении и пришли к выводу, что она значительно меньше потенциального увеличения разрешения микроскопии, достигаемого при данном подходе. Авторам удалось расширить гистологический препарат в 5 раз и достичь латерального разрешения в 70 нм с помощью обычного оптического микроскопа. Для сравнения — в оптической микроскопии латеральное разрешение определяется формулой $d = 0.61\lambda/NA$, где NA = $n\sin\alpha$ – числовая апертура объектива, n - коэффициент преломления среды, $\alpha - угол между оптиче$ ской осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив (апертурный угол), λ – длина световой волны. Таким образом, с использованием иммерсионного масла и объективов с большой апертурой (NA = 1.4) в латеральной плоскости можно достичь максимального разрешения около 200 нм при использовании длины волны возбуждения в диапазоне между 400 и 650 нм, характерной для конфокальной микроскопии [4]. При этом размеры надмолекулярных структур нейрона, таких как микротрубочки, рибосомы, рецепторные белки, ядерные поры не превышают 150 нм, а клеточные мембраны имеют толщину менее 10 нм [5]. Таким образом, использование экспансионной микроскопии открывает возможность визуализации и изучения структуры таких малых объектов без необходимости использовать микроскопию сверхвысокого разрешения.

Далее исследовательская группа под руководством профессора Boyden модернизировала метод экспансионной микроскопии для детектирования PHK, посредством сшивки молекул данного типа с гелем через низкомолекулярный линкер [6]. После расширения геля PHK визуализируется с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с точностью до одной молекулы как в культивируемых клетках, так и в срезах головного мозга. Метод получил название ExFISH (Expansion FISH, экспансионная флуоресцентная *in situ* гибридизация), и он позволил изучать структуру и местоположение PHK с высоким разрешением, и что также важно, в толстых образцах, которые ранее были недоступны для проведения FISH и визуализации на большой глубине. Позднее в комбинации с экспансионной микроскопией была успешно применена ДНК *in situ* гибридизация [7].

Синтез конъюгированных с олигонуклеотидом антител является дорогостоящей процедурой, которую необходимо выполнять для каждого нового исследуемого белка. Поэтому следующим шагом в развитии данного метода стала его модификация, позволяющая напрямую сшивать белковые молекулы с гелем. Это открыло возможность для использования экспрессируемых в клетках флуоресцентных белков и стандартного иммуноокрашивания с помощью вторичных флуоресцентно-меченных антител для визуализации структур в ExM. Для этого было предложено использовать малые молекулы MA-NHS (N-гидроксисукцини-

569

мидиловый эфир метакриловой кислоты) [7] и Акрилоил-Х (6-(акрилоил)амино)гексановая кислота, сложный эфир сукцинимидила, AcX) [8]. При этом подходе количество сшивок антитела с гелем оказалось достаточным для сохранения флуоресценции путем удержания частей белка в геле после протеолиза с использованием протеиназы К. Метод получил название удерживающая белки экспансионная микроскопия (Protein retention expansion microscopy, ProExpM). Подобный качественный скачок привел к широкому распространению данного метода, который позволяет получать трехмерные изображения образцов с наноразмерной точностью.

Следующим этапом в развитии технологии стало увеличение возможного расширения образца с целью достижения более высокого разрешения объектов. Итеративная экспансионная микроскопия (iExM) позволила расширить образец до 20 раз и достичь разрешения до 25 мкм на стандартных флуоресцентных микроскопах [10]. Для этого гель после расширения снова помещался в гелевую матрицу и подвергался повторному расширению. В данном методическом подходе использовались конъюгированные с ДНК антитела как в оригинальном протоколе [3]. С помощью этого метода авторы визуализировали синаптические белки и дендритные шипики в головном мозге мыши. В оптимизации протокола, проведенной другой исследовательской группой, благодаря улучшению процесса гелеобразования и сшивки белков с матриксом геля удалось достичь десятикратного увеличения образца [9]. Данный подход совместим для использования с флуоресцентными белками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводились на 18 самцах и самках мышей трансгенной линии M Thy1-GFP, экспрессирующих флуоресцентный белок GFP в отдельных нейронах. Кроме того, в работе были использованы 3 самца линии мышей 5хFAD-M, также экспрессирующих флуоресцентный белок GFP в отдельных нейронах и содержащих тройную мутацию в гене, кодирующем APP белок, и двойную мутацию в гене, кодирующем пресенилин (обнаруживаемые у человека при наследственных формах болезни Альцгеймера). План экспериментальных исследований на животных был рассмотрен и утвержден комиссией по биоэтике Института биомедицинских систем и биотехнологий ΦГАОУ ВО "Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого" и соответствует положениям "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1986) и принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с лабораторными животными (1996).

Для проведения перфузии животных анестезировали путем внутрибрюшинного введения смеси золетила и ксилазина (40 мкл золетила, Zoletil Virbac, Франция + + 160 мкл 0.9%-ного раствора NaCl и 30 мкл ксилазина + 170 мкл раствора NaCl). Итоговую смесь вводили в дозе 150 мкл животным внутрибрюшинно, далее, если это было необходимо, вводили дополнительно эту смесь под холку животному в объеме 20–30 мкл.

Изготовление фронтальных срезов мозга

Фиксацию ткани проводили с помощью интракардиальной перфузии с использованием перистальтического насоса. Для перфузии в качестве промывочного буфера использовали фосфатно-солевой буфер, в качестве фиксирующего раствора — 4%-ный раствор параформальдегида. Далее аккуратно извлекали мозг и помещали его в 4%-ный раствор параформальдегида для дальнейшей фиксации. Мозг фиксировали неделю, далее изготавливали фронтальные срезы мозга различной толщины (50, 80 и 100 мкм) с помощью вибрационного микротома Campden 5100MZ-plus и помещали их в 1.5%-ный раствор параформальдегида.

Флуоресцентное мечение объектов

Детектирование исследуемых белков может быть выполнено путем стандартной процедуры иммуноокрашивания с помощью иммуноглобулинов, коньюгированных с флюрофорами. Для ProExM могут быть использованы наработанные в клетке флуоресцентные белки, сигнал которых может быть усилен с помощью иммуноокрашивания с первичными антителами против данного флуоресцентного белка, где флюорофор вторичных антител обладает схожим с ним спектром возбуждения и испускания света. Для детекции ДНК или PHK используют флуоресцентно-меченные зонды (флуоресцентная *in situ* гибридизация) [6, 7]. Процедура окрашивания протоколами, предлагаемыми производителями.

Для удаления остатков параформальдегида срезы после фиксации помещали в раствор 100 мМ NH₄Cl в фосфатно-солевом буфере, и затем осуществляли пермеабилизацию фиксированной ткани, выдерживая ее в течение 15 мин в 0.1%-ном (вес/объем) растворе Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере. Далее срезы отмывали в фосфатно-солевом буфере 3 раза по 5 мин, а затем помещали в блокирующий буфер (5%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере) на 6 ч при комнатной температуре. Далее срезы повторно отмывали в фосфатно-солевом буфере 3 раза по 5 мин и далее инкубировали в растворе, содержащем первичные кроличьи анти-GFP (Sigma, #G-1544) в разведении 1/1000 на ночь на шейкер при 4°C. Затем удаляли раствор с антителами и промывали в фосфатно-солевом буфере 4 раза по 30 мин для удаления несвязанных первичных антител. Далее инкубировали ткани с вторичными антителами (иммунофлуоресцентные антитела Life Technologies, Alexa Fluor 488, #A11008) в разведении 1/2000 в блокирующем буфере на шейкере на низкой скорости в течение ночи при комнатной температуре или при 4°С. После окрашивания удаляли раствор с антителами и промывали в фосфатно-солевом буфере 4 раза по 30 мин. Далее применяли протокол для экспансионной микроскопии.

Протокол экспансионной микроскопии

Все варианты протокола ExM имеют схожую логическую схему, результатом применения которой является получение изотропно расширенных образцов тканей или культуры клеток. Протокол экспансионной микроскопии состоит из семи этапов: флуоресцентное мечение объектов, закрепление, полимеризация, гомогенизация, расширение, визуализация и проверка расширенного образца на наличие искажений при расширении [3]. Далее рассмотрим подробно каждый этап.

Закрепление (анкеровка). Это процесс химической обработки образца для обеспечения корректного сшивания использованных для детекции объектов исследования, флуоресцентных зондов, флюорофоров и белков с гелем. Этот этап очень важен, так как способствует физическому удержанию флюорофоров в толще геля, сохраняя при этом их исходное топографическое расположение. Первоначально этот этап реализовывали с помощью технологии связывания антител, конъюгированных с ДНК-олигонуклеотидами. Антитела, связанные с комплементарными ДНК-олигонуклеотидами, также содержали в своем составе акрилатную группу, которая "сшивала" ДНК олигонуклеотиды с гелевым матриксом [3]. В настоящее время эта процедура заменена на более удобный метод прямой сшивки белков при помощи малых молекул MA-NHS [8] или Acryloyl-X [10], которые напрямую связываются с белками через N-сукцинимидилметакрилат и, таким образом, через до-



Рис. 1. Схематическое изображение камеры для полимеризации геля с образцом ткани.





полнительную акрилатную группу закрепляются в матрице геля. В наших протоколах мы осуществляли этап закрепления перед этапом гелеобразования, для чего окрашенные срезы помещали в раствор 1 мМ MA-NHS (Sigma, #730300-1G) в фосфатно-солевом буфере на 1 ч при комнатной температуре.

Полимеризация. Этап, при котором в камеру, где находится исследуемый образец, заливают в раствор для полимеризации. Как правило, для лучшего проникновения геля в образец ткани он предварительно выдерживается в растворе для полимеризации небольшой промежуток времени в условиях, предотвращающих начало полимеризации. Затем образцы переносятся из раствора и закрепляются в фиксированных формах для заливки (рис. 1–3). Далее происходит полимеризации геля, в результате которой гель с образцом твердеет.

Необходимо, чтобы все стоковые растворы для полимеризации и гомогенизации были приготовлены заранее. Составы стоковых растворов для полимеризации приведены ниже в таблицах: "Stock X" (табл. 1), "4HT", "TEMED", "APS" (табл. 2). Состав лизирующего буфера для гомогенизации приведен в табл. 3.

Для приготовления полимеризующего раствора смешиваем стоковые растворы в следующих пропорциях 47 : 1 : 1 : 1. Растворение стоковых растворов происходит в следующей последовательности: сначала к раствору Stock X добавляем 4HT, затем



Рис. 3. Вариант работы с образцами геля, предотвращающий разрыв расширенного образца.

TEMED, и в последнюю очередь APS. Таким образом, для 1 мл гелеобразующего раствора брали:

940 мкл Stock X (мономерный раствор),

20 мкл 4НТ (раствор, ингибирующий полимеризацию),

20 мкл ТЕМЕД (раствор, ускоряющий полимеризацию),

20 мкл APS (раствор, инициирующий полимеризацию).

Далее в полученный раствор помещали срезы мозга и выдерживали на холодном блоке в течение 30 мин. Для заливки среза в гелеобразующий раствор конструировали камеру из предметного стекла и двух ограничителей с боков. В качестве ограничителей использовали пленку парафилм (Parafilm), закрепленную с двух сторон

Раствор мономеров ("Stock X")	Концентрация в стоковом растворе (г/100 мл раствора)	Количество (мл)
Полиакрилат натрия (Sigma, #408220-100G)	38 (33 wt % из-за более высокой плотности)	2.25
Акриламид (Sigma, #A9099-500G)	×50	0.5
N, N'-метиленбисакриламид (VWR Life Science AMRESCO, #Am-O172-0.05)	2	0.75
Хлорид натрия	29.2 (5 M)	4
Фосфатно-солевой буфер, 10×кратный	10	1
Вода	до 100 мл	0.9
Общий объем	100 мл	9.4

Таблица 1. Концентрации компонентов для приготовления стокового мономерного раствора

Название раствора	Химическое вещество	Концентрация для стокового раствора (г/100 мл)
TEMED	Тетраметилэтилендиамин (Helicon, #L-0847)	10
APS	Пероксодисульфат аммония (Sigma, #A3678-25G)	10
4HT	4-Hydroxy-TEMPO (Sigma, #176141-1G)	0.5

Таблица 2. Концентрации компонентов для приготовления стоковых растворов TEMED, APS, 4HT

Таблица З.	Концентрации реагентов для приготовления лизирующего буфера для гомогени-
зации	

Реагент	Количество	Конечная концентрация (100 мл раствора)
Triton X-100	2.5 мл	0.50 г
EDTA, disodium (Дина́триевая соль этилен- диаминтетрау́ксусной кислоты́, 0.5 M, pH 8)	1 мл	0.2 мл
Tris Cl (1 M) водный раствор, pH 8	25 мл	5 мл
Хлорид натрия	23.38 г	4.67 г
Вода	Довести до 500 мл	
Протеиназа К (800 Е/мл)	1:100 разведение	800 Е (= 8 Е/мл)
Общий объем	500 мл	

предметного стекла в три слоя (рис. 1). Сверху накрывали предметным стеклом, также обернутым в пленку, чтобы улучшить адгезию между двумя прижатыми стеклами (рис. 1).

Срезы помещали по центру этой камеры (рис. 2). Затем заливали гелеобразующий раствор и аккуратно закрывали сверху предметным стеклом, исключая смещение среза в стороны (рис. 2). Залитые в камерах срезы аккуратно переносили в контейнер и помещали термостат при температуре 37°С на 1.5 ч, и после полимеризации срезы освобождали из камер и помещали в лизирующий буфер на 4–8 ч в зависимости от толщины среза.

Гомогенизация. Далее для обеспечения корректного изотропного расширения препарата проводится его ферментативная или тепловая денатурация. Этот шаг предотвращает деформационные изменения образца во время последующего расширения. Осуществляется путем инкубации с участием фермента протеиназы K, а также с помощью автоклавирования в лизирующем буфере, содержащем 5% Triton X-100 и 1% SDS, в течение 1 ч при температуре 121°C [8]. Требуется подбор условий гомогенизации для обеспечения равномерного расширения образца с сохранением максимально возможной флуоресценции объектов. Для гомогенизации мы использовали протеиназу K в концентрации 800 E (8 E/мл).

Расширение. После гомогенизации гель с образцом аккуратно переносится в емкости большего размера и подвергается гидролитическому расширению (рис. 4). Расширение достигается за счет вымывания ионов, удерживающих расширение геля, из гелевой матрицы с помощью дважды дистиллированной воды (ddH₂O). Классический протокол ExM включает в себя три повтора погружения геля с препаратом в ddH₂O, что в конечном итоге, приводит к его 4-кратному увеличению [3]. Современные протоколы позволяют расширять исследуемый образец более чем в 10 раз [11, 12].

575



Рис. 4. Соотношение размеров исходного образца и увеличенного образца в геле, полученного с помощью анизотропного расширения полиэлектролитного геля. Слева — срезы мозга до увеличения, справа — срез мозга после увеличения. Линейкой обозначен реальный размер образцов.

Мы проводили расширение геля, добавляя дистиллированную воду по 20 мин 3 раза. Следует отметить, что с расширенными срезами ввиду их хрупкости следует обращаться очень аккуратно. Переносить срез на стекло можно с помощью кисти и покровного стекла, как показано на рис. 3.

Следуя описанному выше протоколу, удалось увеличить исследуемый образец более чем в 4.5 раза (рис. 4).

Визуализация. Далее осуществляется этап визуализации расширенного образца с помощью любого доступного конфокального или эпифлуоресцентного микроскопа [3, 11]. На этом этапе образцы геля с заключенным в его матрицу препаратом исследуемой ткани аккуратно переносили на стекла и анализировали на конфокальном микроскопе фирмы Thorlabs. Как уже отмечалось выше, применение протокола экспансионной микроскопии позволило увеличить образец более чем в 4 раза (рис. 4).

В настоящее время описаны успешные примеры использования микроскопии сверхвысокого разрешения для анализа гелей после экспансионной микроскопии (SIM, STED, STORM), что позволяет достичь еще большего разрешения [13–16]. Так как препарат, залитый в гель, после расширения имеет большие размеры, для визуализации необходимо разделить его на более мелкие составляющие, также возможно выбрать область для визуализации, представляющую интерес в данном конкретном эксперименте. Во время получения изображений гель должен находиться в водном растворе или влажной среде для предотвращения его высыхания и последующего сжимания. Наиболее удобным способом является визуализация геля в водной среде с помощью водного объектива. Для закрепления геля возможно использовать камеру для прижизненной микроскопии, или сконструировать новую, например, из чашки Петри. Для лучшего сцепления геля с поверхностью ее можно обработать раствором поли-D-лизина. Возможно визуализировать гель с использованием масляных объективов с высокой числовой апертурой, при этом проложить между образцом и объективом тонкое покровное стекло. Тем не менее, из-за значительной толщины геля не всегда возможно использовать данный способ.

Проверка расширенного образца на наличие искажений при расширении. После визуализации полученных образцов необходимо провести экзаменацию на наличие искажений нормальной формы и расположения исследуемых биологических объектов. Для выполнения данного анализа помимо ручного или полуавтоматического совмещения изображений образца до и после расширения доступны программные продукты для автоматического определения возникающих в ходе ExM искажений [11]. Гели со значительными искажениями объектов не используются для анализа. В этом случае требуется дополнительная оптимизация процессов анкеровки и гомогенизации для получения стабильно воспроизводимого результата. Также необходимо оценить степень достигнутого увеличения образца путем анализа изменений в размере/весе геля или, используя информацию о размере исследуемых объектов до и после расширения [11].

Поскольку в задачи исследования не входило измерение размерных характеристик изучаемых объектов, на которые могло оказать влияние искажение в результате расширения, мы оценивали препарат на возможное искажение формы нейрона и его частей (шипики, ядро) только визуально.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методику экспансионной микроскопии проводили, используя 5 вариантов протокола. Важным критерием отбора подходящего протокола являлась способность максимально сохранять сигнал, испускаемый несколькими флюорофорами, наряду с расширением, достаточным для удовлетворительной визуализации клеточных органелл. За основу был взят протокол для proExM [17], при этом варьировали продолжительность инкубирования в растворах для сшивки с полиэлектролитным гелем и в лизирующем буфере, а также изменяли концентрацию протеиназы К в лизирующем буфере в зависимости от толщины среза.

Таким образом, удалось показать, что продолжительность инкубирования в растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, не влияла на эффективность свечения флюорофоров. Испытание различных вариантов инкубирования с протеиназой К для ферментированной гомогенизации показало, что сокращение времени инкубирования приводит к недостаточному расширению препарата (рис. 6).

При варианте протокола № 1 продолжительность инкубирования в растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, составила 12 ч, а ферментативная обработка протеиназой К была сокращена до 2-х ч в термостате при 37°С (рис. 5). Использование этого протокола позволило расширить препарат примерно в 2 раза, что является недостаточным для оценки морфологии шипиков и детектирования ультраструктурных изменений в клетке.

Применение второго варианта протокола, при котором продолжительность инкубирования в растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, составила 1 ч, а ферментативная обработка протеиназой К была сокращена до 2-х ч в термостате при 37°C, привела к аналогичному результату: препарат также удалось расширить примерно в 2 раза.

Вариант протокола № 3: продолжительность инкубирования в растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, составила 12 ч, а ферментативная обработка протеиназой К проводилась в течение 4-х часов при комнатной температуре (рис. 6). Сокращение длительности ферментативной обработки с целью сохранения сигнала, испускаемого флюорофором, привело к недостаточному расширению препарата.

Аналогичный результат недостаточного расширения был получен при применении варианта протокола № 4, при котором продолжительность инкубирования в


Рис. 5. Конфокальные изображения нейронов и дендритов, локализованных в CA1 области гиппокампа мышей линии M Thy1-GFP, до применения экспансионной микроскопии (а) и после (b) и (c). (a, b) – объектив с 20-кратным увеличением, (c) – с 60-кратным увеличением. Длина масштабного отрезка 20 мкм. Иммунодетекцию проводили первичными кроличьими антителами к GFP белку (Sigma, #G-1544) и иммунофлуоресцентными антителами Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11008).



Рис. 6. Конфокальные изображения нейронов и дендритов, локализованных в CA1 области гиппокампа мышей линии M Thy1-GFP, до применения экспансионной микроскопии (a) и после (b) и (c). (a, c) – объектив с 20-кратным увеличением, (b) – с 60-кратным увеличением. Длина масштабного отрезка 100 и 20 мкм. Иммунодетекцию проводили первичными кроличьими антителами к GFP белку (Sigma, #G-1544) и иммунофлуоресцентными антителами Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11008).

растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, составила 1 ч, а ферментативная обработка протеиназой К проводилась в течение 4-х ч при комнатной температуре.

Таким образом, в результате подбора условий для оптимального расширения образца с сохранением удовлетворительного уровня свечения флюорофора оптимальная продолжительность инкубирования в растворе для закрепления, содержащем MA-NHS, составила 1 ч, а ферментативная обработка протеиназой К — в течение 5-ти ч при комнатной температуре. Это позволило осуществить расширение образца и сохранить достаточный уровень экстинкции флюорофора в толще геля (рис. 7). С помощью этого варианта удалось добиться увеличения структуры нейронов в 3.5–4 раза, что позволило визуализировать мельчайшие детали их морфологии, включая дендритные шипики, и при этом сохранить интенсивность свечения флюорофоров, которые мы использовали в исследовании (рис. 7). Это, в свою очередь, позволило визуализировать объекты, экспрессирующие флюорофор, без дополнительного инкубирования с иммуноглобулинами к GFP уже после этапа расширения. Расширенные препараты, залитые в гелевый матрикс, как правило, помещены в большие емкости (обычно чашка Петри), что многократно увеличивает расход антител, используемых для дополнительного усиления сигнала флюоро-



Рис. 7. Конфокальные изображения нейронов CA1 области гиппокампа мышей линии M Thy1-GFP до (a) и после (b, c) применения метода экспансионной микроскопии получены на микроскопе Thorlabs с увеличением 60×. Длина масштабного отрезка 20 мкм. Иммунодетекцию проводили первичными кроличьими антителами к GFP белку (Sigma, #G-1544) и иммунофлуоресцентными антителами Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11008).

фора. Конечная стоимость такого исследования сильно возрастает. Кроме того, обработка антителами расширенных образцов достаточно трудоемка и занимает больше времени.

Подобранный протокол обработки тканей позволил также провести окрашивание срезов, содержащих эндогенный флюорофор, с антителами, конъюгированными с флюорофором, имеющим другой спектр возбуждения и испускания света. Для этой цели было проведено расширение срезов мозга, которые дополнительно окрашивали первичными антителами к IP3R. Были подобраны кроличьи поликлональные иммуноглобулины фирмы Abcam (кат. номер: ab5804) и вторичные Alexa Fluor® 594, которые подходили для использования с ExM. Для окрашивания использовали срезы мозга мышей линии 5xFAD-M, нейроны которого экспрессируют флуоресцентный белок GFP. Благодаря снижению продолжительности инкубирования с протеиназой K, удалось сохранить удовлетворительный сигнал, испускаемый белком GFP после расширения срезов, что позволило получить двухцветную микрофотографию, полученную слиянием двух каналов (Alexa Fluor® 594 и GFP) (рис. 8).

Таким образом, примененный адаптированный протокол экспансионной микроскопии позволил осуществить расширение препаратов без значительной потери уровней экстинкции как эндогенных флюорофоров, так и введенных на этапе иммуногистохимического окрашивания, что дает возможность применять этот метод при изучении колокализации различных белковых комплексов и молекул с использованием нескольких флуоресцентных меток, в том числе и эндогенно синтезируемых, без дополнительной иммунодетекции флуоресцентными антителами.

Отличием от стандартных протоколов является более бережная обработка ферментами на стадии расширения срезов, которая позволяет снизить разрушительное действие протеиназ на иммуноглобулины, используемые для иммуногистохимической детекции объектов. Кроме того, такая обработка позволяет сохранять сигнал, испускаемый эндогенно синтезируемым флюорофором, что освобождает исследователя от необходимости дополнительного подкрашивания срезов с целью визуализации морфологии. Подобным же образом применяемый протокол подойдет и для "тройной" флуоресценции, где в качестве одного из флюорофоров будет использоваться тот, что уже экспрессируется в клетках, а два остальных флюорофора будут введены на этапе окрашивания препаратов. Эти приемы позволят прежде всего минимизировать расходы и сократить трудоемкость.



Рис. 8. Конфокальные изображения нейронов, локализованных в области задней теменной коры, экспрессирующих белки IP3R и GFP, после экспансионной микроскопии (в качестве первичных антител – кроличьи поликлональные иммуноглобулины (Abcam, ab5804) и GFP на срезах мозга мышей линии 5xFAD-M). (а) – микрофотография с нейронами, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок GFP, (b) – микрофотография с нейронами, окрашенными антителами на IP3R, вторичными – Alexa Fluor 594, (c) – двухцветная микрофотография, полученная слиянием двух каналов (Alexa Fluor 594 и GFP). На срезах мозга представлены нейроны, локализованные в ассоциативной зоне задней теменной коры, слой 6b (PTLp), координаты относительно точки Bregma: $AP = -0.8 \text{ мм}, ML = \pm 2.00 \text{ мм и DV} = -2.0 \text{ мм}.$ Увеличение объектива ×10. Масштабный отрезок равен 100 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление метода ExM сделало возможным изучение наноразмерных структур и комплексов, таких как отдельные органеллы клетки, используя обычный микроскоп, ограниченный пределом дифракции. Таким образом, исследование колокализации регуляторных молекул, а также характера межсинаптических контактов между нервными клетками стало доступным для изучения на расширенных образцах. Кроме того, оптическая прозрачность получаемых образцов позволила беспрепятственно отслеживать в толще препарата трехмерную структуру нейрона, а также реконструировать путь от тела нейрона к самым разветвленным и дистальным частям клетки (аксоны, дендриты), что, конечно, дало возможность существенно повысить качество анализа. Экспансионная микроскопия позволила также, расширив биологический образец, сделать возможным выявление эпитопов, которые могли быть скрыты в белковых комплексах, путем отделения белков друг от друга. Эта особенность создала широкие перспективы применения этого метода для одновременного иммуногистохимического окрашивания близкорасположенных белков и молекул PHK.

Проводимые исследования с использованием метода ExFISH с целью картирования мРНК и других нуклеиновых кислот в области нейронов и проводящих путей также продемонстрировали свою актуальность при анализе точной локализации экспрессирующихся регуляторных молекул. Этот метод позволил с точностью до нанометра визуализировать совместное местоположение и идентичность молекул мРНК и белков [6].

С помощью протокола proExM авторам исследования удалось провести картирование и проанализировать архитектонику синапсов в области полосатого тела мыши [18], а также в мозге дрозофилы [19] и рыбок данио [20]. Этим же методом были установлены изменения характеристик астроцитов, локализованных вблизи кровеносных сосудов в образцах головного мозга пациентов с эпилепсией [21]. ProExM также оказался полезным при выполнении исследования планарий *Schmidtea mediterranea*, которое выявило новый тип глиальных клеток у этого организма [22].

Таким образом, экспансионная микроскопия оказалась особенно полезна для исследований в области нейробиологии. Однако, как и в случае с любой новой тех-

нологией, попытки исследователей использовать этот метод в своих работах могут требовать адаптирования существующего протокола для конкретной научной области. Различными исследовательскими группами постоянно вносятся разнообразные технические усовершенствования, расширяющие возможности этого метода.

Основным недостатком метода является деградация флюорофоров, что ограничивает допустимый предел расширения ввиду необходимости соблюсти баланс между потенциальным улучшением разрешения и качеством получаемого изображения. Ограничением метода также является пространственная ошибка, возникающая из-за неравномерности расширения геля и увеличивающаяся пропорционально кратности расширения образца. Так как образец расширяется и по оси *z*, одним из ограничений методики является невозможность получить изображение при высоких степенях расширения из-за относительно короткой рабочей длины объективов с большой кратностью увеличения и высокой числовой апертурой [23].

В лаборатории создателя метода Boyden было предложено сменить гелевую матрицу для заключения образца в ExM с полиакрилатных гелей, обладающих сетчатой структурой, на гели, состоящие из мономеров тетраэдрической формы. Данные гели обладают более однородной структурой, большей способностью к расширению со значительно меньшей пространственной ошибкой. Преимуществом такого гелевого матрикса также является сохранение флуоресценции широко используемого флюорофора Alexa 647, который не совместим с полиакрилатными гелями [24].

Другой исследовательской группой с целью улучшить сохранение флюорофоров были разработаны трифункциональные анкеры [25]. Они не подвергаются деградации во время полимеризации, гомогенизации или денатурации и легко окрашиваются органическими красителями перед расширением. Предлагаемый анкер состоит из трех частей: коннектора для связывания анкера с антителами или ферментными метками SNAP и CLIP, линкера для связывания с матрицей геля и репортерного участка, содержащего биотин или дигоксигенин для визуализации. После гомогенизации гель окрашивается флуоресцентно-меченным стрептавидином или антителами к дигоксигенину, благодаря чему визуализируется объект интереса. Результаты авторов методики указывают, что такой подход позволяет добиться существенно большей яркости флуоресценции по сравнению с обычной ExM.

С использованием системы биотин-стрептавидин было предложено помимо белков и нуклеиновых кислот изучать и другие молекулы в экспансионной микроскопии, например, липиды, гликаны и малые молекулы, благодаря устойчивости стрептавидина к обработке ферментами и полимеризации [26]. В данной модификации ExM для визуализации биомолекул используется клик-мечение, которое основано на парах функциональных групп, быстро и специфически взаимодействующих друг с другом, например, азид-алкин. Биомолекула, метаболически меченная алкином, взаимодействует с биотин-азидом, а затем с флуоресцентномеченным стрептавидином. Далее подготовка геля и визуализация осуществляется согласно стандартной методике. Подобная модификации ExM открывает новые возможности для ее использования в имаджинге биологических объектов.

В целом, можно заключить, что методика экспансионной микроскопии удобна в применении для различного рода научно-исследовательских задач. Применяемый в нашей работе протокол показал свою гибкость и простоту в использовании. Реактивы, используемые для выполнения этого метода, общедоступны для лабораторного использования и не требуют специального оборудования и оснащения. В зависимости от целей исследования условия обработки тканей можно варьировать, применяя практически любые флуоресцентные красители.

Подобранный в нашей лаборатории протокол позволил снизить разрушительное действие протеиназ на иммуноглобулины, применяемые для иммуногистохимической детекции объектов, что в свою очередь отменило необходимость дополни-

тельного окрашивания препарата после расширения с целью усилить недостаточный уровень экстинции, наблюдаемый вследствие деградации флюорофоров.

Таким образом, мы можем заключить, что этот метод является доступным и легко реализуемым в рамках стандартного набора инструментов, которыми обычно укомплектована научная лаборатория. Главным достоинством метода является то, что ExM улучшает разрешение изображений, получаемых с использованием стандартного микроскопа, путем физического увеличения образца. При применении апробированного в работе протокола было достигнуто 4-кратное увеличение нейронов мозга мышей, позволившее отразить тонкую структуру клетки с возможностью визуализации дендритных шипиков, клеточных органелл. В будущем мы планируем с помощью этого метода исследовать морфологические изменения в нейронах и отростках на фоне нейродегенеративного процесса, а также при других формах патологии.

Наиболее перспективным, на наш взгляд, направлением в настоящий момент является комбинация ExM с известными технологиями микроскопии сверхвысокого расширения [13–15, 27–29], что позволит достичь еще большего разрешения и визуализировать мельчайшие детали клеточных органелл. Однако пока методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения весьма сложно и дорогостояще реализуются. Возможно, что дальнейшее развитие методики ExM обещает в скором времени нивелировать существующие недостатки, что сделает ее еще более удобной для использования в нейробиологическом эксперименте.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-45-01004, Безпрозванный И.Б.). Пчицкая Е.И. является получателем стипендии Президента Российской Федерации № СП-3122.2021.4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Б.Б., Е.И.П., К.З.Д.), сбор данных (К.З.Д., Е.И.П., А.В.Р.), обработка данных (К.З.Д., Е.И.П., А.В.Р.), написание и редактирование манускрипта (К.З.Д., Е.И.П., И.Б.Б.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории ЛМН за поддержку экспериментальной работы и обсуждение результатов и Владимиру Жемкову за помощь и совет с наладкой методики экспансионной микроскопии в ЛМН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. What Is a Polymer? Live Science. Accessed 17 Feb 2021.
- https://www.livescience.com/60682-polymers.html
- 2. *Tanaka T*. (1978) Collapse of Gels and the Critical Endpoint. Phys. Rev. Lett. 40: 820–823. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.40.820
- 3. *Chen F., Tillberg P.W., Boyden E.S.* (2015) Expansion microscopy. Science. (80) 347: 543–548. https://doi.org/10.1126/science.1260088
- Лежнев Э.И., Попова И.И., Кузьмин С.В., Слащев С.М. (2001). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: принципы, устройство, применение (часть 2). Научное приборостроение. 11(3): 26–42. [Lezhnev E.I., Popova I.I., Kuzmin S.V., Slashchev S.M. (2001). Confocal laser scanning microscopy: principles, device, application (part 2). Scientific Instrumentation. 11(3): 26–42 (In Russ)].

- 5. Геннис Р. (ред) (1997) Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М. Мир [Biomembranes. Molecular structure and function (ed R. Gennis) (In Russ)]. ISBN 5-03-002419-0
- 6. Chen F., Wassie A.T., Cote A.J., Sinha A., Alon S., Asano S., Daugharthy E.R., Chang J.B., Marblestone A., Church G.M., Raj A., Boyden E.S. (2016) Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. Nat. Methods. 13: 679-684. https://doi.org/10.1038/nmeth.3899
- 7. Zhao Y., Bucur O., Irshad H., Chen F., Weins A., Stancu A.L., Oh E.Y., Distasio M., Torous V., Glass B., Stillman I.E., Schnitt S.J., Beck A.H., Boyden E.S. (2017) Nanoscale imaging of clinical specimens using pathology-optimized expansion microscopy. Nat. Biotechnol. 35:757–764. https://doi.org/10.1038/nbt.3892
- 8. Chozinski T.J., Halpern A.R., Okawa H., Kim H.J., Tremel G.J., Wong R.O.L., Vaughan J.C. (2016) Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. Nat. Methods. 13: 485–488. https://doi.org/10.1038/nmeth.3833
- 9. Chang J.B., Chen F., Yoon Y.G., Jung E.E. Babcock H., Kang J.S., Asano S., Suk H.J., Pak N., *Tillberg P.W., Wassie A.T., Cai D., Boyden E.S.* (2017) Iterative expansion microscopy. Nat. Methods. 14: 593–599. https://doi.org/10.1038/nmeth.4261
- Tillberg P.W., Chen F., Piatkevich K.D., Zhao Y., Yu C.C., English B.P., Gao L., Martorell A., Suk H.J., Yoshida F., Degennaro E.M., Roossien D.H., Gong G., Seneviratne U., Tannenbaum S.R., Desim-one R., Cai D., Boyden E.S. (2016) Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. Nat. Biotechnol. 34: 987–992. https://doi.org/10.1038/nbt.3625
- 11. Truckenbrodt S., Maidorn M., Crzan D., Wildhagen H., Kabatas S., Rizzoli S.O. (2018) X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes. EMBO Rep. 19: (9): e45836.
- https://doi.org/10.15252/embr.201845836
- 12. Cipriano B.H., Banik S.J., Sharma R., Rumore D., Hwang W., Briber R.M., Raghavan S.R. (2014) Superabsorbent hydrogels that are robust and highly stretchable. Macromolecules. 47: 4445–4452. https://doi.org/10.1021/ma500882n
- 13. Cahoon C.K., Yu Z., Wang Y., Guo F., Unruh J.R., Slaughter B.D. Hawley R.S. (2017) Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the Drosophila synaptonemal complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 114: E6857-E6866. https://doi.org/10.1073/pnas.1705623114
- 14. Halpern A.R., Alas G.C.M., Chozinski T.J., Paredez A.R., Vaughan J.C. (2017) Hybrid Structured Illumination Expansion Microscopy Reveals Microbial Cytoskeleton Organization. ACS Nano. 11: 12677-12686.

https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07200

- 15. Gao M., Maraspini R., Beutel O., Zehtabian A., Eickholt B., Honigmann A., Ewers H. (2018) Expansion Stimulated Emission Depletion Microscopy (ExSTED). ACS Nano. 12: 4178–4185. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00776
- 16. Gambarotto D., Zwettler F.U., Le Guennec M., Schmidt-Cernohorska M., Fortun D., Borgers S., Heine J., Schloetel J.G., Reuss M., Unser M., Boyden E.S., Sauer M., Hamel V., Guichard P. (2019) Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (Ú-ExM). Nat. Methods. 16: 71–74.
 - https://doi.org/10.1038/s41592-018-0238-1
- 17. Asano S.M., Gao R., Wassie A.T., Tillberg P.W., Chen F., Boyden E.S. (2018) Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. Curr. Protoc. Cell. Biol. 80(1): e56.

https://doi.org/10.1002/cpcb.56

18. Crittenden J.R., Tillberg P.W., Riad M.H., Shima Y., Gerfen C.R., Curry J., Housman D.E., Nelson S.B., Boyden E.S., Graybiel A.M. (2016) Striosome-dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113: 11318-11323.

https://doi.org/10.1073/pnas.1613337113

- 19. Mosca T.J., Luginbuhl D.J., Wang I.E., Luo L. (2017) Presynaptic LRP4 promotes synapse number and function of excitatory CNS neurons. Elife. 6: 27347. https://doi.org/10.7554/eLife.27347
- Freifeld L., Odstrcil I., Förster D., Ramirez A., Gagnon J.A., Randlett O., Costa E.K., Asano S., Celiker O.T., Gao R., Martin-Alarcon D.A., Reginato P., Dick C., Chen L., Schoppik D., Engert F., Baier H., Boyden E.S. (2017) Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and develop-European Develope Florence Florence Florence Florence Florence mental biology studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 114: E10799-E10808. https://doi.org/10.1073/pnas.1706281114
- 21. Deshpande T., Li T., Herde M.K., Becker A., Vatter H., Schwarz M.K., Henneberger C., Steinhäuser C., Bedner P. (2017) Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. Glia.

65: 1809-1820.

https://doi.org/10.1002/glia.23196

- Wang I.E., Lapan S.W., Scimone M.L. Clandinin T.R., Reddien P.W. (2016) Hedgehog signaling regulates gene expression in planarian glia. Elife. 5: e16996. https://doi.org/10.7554/eLife.16996
- 23. Truckenbrodt S., Sommer C., Rizzoli S.O., Danzl J.G. (2019) A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. Nat. Protoc. 14:832–863. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0117-3
- 24. Gao R., Yu C.C. (Jay), Gao L., Piatkevich K.D., Neve R.L., Upadhyayula S., Boyden E.S. (2019) A highly homogeneous expansion microscopy polymer composed of tetrahedron-like monomers. bioRxiv. 814111
- 25. Shi X., Li Q., Dai Z., Tran A.A., Feng S., Ramirez A.D., Lin Z., Wang X., Chow T.T., Seiple I.B., Huang B. (2019) Label-retention expansion microscopy. bioRxiv. 687954
- 26. Sun D., Fan X., Shi Y., Zhang H., Huang Z., Cheng B., Tang Q., Li W., Zhu Y., Bai J., Liu W., Li Y., Wang X., Lei X., Chen X. (2021) Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. Nat. Methods. 18: 107–113. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01005-2
- 27. Wang Y., Yu Z., Cahoon C.K., Parmely T., Thomas N., Unruh J.R., Slaughter B.D., Hawley R.S. (2018) Combined expansion microscopy with structured illumination microscopy for analyzing protein complexes. Nat. Protoc. 13: 1869–1895. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0023-8
- Gambarotto D., Zwettler F.U., Cernohorska M., Fortun D., Borgers S., Heine J., Schloetel J.G., Reuss M., Unser M., Boyden E.S., Sauer M., Hamel V., Guichard P. (2018) Imaging beyond the super-resolution limits using ultrastructure expansion microscopy (UltraExM). bioRxiv. 308270
- Tong Z., Beuzer P., Ye Q., Axelrod J., Hong Z., Cang H. (2016) Ex-STORM: Expansion Single Molecule Super-resolution Microscopy. https://doi.org/10.1101/049403

Applying of the Expansion Microscopy Method in Neurobiology

K. Z. Derevtsova^{*a*}, *, E. I. Pchitskaya^{*a*}, A. V. Rakovskaya^{*a*}, and I. B. Bezprozvanny^{*a*}, ^{*b*}, **

^aLaboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

^bDepartment of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

*e-mail: derevtcova19@yandex.ru

**e-mail: mnlabspb@gmail.com

Many biological studies require the analysis of ultrastructural changes at the cellular organelles and molecular interaction. Since the modern confocal microscope resolution is limited by the diffraction limit (200–300 nm), it is impossible to study such small objects using standard fluorescence microscopy. Ultra-high resolution microscopy methods require expensive equipment and are technically difficult in use, which in turn limits their widespread practical application. However, recently appeared methods make it possible to increase the resolution of microscopy not by improving the image registration system, but by physically isotropic expansion of a biological sample using a controlled chemical process. Thereby to this method, called expansion or expansive microscopy (EM), it became possible to obtain three-dimensional images of samples with a resolution sufficient for studying individual cell organelles using a conventional confocal microscope. This review covers the history of this method, its basic principles and examples of use in various fields of biology and medicine, as well as reflects future directions for improving this technology. The article discusses the methodological features of the EM applying in the study of brain tissue samples with an algorithm that can be used to adapt the standard protocol to the goals and objectives of a particular study.

Keywords: expansion microscopy, super-resolution microscopy, polyelectrolyte gel, immunohistochemistry, fluorescence microscopy РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 584-604

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

ИСКУССТВЕННЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД КАЛИЕВОГО КАНАЛА К_V1.1 С высокой селективностью

© 2021 г. В. М. Табакмахер^{1, 2}, А. И. Кузьменков¹, А. М. Гиголаев¹, Э. Л. Пиньейро-Жуниор³, С. Пеньёр³, Р. Г. Ефремов^{1, 4, 5}, Я. Титгат³, А. А. Василевский^{1, 5, *}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия ³Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

⁴Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, Россия ⁵Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 27.11.2020 г. После доработки 07.12.2020 г. Принята к публикации 13.02.2021 г.

У млекопитающих обнаружено порядка 40 изоформ потенциал-чувствительных калиевых каналов (K_V). Для изучения такого разнообразия K_V необходимы вещества, которые способны селективно с ними связываться и изменять их свойства. Ранее мы сообщали о выделении и фармакологической характеристике MeKTx13-3 – пептидного токсина из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. Этот токсин обладал высокой аффинностью к ряду K_V с незначительной селективностью в отношении изоформы K_V 1.1. В настоящей работе мы докладываем о получении методом рационального дизайна искусственного производного MeKTx13-3, названного MeKTx13-3_RMRH. Селективность MeKTx13-3_RMRH по отношению к K_V 1.1 была увеличена на порядок, что делает его одним из самых специфичных лигандов данной изоформы K_V . Наконец, используя компьютерное моделирование, мы продемонстрировали, что избирательность нового лиганда K_V 1.1 может реализовываться за счет специфического положения токсина в комплексе с каналом.

Ключевые слова: нейротоксин, потенциал-зависимый калиевый канал, блокатор калиевых каналов, яд скорпиона, молекулярное моделирование, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0869813921040130

ВВЕДЕНИЕ

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (K_V) — трансмембранные (TM) белки, обеспечивающие пассивный селективный ток ионов калия через мембрану

Список обозначений: K_V – потенциал-чувствительные калиевые каналы; ChTx – харибдотоксин из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; IC_{50} – концентрация полуингибирования; Trx – тиоредоксин; TM – трансмембранный; Π ЦР – полимеразная цепная реакция; Tpuc-HCl – трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид; $O\Phi$ -ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; MД – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; MД – молекулярная динамика.

в ответ на изменение мембранного потенциала [1]. Зрелый ионный канал представляет собой тетрамер α -субъединиц, каждая из которых сформирована шестью TM сегментами (S1–S6) с одним поровым участком (P) между S5 и S6 [2]. Поровый домен канала образуется сближенными S5 и S6 всех четырех α -субъединиц. Кроме того, в составе K_V могут быть вспомогательные β -субъединицы, которые способны модифицировать свойства канала [3]. Отличительной особенностью K_V является наличие потенциал-чувствительных доменов, образованных четырьмя TM сегментами (S1–S4) каждой из α -субъединиц [4, 5]. Согласно последнему руководству Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR), у человека известно порядка 40 генов α -субъединиц K_V, которые называют изоформами [6]. В зависимости от локализации, а также выполняемых функций, K_V могут быть сформированы одинаковыми или разными α -субъединицами, то есть представлять собой гомо- или гетеромеры [7, 8].

Изучение структурных особенностей, физиологических и фармакологических характеристик K_V тесно сопряжено с применением их лигандов [9–11], которые можно разделить на несколько групп. Перечислим основные: (а) ионы металлов, например Cs⁺ и Ba²⁺ [12, 13]; (б) небольшие органические молекулы, такие как 4-аминопиридин и тетраэтиламмоний [14]; и (в) полипептидные токсины, например, харибдотоксин (ChTx) и дендротоксин [15]. Пожалуй, самым богатым источником лигандов К_v выступают яды различных животных, таких как змеи, морские анемоны, улитки конусы, пауки и скорпионы [16]. Токсины скорпионов, несомненно, сыграли ключевую роль в изучении К_V: от пионерских работ по ингибированию калиевого тока в гигантском аксоне кальмара с помощью ноксиустоксина из яда скорпиона *Centruroides noxius* [17, 18] до получения кристаллической структуры комплекса K_V с ChTx из яда скорпиона Leiurus quinquestriatus hebraeus [19, 20]. В настоящий момент, согласно базе данных Kalium (https://kaliumdb.org/), известно и охарактеризовано приблизительно 350 полипептидных лигандов калиевых каналов, более половины (~200) из которых — это токсины, выделенные из яда скорпионов [21, 22].

Большинство токсинов скорпионов, действующих на K_V , состоят из 30–50 аминокислотных остатков, 6 или 8 из которых – остатки цистеина, образующие 3 или 4 внутримолекулярные дисульфидные связи соответственно [16, 23]. При этом в пространстве формируется характерная укладка, получившая название СS α/β (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой) [24, 25]. Несмотря на общность пространственной структуры, токсины могут проявлять различные фармакологические характеристики, избирательно действуя на ту или иную изоформу K_V . Считается, что селективность определяется конкретными аминокислотными остатками токсина, которые формируют специфические контакты с поровым доменом канала [26–28]. В свою очередь, эти особенности могут быть использованы для рационального дизайна искусственных производных с заданными свойствами на базе общего молекулярного каркаса [29–31].

Ранее мы сообщали об идентификации и характеристике токсина MeKTx13-3 (Kalium ID: α -KTx 3.19, UniProt ID: C0HJQ6, 37 аминокислотных остатков, три дисульфидные связи) из яда среднеазиатского скорпиона *Mesobuthus eupeus* [32]. Мы провели фармакологическую характеристику этого полипептида и с помощью электрофизиологических методов установили, что он способен ингибировать калиевый ток через некоторые гомотетрамерные K_V, а именно: K_V1.1, 1.2, 1.3 и 1.6 с концентрациями полуингибирования (IC₅₀) ~ 2, 100, 10 и 60 нМ соответственно. У этого токсина была обнаружена селективность действия в отношении K_V1.1, а не K_V1.2 или 1.3, что является достаточно редким свойством полипептидных лигандов

1	аблица 1.	Список олигонуклеотидов, использованных для конструирования гена MeKTx13-3_RMRH
	Название	Последовательность 5'-3'
	F1	GCGATAGCTACCGACGATGACGATCGTGTGGGGCATTAATGTGAAATGC
	F2	CAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGATGCGGGCATGCGTTTTGGCAAATGC
	R1	TATCGC GGATCC CTATTTCGGGGTGCAATGGCATTTACGATTCATGCATTTGCCAAAACGC
	R2	TGCACGGTTTCAGGCACTGACGGGAATGTTTGCATTTCACATTAATGCCC

Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом; стоп-кодон выделен курсивом; кодоны, кодирующие сайт расщепления энтеропептидазой, подчеркнуты; кодоны, различающиеся с МеКТх13-3, показаны на сером фоне.

K_V [23]. Теперь мы докладываем, что внесение ряда замен в аминокислотную последовательность MeKTx13-3 позволило нам получить более селективный по отношению к K_v1.1 пептид – MeKTx13-3_RMRH. С помощью методов молекулярного моделирования структуры и динамики комплексов этого производного MeKTx13-3 с гомотетрамерами K_V1.1–1.3 мы установили, что избирательность его действия может реализовываться за счет специфического положения токсина в комплексе с каналом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Заявление об этике. Наше исследование строго соответствовало Международным методическим рекомендациям по биомедицинским исследованиям с использованием животных Всемирной организации здравоохранения. Исследование проводилось в организации, аккредитованной AAALAC, в соответствии со стандартами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (8-е издание, Институт лабораторных исследований животных). Лягушки Xenopus laevis использовались в лаборатории токсикологии и фармакологии в соответствии с лицензией LA1210239, что было одобрено этическим комитетом по экспериментам на животных Лёвенского университета (Р186/2019). Уход за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с методическими рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986).

Получение рекомбинантных пептидов. Рекомбинантный MeKTx13-3 RMRH был получен по общей схеме, использованной нами ранее [31]. Целевой пептид получали в бактериальной системе экспрессии в виде слитного белка с тиоредоксином (Trx) [33], который расщепляли рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы человека [34]. Последовательность ДНК, кодирующая MeKTx13-3 RMRH, была сконструирована из частично комплементарных синтетических олигонуклеотидов с помощью ПЦР за два этапа. Сначала в течение пяти циклов использовали четыре олигонуклеотида (F1, F2, R1 и R2, см. табл. 1) для сборки полной последовательности гена. Затем с использованием краевых олигонуклеотидов (F1 и R1) и разбавленной реакционной смеси из первого раунда в качестве матрицы во втором раунде ПЦР был амплифицирован целевой фрагмент ДНК.

Полученный в результате ПЦР фрагмент клонировали в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen) по сайтам рестрикции КрпI и BamHI. Штамм Escherichia coli SHuffle T7 Express (New England Biolabs) трансформировали вектором со вставкой целевого гена и культивировали при 30°C в среде LB до $OD_{600} \sim 0.6$. Экспрессию трансгена индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида. Культуру культивировали при комнатной температуре (24°С) в течение ночи (16 ч), после чего клеточную массу осаждали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 300 мМ NaCl и 50 мМ

587

Трис-HCl (pH 8.0), и обрабатывали ультразвуком. Лизат наносили на металл-хелатную колонку HisPur (ThermoFisher Scientific); слитный белок с Trx очищали в соответствии с протоколом производителя.

Очищенный слитный белок растворяли в 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0) в концентрации 1 мг/мл и гидролизовали в течение ночи (16 ч) при 37°С легкой цепью энтеропептидазы человека (1 ед. фермента на 1 мг субстрата). МеКТх13-3_RMRH очищали обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) в присутствии 0.1%-ной трифторуксусной кислоты на колонке Jupiter C5 (4.6 × 250 мм; Phenomenex). Чистоту целевого пептида проверяли с использованием масс-спектрометрии и аналитической хроматографии на колонке Vydac C18 (4.6 × 250 мм; Separations Group) в том же градиенте ацетонитрила.

Масс-спектрометрия. Измерение молекулярной массы пептида проводили с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии с времяпролетным масс-анализатором на приборе Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik), как описано ранее [35]. В качестве матрицы была использована 2,5-дигидроксибензойная кислота (Sigma-Aldrich). Измерения проводили как в линейном, так и в рефлекторном режимах. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker).

Экспрессия ионных каналов. Подробно общий подход к экспрессии ионных каналов в ооцитах был описан ранее [36]. Для экспрессии генов K_V (крысы (r) K_V 1.1, r K_V 1.2, человека (h) K_V 1.3, r K_V 1.4, r K_V 1.5 и r K_V 1.6) в ооцитах *X. laevis* линеаризованные плазмиды, содержащие соответствующие нуклеотидные последовательности генов, были транскрибированы с использованием набора T7 mMESSAGE-mMACHINE (Ambion). 50 нл раствора кРНК (1 нг/нл) вводили в ооциты с помощью микроинжектора (Drummond Scientific). Ооциты инкубировали в растворе ND96, содержащем: (мM) 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂ и 5 HEPES, pH 7.4, с добавлением сульфата гентамицина (50 мг/л).

Электрофизиологические исследования. Измерения токов через мембрану ооцитов проводились методом двухэлектродной фиксации потенциала при комнатной температуре (18–22°С) с использованием усилителя Geneclamp 500 (Molecular Devices) под управлением системы сбора данных pClamp (Axon Instruments), как описано ранее [36]. В качестве омывающего раствора использовали ND96, потенциал покоя выставляли равным –90 мВ. Токи, опосредованные K_V , индуцировали деполяризацией до 0 мВ в течение 250 мс, после чего потенциал удерживали при –50 мВ в течение 250 мс. Для исследования вольтамперной характеристики токи вызывали последовательной деполяризацией мембраны с шагом в 10 мВ. Для оценки концентрационной зависимости эффектов были построены кривые доза—эффект, где процент ингибирования тока выражен как функция концентрации токсина. Кривые были построены по уравнению Хилла:

$$y = 100 / \left[1 + \left(IC_{50} / [токсин] \right)^{h} \right],$$

где y – доля ингибированного тока, IC₅₀ – концентрация токсина, при которой достигается полумаксимальное ингибирование, [токсин] – концентрация токсина, h – коэффициент Хилла. Сравнение двух выборочных средних было выполнено с использованием парного критерия Стьюдента (p = 0.05 использовалось в качестве порога значимости). Все данные были получены как минимум в трех независимых экспериментах ($n \ge 3$) и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Origin (OriginLab Corporation).

Молекулярное моделирование. Структурная модель MeKTx13-3_RMRH была построена в программе PyMOL Molecular Graphics System, версия 1.8 (Schrödinger, LLC), с использованием процедуры *in silico* мутагенеза. Поскольку аминокислотная последовательность MeKTx13-3 идентична BmKTX [37], пространственная структура последнего (PDB ID: 1BKT) [38] была использована в качестве шаблона. Модели K_V 1.1 и 1.3 были сгенерированы ранее [31, 39–41] в программе MODELLER [42] с использованием структуры K_V 1.2 (3LUT) [43] в качестве шаблона.

Комплексы MeKTx13-3_RMRH с калиевыми каналами моделировали согласно процедуре, описанной в предыдущих работах [31, 39–41], предполагая, что токсин взаимодействует с K_V аналогично ChTx [44]. Модель комплекса MeKTx13-3_RMRH с K_V 1.2 была построена на основе структуры комплекса K_V 1.2/2.1–ChTx (4JTA) [20]: пептид пространственно выравнивали со структурой ChTx в комплексе с каналом, затем удаляли ChTx, оставляя выровненный токсин. Комплексы с K_V 1.1 и 1.3 были созданы аналогичным образом, однако первым шагом было пространственное выравнивание моделей каналов с химерой K_V 1.2/2.1 [31, 39–41].

Молекулярная динамика. Подготовку исследуемых молекулярных систем к моделированию молекулярной динамики (МД) проводили автоматически, с использованием оригинального программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати). Процедура включала несколько этапов. Полученные комплексы MeKTx13-3_RMRH с K_V помещали внутрь липидного бислоя, имитирующего мембрану нейронов. Был использован предварительно уравновешенный фрагмент бислоя ($7.0 \times 7.0 \times 13.5$ нм³; 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-алеросанных 14172 молекулами воды), что подробно описано в предыдущих работах [41, 45, 46]; некоторые молекулы фосфолипидов и холестери-на были удалены, чтобы освободить место для белка. Для сольватации использовали модель воды TIP3P [47] и ионы Na⁺/Cl⁻ в количестве, необходимом для поддержания электронейтральности системы.

Все системы были уравновешены (нагреты до 37°С) в течение 100 пс моделирования МД. Положения С^{α}-атомов остатков канала, не формирующих вестибюль его поры, а также N^{ϵ}-атом остатка Lys26 у MeKTx13-3_RMRH фиксировали во время уравновешивания для предотвращения дестабилизации исходного комплекса. Затем рассчитывали МД систем длительностью 500 нс. Все молекулярно-динамические эксперименты были выполнены с помощью программного обеспечения GROMACS [48] (версия 2018) с использованием набора параметров AMBER99SB-ILDN [49]. Моделирование проводили с шагом по времени 2 фс с использованием трехмерных периодических граничных условий, в изотермическом-изобарическом (NPT) ансамбле с полуизотропным давлением 1 бар и при температуре 37°С. Использовали алгоритмы баростата Берендсена [50] и термостата V-rescale [51]. Вандер-ваальсовы взаимодействия рассчитывали с применением сферической функции обрезания потенциала с отсечкой 1.4 нм. Электростатические взаимодействия учитывали с помощью алгоритма PME. Во время моделирования положение N^{ϵ}-атома остатка Lys26 токсина в каждом комплексе фиксировали внутри поры канала.

Анализ межмолекулярных контактов и оценку вкладов аминокислотных остатков в энергию межмолекулярного взаимодействия в ходе МД выполняли с использованием программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати) аналогично процедурам, подробно описанным в предыдущих исследованиях [31, 41]. Водородные связи оценивали с использованием параметров утилиты hbond пакета GROMACS [48] (расстояние $D-A \le 0.35$ нм и угол $D-H-A \ge 150^{\circ}$ для водородной связи D-H····A, где D и A – донор и акцептор водородной связи соответственно); солевые мостики, π -катионные и стэкинг-взаимодействия, а также гидрофобные контакты рассчитывали, как описано ранее [52, 53]. Оценку энергии межмолекулярных невалентных

взаимодействий осуществляли с использованием силового поля AMBER99SB-ILDN [49] с отсечкой по расстоянию 1.4 нм. Для визуализации молекул использовали программу PyMOL. Графики профилей энергии взаимодействия строили с помощью стандартных библиотек Python и пакета NumPy.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия создания нового лиганда Ку. Благодаря ряду предыдущих исследований были выявлены ключевые аминокислотные остатки токсинов семейства α-КТх 3, обусловливающие высокое сродство к изоформе K_v1.3. Так, мутагенез BmKTX, имеющего ту же аминокислотную последовательность, что и МеКТх13-3, показал, что замена Asp33His в несколько раз усиливает его активность в отношении K_v1.3 [54]. Другой мутантный вариант BmKTX, названный ADWX-1 и содержащий остатки Arg11 и His33, блокирует K_V в субнаномолярных концентрациях [29], тогда как замена этих остатков (Arg11Ala или His33Ala) приводит к значительному снижению активности. Кроме того, AgTx-2 [30, 55], OSK-1 [56] и некоторые другие токсины, которые имеют остатки Arg12, Met29, Arg31 и His34 (соответствуют Arg11, Met28, Arg30 и His33 в токсинах α-КТх 3, лишенных N-концевого остатка глицина), также были описаны как высокоэффективные блокаторы $K_{\rm V}$ 1.3 (табл. 2). Мы решили внести соответствующие четыре замены в структуру MeKTx13-3 (Gly11Arg, Ile28Met, Gly30Arg и Asp33His), ожидая получить при этом новый высокоселективный блокатор K_v1.3. Неожиданно полученный пептид MeKTx13-3_RMRH продемонстрировал высокое сродство к K_V 1.1, в то время как его активность в отношении К_v1.3 не изменилась.

Получение рекомбинантного токсина. Рекомбинантный MeKTx13-3_RMRH получали в штамме *E. coli* SHuffle B по нашему стандартному протоколу. Кодирующую токсин последовательность ДНК клонировали в экспрессионный вектор pET-32b по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. Тгх был использован в качестве белка-помощника для обеспечения правильного расположения дисульфидных связей. После гидролиза слитного белка целевой пептид был очищен с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 1) и идентифицирован с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии и сравнения расчетной и экспериментально установленной молекулярной массы. Конечный выход пептида составил ~3.5 мг с одного литра бактериальной культуры.

Электрофизиологическое исследование MeKTx13-3_RMRH. Характеристика фармакологической активности MeKTx13-3_RMRH проводилась посредством электрофизиологического исследования на ряде изоформ K_V методом двухэлектродной фиксации потенциала. На рис. 2 приведены записи токов через гомотетрамерные калиевые каналы различных изоформ (K_V 1.1–1.3) до и после добавления токсина в концентрации 1 нМ. Хорошо видно, что MeKTx13-3_RMRH проявляет высокую селективность в отношении K_V 1.1. В бо́льших концентрациях он также ингибировал изоформы K_V 1.2, 1.3 и 1.6, в то время как на K_V 1.4 и 1.5 эффект отсутствовал вплоть до концентрации 1 мкМ (данные не показаны). Для всех изоформ K_V , на которых наблюдался эффект, были построены кривые концентрационной зависимости ингибирования (рис. 2, снизу) и рассчитаны значения IC₅₀, составившие 0.11 ± 0.02, 10.7 ± 0.8, 8.1 ± 0.2 и 16.3 ± 1.0 нМ для K_V 1.1, 1.2, 1.3 и 1.6 соответственно.

Молекулярное моделирование. В нашем недавнем исследовании, посвященном молекулярному дизайну селективного блокатора K_V 1.3, были проанализированы структурные и динамические детали взаимодействия MeKTx13-3 с K_V [31]. В текущей работе мы выполнили компьютерное исследование комплексов мутированного варианта этого пептида, названного MeKTx13-3_RMRH, с калиевыми канала-

Токсин	Аминокислотная последовательность и нумерация		Активн	ость, нМ ^b	
Название и источник данных	остатков ^а	Kv1.1	K _v 1.2	K _v 1.3	K _v 1.6
	01 05 10 15 20 25 30 35 38				
KTX-1 [30]	GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	$1.1^{d,v}$	$20^{d,v}$	$0.1^{d,v}$	
AgTx-2 [30, 55]	GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	0.044 ^{<i>i</i>,<i>v</i>}	3.4 ^{<i>d</i>,<i>v</i>}	$0.004^{i,v}$	0.037 ^{<i>i</i>,<i>v</i>}
Aam-KTX [57]	GVEINVKCTGSHQCIKPCKDAGMRFGKCINRKCHCTPK-NH2	>750 ^{c,v}	$10.4^{c,v}$	1.1 ^{c,v}	
AgTx-1 [55]	GVPINVKCTGSPQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCHCTPK	136 ^{<i>i</i>,<i>v</i>}		1.7 ^{<i>i</i>,<i>v</i>}	149 ^{<i>i</i>,<i>v</i>}
OsK-1 [56]	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	$0.6^{c,p}$	5.4 ^{c,p}	0.014 ^{c,p}	>1000 ^{c,p}
BoiTx1 [58]	GVPINVKCRGSRDCLDPCKKAGMRFGKCINSKCHCTP-	550/50 ^{c,v}		550/50	
OdK2 [59]	GVPTDVKCRGSPQCIQPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	>35 ^{c,v}	>35 ^{c,v}	7.2 ^{c,v}	>35 ^{c,v}
MeKTx13-2 [32, 60]	-REIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYGKCMNGKCNCTPK-NH2	90.3 ^{c,v}	2677.7 ^{c,v}	311.7 ^{c,v}	266.3 ^{c,v}
MeuKTx-3 [61]	-VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK-NH2	0.203 ^{c,v}	8.92 ^{c,v}	$0.172^{c,v}$	2000/93 ^{c,v}
MeKTx13-3 [32, 60]	-VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK-NH2	1.9 ^{c,v}	105 ^{c,v}	8.9 ^{c,v}	63.4 ^{c,v}
MeKTx13-3 AAAR [31]	-VGINVKCKHSGACLAPCADAGMRFGKCINGKCRCTPK	541.5 ^{c,v}	218.2 ^{c,v}	9.1 ^{c,v}	1522.3 ^{c,v}
MeKTx13-3 RMRH (эта работа)-VGINVKCKHSRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	0.11 ^{c,v}	10.7 ^{c,v}	8.1 ^{c,v}	16.3 ^{c,v}
BmKTX [54, 61]	-VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK-NH2	$2000/100^{i,v}$	2000/73 ^{i,v}	0.090 ^{c,p}	2000/91 ^{i,v}
BmKTX (N4A) [54]	-VGIAVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK	,		0.437 ^{c,p}	
BmKTX (K6A) [54]	-VGINVACKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK			0.581 ^{c,p}	
BmKTX (K8A) [54]	-VGINVKCAHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK			0.410 ^{c,p}	
BmKTX (H9A) [54]	-VGINVKCKASGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK			2.140 ^{c,p}	
BmKTX (O12A) [54]	-VGINVKCKHSGACLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK			0.930 ^{c,p}	
BmKTX (K15A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLAPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK			0.055 ^{c,p}	
BmKTX (K18A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCADAGMRFGKCINGKCDCTPK			3.898 ^{c,p}	
BmKTX (M22A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGARFGKCINGKCDCTPK			0.454 ^{c,p}	
BmKTX (R23A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMAFGKCINGKCDCTPK			175.706 ^{c,p}	
BmKTX (F24A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRAGKCINGKCDCTPK			9.700 ^{c,p}	
BmKTX (K26N) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGACINGKCDCTPK			5.457 ^{c,p}	
BmKTX (K31A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGACDCTPK			0.821 ^{c,p}	
BmKTX (T35A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCAPK			0.134 ^{c,p}	
BmKTX (P36A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTAK			1.460 ^{c,p}	
BmKTX-D33H [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCHCTPK			0.015 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (R23A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMAFGKCINGKCHCTPK			27.218 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (F24A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRAGKCINGKCHCTPK			20.998 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (K26A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGACINGKCHCTPK			4 555 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (128A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCANGKCHCTPK			0.721 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (N29A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCIAGKCHCTPK			6 164 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (H33A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCACTPK			0.430 ^{c,p}	
BmKTX-D33H (T35A) [54]	-VGINVKCKHSGOCLKPCKDAGMRFGKCINGKCHCAPK			$0.340^{c,p}$	
ADWX-1 [29]		0.65 ^{c,p}	$>100^{c,p}$	$0.002^{c,p}$	
ADWX-1 (R11A) [29]		0.05	/ 100	0.336 ^{c,p}	
ADWX-1 (R23A) [29]				7 344 ^{c,p}	
ADWX-1 (F24A) [29]				4 013 ^{c,p}	
ADWX-1 (K26A) [29]				9 674 ^{c,p}	
ADWX-1 (T28A) [29]	-VGINVKCKHSROCLKPCKDAGMRFGKCANGKCHCTPK			0.058 ^{c,p}	
ADWX-1 (N29A) [29]	-VGINVKCKHSROCLKPCKDAGMRFGKCTAGKCHCTPK			0.454 ^{c,p}	
ADWX-1 (H33A) [29]				0.077 ^{c,p}	
ADWX-1 (T35A) [29]	-VGINVKCKHSROCLKPCKDAGMRFGKCTNGKCHCAPK			0.028 ^{c,p}	

Таблица 2. Аминокислотные последовательности токсинов семейства α -КТх 3, их мутантов и синтетических аналогов с активностью, изученной на K_V

a — нумерация остатков для пептидов с N-концевым остатком глицина показана над последовательностями, нумерация для остальных пептидов показана под последовательностями; —NH₂ указывает на С-концевое амидирование природного токсина. Консервативные остатки цистеина показаны жирным шрифтом; остатки, которые отличают пептиды от MeKTx13-3, показаны на сером фоне; наиболее частые замены выделены жирным шрифтом на сером фоне. b — значения показаны в следующих форматах: X — значение K_d , K_i или IC₅₀ в hM; >X — токсин не действовал до значения X; X/Y — означает, что токсин в концентрации X снижает ионный ток через канал на Y процентов. Тип данных: c — полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀); d — константа диссоциации (K_d); i — константа ингибирования (K_i). Примененные экспериментальные методы: v — электрофизиология с использованием метода двухэлектродной фиксации потенциала; p — электрофизиология с использованием техники локальной фиксации потенциала. Данные об аминокислотных последовательностях, N-концевом амидировании и активности токсинов получены с использованием базы данных Kalium [22].



Рис. 1. Получение MeKTx13-3_RMRH. (а) – ОФ-ВЭЖХ: выделение рекомбинантного MeKTx13-3_RMRH из гидролизата слитного белка, расщепленного легкой цепью энтерокиназы человека. (b) – очистка целевого пептида с помощью ОФ-ВЭЖХ.

ми, для выяснения причин неожиданной специфичности к K_V1.1. Мы построили модели пространственной структуры комплексов MeKTx13-3_RMRH с K_V1.1–1.3, рассчитали траектории МД комплексов, встроенных в липидный бислой, проанализировали межмолекулярные контакты и вклады остатков в энергию взаимодействия канал—токсин, а также сравнили результаты с данными для MeKTx13-3 (см. рис. 3, 4b–d, 5, табл. 3).

Согласно результатам компьютерного исследования, замена lle28Met не приводит к заметному изменению межмолекулярных контактов или энергии межмолекулярных взаимодействий (рис. 3). Число и качество межмолекулярных контактов, образованных остатком 28 в комплексах MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH, различаются незначительно (табл. 3). Это наблюдение хорошо согласуется с экспериментальными данными, демонстрирующими, что мутация lle28Met не приводит к функциональным изменениям токсина при переходе от BmKTx к MeuKTx-3 (табл. 2) [61].

Как было отмечено в нашей предыдущей работе [31], остаток Asp33 у MeKTx13-3 вносит значительный положительный вклад в энергию взаимодействия (снижает аффинность) (рис. 3) из-за электростатического отталкивания от консервативного отрицательно заряженного остатка в вестибюле канала (Asp377/375/399 у K_V 1.1/1.2/1.3, см. рис. 4a). Неудивительно, что замена Asp33His в MeKTx13-3_RMRH нивелирует неблагоприятный энергетический вклад. Кроме того, His33 образует водородную связь в комплексе с K_V 1.1 (His33-Gly376, см. рис. 4c). Таким образом, преимущества замены Asp33His для стабилизации комплекса MeKTx13-3_RMRH— K_V 1.1 не подлежат сомнению. Однако маловероятно, что этот остаток является существенным для увеличения специфичности к K_V 1.1, наблюдаемом при переходе от MeKTx13-3 к MeKTx13-3_RMRH, поскольку (a) His9 образует две водородные связи с K_V 1.2, что может вносить вклад в увеличение сродства к этому каналу (табл. 2); (б) замена Asp33Arg в MeKTx13-3_AAAR [31] (привносит благоприятный вклад в энергию взаимодействия и обеспечивает множество возможностей для образования полярных контактов) не предотвратила уменьшение сродства к K_V 1.1, вызванное другими заменами.

Другие замененные остатки у MeKTx13-3_RMRH, Arg11 и Arg30, вносят значительный благоприятный вклад в энергию взаимодействия (рис. 3). Более того, эти модификации приводят к образованию двенадцати (четверть от общего числа)



Рис. 2. Фармакологическая характеристика MeKTx13-3_RMRH. (a) – записи тока через мембрану ооцитов X. laevis, опосредованного каналами K_V , в контроле (черные кривые) и после добавления 1 нМ пептида (красные кривые). (b) – зависимость уровня ингибирования каналов $K_V 1.1-1.3$ и 1.6 от концентрации токсина по результатам электрофизиологических экспериментов.

межмолекулярных контактов (табл. 3): трех водородных связей и трех солевых мостиков (Arg11—Asp361, Arg11—Asp377, Arg30—Asp361, см. рис. 4с, d), а также трех π - π - μ и трех π -катионных взаимодействий (Arg11—His355, Arg11—Phe356, Arg30—Phe356) в комплексе с K_V1.1. Стоит отметить, что аналогичные контакты невозможны в комплексах MeKTx13-3 с K_V, поскольку остатки Gly11 и Gly30 не имеют боковых цепей.

Тем не менее, контакты, образованные Arg11 и Arg30, сами по себе не объясняют высокую специфичность MeKTx13-3_RMRH к $K_V1.1$. Эти замены не вызывают столь значительного увеличения сродства к $K_V1.2$ и 1.3, хотя они также участвуют во множестве взаимодействий с этими двумя каналами. Очевидно, что контакты Arg11 и Arg30 способствуют оптимальному положению токсина и ориентации участков канала для возникновения других взаимодействий в комплексе с $K_V1.1$, что в конечном итоге и обусловливает специфичность пептида. В частности, контакты Arg30–Asp361 и Arg30–Phe356 фиксируют участок канального белка между



Рис. 3. Профили энергии взаимодействия пептидных токсинов в комплексах с K_V1.1–1.3. (a) – профиль MeKTx13-3; (b) – MeKTx13-3_RMRH. Гистограммы показывают вклады остатков в энергию взаимодействия, усредненные по траектории МД. Планки погрешностей отражают стандартные отклонения. Аминокислотные последовательности показаны над номерами остатков; замены в MeKTx13-3_RMRH показаны красным шрифтом. Данные для MeKTx13-3 были описаны в предыдущем исследовании [31].

остатками Phe356 и Asp361 рядом с токсином в комплексе MeKTx13-3_RMRH- K_V 1.1. Такая фиксация может ограничивать подвижность соседнего фрагмента канала между остатками Glu353 и His355, обеспечивая оптимальное положение Glu353 для образования водородной связи и солевого мостика с остатком пептида Lys31 (рис. 4, 5). Аналогичные контакты не реализуются в комплексах с K_V 1.2/1.3, поскольку боковые цепи соответствующих остатков Asp351/Thr375 не могут достичь ε -аминогруппы Lys31.

Контакт Pro36—Туr379 также возникает благодаря особому положению токсина в комплексе с K_V1.1. Основная цепь Pro36 у MeKTx13-3_RMRH образует водородную связь с боковой цепью K_V1.1-специфичного остатка Туr379 (рис. 4с), чего не происходит в комплексе MeKTx13-3—K_V1.1. Аналогичные контакты не наблюдаются в комплексах с другими каналами: боковая цепь Val377 у K_V1.2 слишком коротка и не имеет соответствующей функциональной группы, а боковая цепь His401 у K_V1.3 не может достичь основной цепи Pro36.

Очевидно, что формирование двух водородных связей и двух солевых мостиков Lys37—Asp361 и Lys37—Asp377, а также "среднеживущих" водородных связей His9—Glu353 и Gln12—Glu353 (рис. 4d) также становится возможными в комплексе MeKTx13-3_RMRH—K_v1.1 в результате особого пространственного расположения токсина относительно канального белка. Следует отметить, что аналогичные контакты, образованные Lys37, наблюдаются в комплексе MeKTx13-3 с K_v1.3 (Lys37—Asp383, Lys37—Asp399), и такие же контакты, образованные His9 и Gln12, обнаружены в комплексе MeKTx13-3 с K_v1.2 (His9—Asp351, Gln12—Asp351) [31], но не в комплексах MeKTx13-3_RMRH с любым из этих двух каналов. Потеря этих



контактов также может быть объяснена несколько различающимся положением токсина дикого типа и его мутанта в комплексах с K_v1.2 и 1.3.

Особое расположение MeKTx13-3_RMRH, стабилизируемое взаимодействиями Arg11 и Arg30 в исследуемых комплексах, приводит не только к исчезновению некоторых контактов, наблюдаемых в комплексах токсина дикого типа, но и появлению новых взаимодействий. Так, в комплексах MeKTx13-3_RMRH с K_V 1.1, 1.2 и 1.3 наблюдаются 45, 29 и 23 специфичных контакта соответственно, и лишь 10, 8 и 3 из них идентичны для MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH. По-видимому, при переходе от MeKTx13-3 к MeKTx13-3_RMRH увеличение числа контактов приводит к увеличению сродства к K_V 1.1 и 1.2 (поскольку мутант образует больше контактов в этих двух комплексах), но не влияет на сродство к K_V 1.3. (табл. 2, 3). **Рис. 4.** Модель структуры MeKTx13-3 RMRH в комплексе с K_V1.1. (a) – выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточных участков поры каналов K_V1.1-1.3. Индексы "h" и "r" перед названиями каналов указывают на организм – источник (человек и крыса соответственно). Нумерация остатков указана над каждой последовательностью; отличающиеся остатки показаны на сером фоне. (b) – общая структура комплекса K_V1.1–MeKTx13-3_RMRH в гидратированном липидном бислое после 500 нс МД. Субъединицы К_V1.1 показаны в виде ленточной модели (серым, коричневым, голубым и синим); спирали порового домена субъединицы канала на переднем плане и потенциал-чувствительный домен соседней субъединицы, а также длинные внеклеточные петли не показаны для ясности визуального восприятия. Липиды показаны в виде полупрозрачных шаровых моделей; цвета атомов: кислород – красный; фосфор – оранжевый; азот – синий; водород амино- и гидроксигруппы – белый; углерод РОРС – светло-желтый; углерод РОРЕ – желтый; углерод холестерина – бежевый. Некоторые липиды не показаны для ясности визуального восприятия. MeKTx13-3_RMRH показан розовым цветом; остаток Lys26 (закупоривает пору канала) показан в виде стержневой модели. (c, d) - крупный план (вид слева и справа соответственно) вестибюля поры канала, показанной на панели b. Канал показан в полупрозрачном виде. Липиды не показаны. Боковые цепи Lys26 и других остатков, участвующих в межмолекулярных контактах, показаны в виде стержневых моделей; для остатков Pro36, Lys37 и Gly376 показаны некоторые атомы основной цепи. Полярные контакты (водородные связи и солевые мостики) показаны зелеными пунктирными линиями. В момент, показанный на панели d, His9 не образует контакт с Glu353.



Рис. 5. (a, b) – изменение расстояния между фрагментами канала и токсинов в течение МД: (a) – между фрагментом Phe356–Asp361 K_V1.1 и остатком Gly30/Arg30 у MeKTx13-3/MeKTx13-3_RMRH, (b) – между фрагментом Glu353–His355 K_V1.1 и остатком Lys31 токсинов. Расстояние рассчитано между геометрическими центрами полипептидных фрагментов канала и атомами основной цепи соответствующих остатков токсинов. (c, d) – среднеквадратичное отклонение (RMSD) положения фрагментов Kv1.1 в комплексе с MeKTx13-3/MeKTx13-3_RMRH в течение МД: (c) – RMSD фрагмента Phe356–Asp361 K_V1.1, (d) – фрагмента Glu353–His355.

Таблица 3. Межмолеку.	лярные контакт	ы, наблюдаемые в компл	ексах MeKTx13-3	и MeKTx13-3_RMRH с	: К _V на протяже	нии траектории МД
			Число конта	іктов в комплексах		
Контакты ^а		Kv1.1		K _V 1.2		Kv1.3
	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH
		Все специф	рические взаимо,	цействия ^b		
Долгоживущие	7	17	6	6	15	17
Среднеживущие	21	23	10	17	11	4
Короткоживущие	4	5	3	3	4	2
Общее число	32	45 (10) ^c	22	29 (8)	30	23 (3)
	_	B	зодородные связі	1	_	
Долгоживущие	5	8	8	7	8	10
Среднеживущие	10	14	8	14	7	3
Короткоживущие	2	3	3	2	3	2
Общее число	17	25 (7)	19	23 (8)	18	15 (3)
	- -		Солевые мостики		-	
Долгоживущие	1	5	1	2	4	5
Среднеживущие	3	2	2	2	2	I
Короткоживущие	Ι	I	Ι	1	1	I
Общее число	4	7 (1)	3	5 (0)	7	5 (0)
	-	Стэкин	нг/π-π-взаимоде	іствия	_	
Долгоживущие	Ι	2	I	I	2	I
Среднеживущие	ю	2	Ι	Ι	1	1
Короткоживущие	1	1	I	I	Ι	I
Общее число	4	5 (1)	Ι	Ι	3	1 (0)

2 Ê ł . 9 E 2 Ľ.

596

			Число конт:	иктов в комплексах		
Контакты ^а		K _V 1.1		K _V 1.2		Kv1.3
	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH
		π-кати	онные взаимодеі	йствия		
Долгоживущие	1	2	I	I	1	2
Среднеживущие	5	5	I	1	1	I
Короткоживущие	1	-	I	I	I	I
Общее число	7	8 (1)	Ι	1 (0)	2	2 (0)
	-	Все неспецифическ	сие (гидрофобны	е) взаимодействия	-	
Долгоживущие	154	188	162	169	149	168
Среднеживущие	92	86	68	113	94	66
Короткоживущие	18	10	6	25	20	11
Общее число	264	284	239	307	263	245
	_	Гидрофобные	е взаимодействия	1 Ile28/Met28	_	
Долгоживущие	19	13	10	14	12	13
Среднеживущие	1	5	5	5	7	2
Короткоживущие	Ι	I	I	I	1	1
Общее число	20	18 (9)	15	19 (14)	20	16 (13)
 а – время жизни каждого презентативных данных), контакты: время жизни бо контактов в комплексах с 	контакта, учитыва Короткоживущие лее 50%. b – водој МеКТх13-3 RMR	емое как часть времени трае контакты: время жизни бол родные связи, солевые мост H и MeKTx13-3 указано в ско	ктории МД (всего ісе 7%, но менее 1(ики, стэкинг/π-π-і обках.	300 нс, начиная с 200 нс: п 3%; среднеживущие контан ззаимодействия и π-катио	грвые 200 нс не у сты: время жизни иные взаимодейс	итывали для получения ре- 1 менее 50%; долгоживущие гвия. с – число идентичных

Таблица 3. Окончание

Согласно результатам компьютерного анализа межмолекулярных контактов, MeKTx13-3_RMRH образует 23 специфических и 245 гидрофобных контактов с K_V 1.3, а MeKTx13-3 — 30 и 263 соответственно. Однако число долгоживущих водородных связей и солевых мостиков в комплексе с MeKTx13-3_RMRH (10 и 5 соответственно) больше, чем в комплексе с токсином дикого типа (8 и 4). Предположительно, сходная активность токсинов в отношении K_V 1.3 связана с перераспределением количества и качества контактов (табл. 3).

Обобщая результаты вычислительного анализа, можно сделать вывод, что Arg11 и Arg30 играют существенную роль в селективном связывании MeKTx13-3_RMRH с K_V 1.1. В комплексах с K_V эти остатки стабилизируют специфическое положение токсина относительно канального белка за счет большого количества межмолекулярных взаимодействий. Особое расположение токсина обеспечивает формирование дополнительных контактов (остатками Lys31, Pro36, Lys37, а также His9 и Gln12) в комплексе с K_V 1.1, что, как мы полагаем, лежит в основе высокого сродства к этой изоформе.

Селективные лиганды $K_V 1.1$ редко встречаются среди токсинов животных. В результате анализа имеющихся данных об известных лигандах калиевых каналов, проведенного с использованием базы данных Kalium [22], было установлено, что лишь небольшое число природных полипептидных токсинов обладает селективностью к $K_V 1.1$. Среди них всего три токсина скорпионов: хонготоксин-1 (HgTX1; α -KTx 2.5, P59847) из яда *Centruroides limbatus*, MeKTx13-2 (α -KTx 3.18, C0HJQ4) и MeKTx13-3 (α -KTx 3.19, C0HJQ6) из яда *M. eupeus* [32, 62]. В яде других животных $K_V 1.1$ -селективные токсины также являются весьма редкими компонентами. Были обнаружены и выделены лишь две такие молекулы: BgK (κ -actitoxin-Bgr1a, P29186) и APEKTx1 (κ PI-actitoxin-Ael3a, P86862) из морских анемон *Bunodosoma granuliferum* и *Anthopleura elegantissima* соответственно [36, 63]. В настоящее время APEK-Tx1 является бесспорным лидером среди $K_V 1.1$ -селективных лигандов, демонстрируя значение IC₅₀ около 1 нМ и не проявляя перекрестной активности на других изоформах K_V вплоть до концентрации 1 мкМ [36].

Для количественной оценки специфичности лиганда в отношении различных изоформ ионных каналов, в частности K_V 1.1, был использован коэффициент селективности: соотношение значений IC_{50} (или K_d) для двух каналов [40]. Этот параметр наглядно отражает специфичность каждого токсина в отношении K_V 1.1 (табл. 4). Как и предполагалось, APEKTx1 имеет самый высокий коэффициент селективности (более 1000 для каждой пары калиевых каналов). МеKTx13-2 и MeKTx13-3 — природные токсины из яда скорпиона, демонстрирующие специфичность к K_V 1.1 по сравнению с K_V 1.3, но для MeKTx13-3_RMRH этот параметр на порядок выше. Таким образом, в настоящее время MeKTx13-3_RMRH является наиболее селективным лигандом K_V 1.1, созданным на основе структуры токсина из яда скорпиона (табл. 4).

Подавляющее большинство полипептидных лигандов могут ингибировать несколько сходных изоформ гомотетрамерных калиевых каналов [16, 64, 65]. Иногда у токсинов наблюдают специфичность в отношении одной или двух определенных изоформ. Например, OSK1 (α -KTx 3.7, P55896) из яда скорпиона Orthochirus scrobiculosus селективен по отношению к K_v1.3, тогда как OSK3 (α -KTx 8.8, A0A1L2FZD4) из яда того же скорпиона действует на K_v1.2 и 1.3 в сопоставимых концентрациях [39, 56]. Большинство работ по идентификации и дизайну селективных полипептидов, действующих на калиевые каналы, сосредоточено на лигандах K_v1.3 [10]. Эта изоформа K_v считается одной из важнейших фармакологических мишеней в развитии ряда аутоиммунных заболеваний [66], поэтому селективные пептидные ингибиторы,

Токсин	K _v 1.2/K _v 1.1	K _v 1.3/K _v 1.1					
Te	эксины скорпионов						
MeKTx13-3_RMRH (эта работа)	79	57					
MeKTx13-2 [32]	30	4					
MeKTx13-3 [32]	56	5					
HgTX1 [62]	6	3					
Токсины морских анемон							
APEKTx1 [36]	>1111	>1111					
BgK [63]	2	3					

Таблица 4.	Лептидные токсины с наибольшей селективностью в отношении K _v 1.1. Для пере	3-
численных	оксинов соотношение IC ₅₀ (или K _d) показано для указанных пар каналов	

например moka1 [30], ShK-186 [67] и HsTX1 [R14A] [68], рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических средств [69]. Ряд пептидов, таких как конотоксин кМ-RIIIJ (к-conotoxin RIIIJ, P0CG45) [70] и актинотоксин BcsTx1 (к-actitoxin-Bcs3a, C0HJC2) [71], а также токсины скорпионов MeKTx11-1 (α -KTx 1.16, C0HJQ7) [40] и MMTX (α -KTx 26.4, P0DL65) [72], обладают высокой селективностью в отношении K_V1.2. Для родственной изоформы K_V1.1 список селективных лигандов намного короче (см. выше).

Существует несколько общих ограничений для исследований, направленных на создание и характеристику новых изоформ-специфичных лигандов, включая производные токсинов. Во-первых, субъединичный состав тетрамеров К_V может быть весьма различным, а гетеромерные каналы гораздо чаще экспрессируются *in vivo*, включая каналы, содержащие комплексы K_v1.1 и 1.2 [73]. При этом стехиометрия подобных комплексов пока не установлена и неизвестно, где конкретно в организме происходит их экспрессия. Второе ограничение связано с недостатком фармакологических данных для большого количества известных лигандов. К сожалению, полномасштабные измерения, включая определение IC₅₀ и K_d, к настоящему времени были выполнены для небольшого числа полипептидных токсинов. Наконец, дальнейшая разработка новых лигандов K_v в значительной степени связана с исследованиями пространственной структуры комплексов канал-токсин [20], поэтому решение задач этого направления структурной биологии имеет приоритетное значение. Стоит отметить, что К_V1.1 и 1.2 считаются одними из наиболее распространенных изоформ К_V в центральной нервной системе, где они локализуются преимущественно в аксонах и окончаниях нейронов [7]. Использование селективных лигандов, подобных описанному нами MeKTx13-3 RMRH, позволит разобраться в специфических функциях этих каналов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-44-01015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

А.И.К. и А.А.В. спланировали исследование. А.И.К. и А.М.Г. выполнили биохимические эксперименты и получили рекомбинантные пептиды. С.П. и Э.Л.П.-Ж. выполнили электрофизиологические эксперименты. В.М.Т. выполнил молекулярное моделирование. А.А.В. руководил биохимическими экспериментами. Я.Т. руководил электрофизиологическими экспериментами. Р.Г.Е. руководил молекулярным моделированием. В.М.Т., А.И.К. и А.А.В. написали статью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления на суперкомпьютерах были профинансированы в рамках программы фундаментальных исследований Национального исследовательского университета "Высшая школа экономики" и проекта повышения конкурентоспособности "5-100". Расчеты МД проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра "Политехнический" Санкт-Петербургского Политехнического университета (http://scc.spbstu.ru) и ЦКП "Дальневосточный вычислительный ресурс" ИАПУ ДВО РАН (https://cc.dvo.ru).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Hille B.* (2001) Ion channels of excitable membranes, 3rd edn. Sinauer Associates: Sunderland MA, Chicago.
- Long S.B., Campbell E.B., MacKinnon R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K + channel. Science. 309: 897–903. https://doi.org/10.1126/science.1116269
- 3. Pongs O., Leicher T., Berger M., Roeper J., Bähring R., Wray D., Giese K.P., Silva A.J., Storm J.F. (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K+ channel β subunits. Ann. N.Y. Acad. Sci. e868: 344–355. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11296.x
- 4. *Catterall W.A.* (2010) Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. Neuron. 67: 915–928.
- https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021
- 5. Sansom M.S.P. (2000) Potassium channels: Watching a voltage-sensor tilt and twist. Curr. Biol. 10: R206–R209.

https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00354-7

- Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A., Veale E.L., Striessnig J., Kelly E., Armstrong J.F., Faccenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A., Aldrich R.W., Becirovic E., Biel M., Catterall W.A., Conner A.C., Davies P., Delling M., Virgilio F. Di, Falzoni S., George C., Goldstein S.A.N., Grissmer S., Ha K., Hammelmann V., Hanukoglu I., Jarvis M., Jensen A.A., Kaczmarek L.K., Kellenberger S., Kennedy C., King B., Lynch J.W., Perez-Reyes E., Plant L.D., Rash L.D., Ren D., Sivilotti L.G., Smart T.G., Snutch T.P., Tian J., Van den Eynde C., Vriens J., Wei A.D., Winn B.T., Wulff H., Xu H., Yue L., Zhang X., Zhu M. (2019) The Concise Guide to Pharmacology 2019/20: Ion channels. Br. J. Pharmacol. 176: S142–S228. https://doi.org/10.1111/bph.14749
- Vacher H., Mohapatra D.P., Trimmer J.S. (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. Physiol. Rev. 88: 1407–1447. https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2008
- Manganas L.N., Trimmer J.S. (2000) Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. J. Biol. Chem. 275: 29685–29693. https://doi.org/10.1074/jbc.M005010200
- Garcia M.L., Galvez A., Garcia-Calvo M., King V.F., Vazquez J., Kaczorowski G.J. (1991) Use of toxins to study potassium channels. J. Bioenerg. Biomembr. 23: 615–646. https://doi.org/10.1007/BF00785814
- Wulff H., Castle N.A., Pardo L.A. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. Nat. Rev. Drug. Discov. 8: 982–1001. https://doi.org/10.1038/nrd2983
- 11. Norton R.S., Chandy K.G. (2017) Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. Neuropharmacology. 127: 124–138. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.002
- Hagiwara S., Miyazaki S., Rosenthal N.P. (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. J. Gen. Physiol. 67: 621–638.
 https://doi.org/10.1085/jap.67.6.621
 - https://doi.org/10.1085/jgp.67.6.621
- 13. Ludwig J., Terlau H., Wunder F., Bruggemann A., Pardo L.A., Marquardt A., Stuhmer W., Pongs O. (1994) Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium

channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. EMBO J. 13: 4451–4458. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06767.x

- Robertson D.W., Steinberg M.I. (1990) Potassium channel modulators: Scientific applications and therapeutic promise. J. Med. Chem. 33: 1529–1541. https://doi.org/10.1021/jm00168a001
- Moczydlowski E., Lucchesi K., Ravindran A. (1988) An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. J. Membr. Biol. 105: 95–111. https://doi.org/10.1007/BF02009164
- Kuzmenkov A.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2015) Diversity of potassium channel ligands: Focus on scorpion toxins. Biochemistry (Mosc.). 80: 1764–1799. https://doi.org/10.1134/S0006297915130118
- Domingos Possani L., Martin B.M., Svendsen I.B. (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K+ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 47: 285–289. https://doi.org/10.1007/BF02907789
- Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L.D., Maelicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K+ channels by a novel scorpion toxin. Nature. 296: 90–91. https://doi.org/10.1038/296090a0
- 19. *Miller C., Moczydlowski E., Latorre R., Phillips M.* (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca2+-activated K+ channels from mammalian skeletal muscle. Nature. 313: 316–318. https://doi.org/10.1038/313316a0
- 20. Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. Elife. 2: e00594. https://doi.org/10.7554/eLife.00594
- Kuzmenkov A.I., Krylov N.A., Chugunov A.O., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2016) Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. Database (Oxford). 2016: baw056. https://doi.org/10.1093/database/baw056
- 22. *Tabakmakher V.M., Krylov N.A., Kuzmenkov A.I., Efremov R.G., Vassilevski A.A.* (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. Sci. Data 6: 73. https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x
- Bergeron Z.L., Bingham J.P. (2012) Scorpion toxins specific for potassium (K+) channels: A historical overview of peptide bioengineering. Toxins (Basel). 4: 1082–1119. https://doi.org/10.3390/toxins4111082
- Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B., Sabatier J.-M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. Curr. Pharm. Des. 14: 2503–2518. https://doi.org/10.2174/138161208785777441
- 25. Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J.M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. Biochem. J. 378: 717–726. https://doi.org/10.1042/bj20031860
- 26. Jouirou B., Mouhat S., Andreotti N., De Waard M., Sabatier J.M. (2004) Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K+ channels. Toxicon. 43: 909–914. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.024
- 27. Giangiacomo K.M., Ceralde Y., Mullmann T.J. (2004) Molecular basis of α-KTx specificity. Toxicon. 43: 877–886. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.029
- Rodríguez De La Vega R.C., Merino E., Becerril B., Possani L.D. (2003) Novel interactions between K+ channels and scorpion toxins. Trends Pharmacol. Sci. 24: 222–227. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00080-4
- Han S., Yi H., Yin S.J., Chen Z.Y., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X. (2008) Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1.3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease. J. Biol. Chem. 283: 19058–19065. https://doi.org/10.1074/jbc.M802054200
- Takacs Z., Toups M., Kollewe A, Johnson E., Cuello L.G., Driessens G., Biancalana M., Koide A., Ponte C.G., Perozo E., Gajewski T.F., Suarez-Kurtz G., Koide S., Goldstein S.A.N. (2009) A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 22211–22216. https://doi.org/10.1073/pnas.0910123106
- Gigolaev A.M., Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Pinheiro-Junior E.L., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Vassilevski A.A. (2020) Tuning scorpion toxin selectivity: Switching from KV1.1 to KV1.3. Front. Pharmacol. 11: 1010. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01010
- Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tytgat J., Vassilevski A.A. (2019) Pharmacological characterisation of MeKTx13-2 and MeKTx13-3, peptide ligands of potassium channels from the scorpion Mesobuthus eupeus venom. Russ. J. Physiol. 105: 1452–1462. https://doi.org/10.1134/S0869813919110074

- McCoy J., Lavallie E. (2001) Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter. 16: Unit16.8. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1608s28
- Gasparian M.E., Bychkov M.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. (2011) Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes. Protein. Expr. Purif. 79: 191–196. https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.04.005
- 35. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2016) Lachesana tarabaevi, an expert in membrane-active toxins. Biochem. J. 473: 2495–2506. https://doi.org/10.1042/BCJ20160436
- Peigneur S., Billen B., Derua R., Waelkens E., Debaveye S., Béress L., Tytgat J. (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. Biochem. Pharmacol. 82: 81–90. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023
- 37. Romi-Lebrun R., Lebrun B., Martin-Eauclaire M.-F., Ishiguro M., Escoubas P., Wu F.Q., Hisada M., Pongs O., Nakajima T. (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion Buthus martensi, which act on K+ channels. Biochemistry. 36: 13473–13482.
 - https://doi.org/10.1021/bi971044w
- 38. *Renisio J.G., Romi-Lebrun R., Blanc E., Bornet O., Nakajima T., Darbon H.* (2000) Solution structure of BmKTX, a K+ blocker toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensi*. Proteins. 38: 70–78.
 - https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1<70::AID-PROT8>3.0.CO;2-5
- Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Chugunov A.O., Tabakmakher V.M., Efremov R.G., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2017) C-Terminal residues in small potassium channel blockers OdK1 and OSK3 from scorpion venom fine-tune the selectivity. Biochim. Biophys. Acta. – Proteins Proteomics. 1865: 465–472. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.02.001
- A. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Gigolaev A.M., Fradkov A.F., Kudryashova K.S., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. (2018) KV1.2 channel-specific blocker from Mesobuthus eupeus scorpion venom: Structural basis of selectivity. Neuropharmacology. 143: 228–238. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.030
- 41. Berkut A.A., Chugunov A.O., Mineev K.S., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Krylov N.A., Oparin P.B., Lihonosova A.F., Novikova E.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tytgat J., Efremov R.G., Vassilevski A.A. (2019) Protein surface topography as a tool to enhance the selective activity of a potassium channel blocker. J. Biol. Chem. 294: 18349–18359. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010494
- 42. Webb B., Sali A. (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. In: Current Protocols in Bioinformatics. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., USA. 5.6.1-5.6.37. https://doi.org/10.1002/cpbi.3
- 43. Chen X., Wang Q., Ni F, Ma J. (2010) Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 11352–11357. https://doi.org/10.1073/pnas.1000142107
- 44. Goldstein S.A., Pheasant D.J., Miller C. (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. Neuron. 12: 1377–88. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90452-9
- 45. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Janickova H., Dolejsi E., Dolezal V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Efremov R.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. (2015) Structural insight into specificity of interactions between nonconventional three-finger weak toxin from Naja kaouthia (WTX) and muscarinic acetylcholine receptors. J. Biol. Chem. 290: 23616–23630.
 - https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656595
- 46. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2016) Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. Sci. Rep. 6: 33112. https://doi.org/10.1038/srep33112
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 79: 926–935. https://doi.org/10.1063/1.445869
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. (2015) GRO-MACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 1: 19–25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001
- Klepeis J.L., Lindorff-Larsen K., Shaw D.E., Palmo K., Dror R.O., Maragakis P., Piana S. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. Proteins. 78: 1950–1958. https://doi.org/10.1002/prot.22711

- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys. 81: 3684–3690. https://doi.org/10.1063/1.448118
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. J. Chem. Phys. 126: 014101. https://doi.org/10.1063/1.2408420
- Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2009) PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. Bioinformatics. 25: 1201–1202.
- https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp111
- Pyrkov T., Efremov R. (2007) A fragment-based scoring function to re-rank ATP docking results. Int. J. Mol. Sci. 8: 1083–1094. https://doi.org/10.3390/i8111083
- 54. Chen Z., Hu Y., Hu J., Yang W., Sabatier J.M., De Waard M., Cao Z., Li W., Han S., Wu Y. (2014) Unusual binding mode of scorpion toxin BmKTX onto potassium channels relies on its distribution of acidic residues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 447: 70–76. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.101
- 55. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K+ channels from Leiurus quinquestriatus var. hebraeus venom. Biochemistry. 33: 6834–6839. https://doi.org/10.1021/bi00188a012
- 56. Mouhat S., Visan V., Ananthakrishnan S., Wulff H, Andreotti N., Grissmer S., Darbon H., De Waard M., Sabatier J.M. (2005) K+ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom. Biochem. J. 385: 95–104. https://doi.org/10.1042/BJ20041379
- 57. Abbas N., Belghazi M., Abdel-Mottaleb Y., Tytgat J., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F. (2008) A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 376: 525–530. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.033
- 58. Kozminsky-Atias A., Somech E., Zilberberg N. (2007) Isolation of the first toxin from the scorpion Buthus occitanus israelis showing preference for Shaker potassium channels. FEBS Lett. 581: 2478–2484. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.065
- 59. Abdel-Mottaleb Y., Vandendriessche T., Clynen E., Landuyt B., Jalali A., Vatanpour H., Schoofs L., Tytgat J. (2008) OdK2, a Kv1.3 channel-selective toxin from the venom of the Iranian scorpion Odonthobuthus doriae. Toxicon. 51: 1424–1430. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.027
- Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. (2015) Variability of potassium channel blockers in Mesobuthus eupeus scorpion venom with focus on Kv1.1: An integrated transcriptomic and proteomic study. J. Biol. Chem. 290(19): 12195–12209. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637611
- 61. Gao B., Peigneur S., Tytgat J., Zhu S. (2010) A potent potassium channel blocker from Mesobuthus eupeus scorpion venom. Biochimie. 92: 1847–1853. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.003
- Koschak A., Bugianesi R.M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Knaus H.G. (1998) Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. J. Biol. Chem. 273: 2639–2644. https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2639
- 63. Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castañeda O., Harvey A.L., Vita C., Ménez A. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone Bunodosoma granulifera, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. Eur. J. Biochem. 244:192–202. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00192.x
- 64. Peigneur S., Orts D.J.B., Prieto da Silva A.R., Oguiura N., Boni-Mitake M., de Oliveira E.B, Zaharenko A.J., de Freitas J.C., Tytgat J. (2012) Crotamine pharmacology revisited: Novel insights based on the inhibition of KV channels. Mol. Pharmacol. 82: 90–96. https://doi.org/10.1124/mol.112.078188
- 65. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. Mol. Pharmacol. 45(6): 1227–1234.
- 66. Chandy K.G., Norton R.S. (2017) Peptide blockers of Kv1.3 channels in T cells as therapeutics for autoimmune disease. Curr. Opin. Chem. Biol. 38:97–107. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.015
- 67. Beeton C., Pennington M.W., Wulff H., Singh S., Nugent D., Crossley G., Khaytin I., Calabresi P.A., Chen C.Y., Gutman G.A., Chandy K.G. (2005) Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. Mol. Pharmacol. 67:

603

1369-1381.

https://doi.org/10.1124/mol.104.008193

68. Rashid M.H., Huq R., Tanner M.R., Chhabra S., Khoo K.K., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Pennington M.W., Beeton C., Kuyucak S., Norton R.S. (2015) A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. Sci. Rep. 4: 4509.

https://doi.org/10.1038/srep04509

- 69. *Tajti G., Wai D.C.C., Panyi G., Norton R.S.* (2020) The voltage-gated potassium channel KV1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides. Biochem. Pharmacol. 181: 114146. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114146
- Chen P., Dendorfer A., Finol-Urdaneta R.K., Terlau H., Olivera B.M. (2010) Biochemical characterization of κM-RIIIJ, a Kv1.2 channel blocker. J. Biol. Chem. 285: 14882–14889. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068486
- 71. Orts D.J.B., Peigneur S., Madio B., Cassoli J.S., Montandon G.G., Pimenta A.M.C., Bicudo J.E.P.W., Freitas J.C., Zaharenko A.J., Tytgat J. (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of Bunodosoma caissarum. Mar. Drugs. 11: 655–679. https://doi.org/10.3390/md11030655
- Wang X., Umetsu Y., Gao B., Ohki S., Zhu S. (2015) Mesomartoxin, a new Kv1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. Biochem. Pharmacol. 93:232–239. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.002
- Koch R.O., Wanner S.G., Koschak A., Hanner M., Schwarzer C., Kaczorowski G.J., Slaughter R.S., Garcia M.L., Knaus H.G. (1997) Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K+ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. J. Biol. Chem. 272: 27577–27581. https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27577

Artificial Peptide Ligand of Potassium Channel K_v1.1 with High Selectivity

V. M. Tabakmakher^{*a*, *b*}, A. I. Kuzmenkov^{*a*}, A. M. Gigolaev^{*a*}, E. L. Pinheiro-Junior^{*c*}, S. Peigneur^{*c*}, R. G. Efremov^{*a*, *d*, *e*}, J. Tytgat^{*c*}, and A. A. Vassilevski^{*a*, *e*, *}

^aShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bSchool of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^cKU Leuven, Leuven, Belgium

^dNational Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia ^eMoscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia *e-mail: avas@ibch.ru

In mammals, about 40 isoforms of voltage-gated potassium channels (K_Vs) have been found. To study such a variety of K_Vs , substances are needed that are able to selectively bind to them and change their properties. We have previously reported on the isolation and pharmacological characterization of MeKTx13-3, a peptide toxin from the venom of the scorpion *Mesobuthus eupeus*. This toxin has shown high affinity to a number of K_Vs , with little selectivity for the $K_V1.1$ isoform. In this paper, we describe the production of an artificial derivative of MeKTx13-3, named MeKTx13-3_RMRH, using rational design. The selectivity of MeKTx13-3_RMRH in relation to $K_V1.1$ is increased by an order of magnitude making it one of the most specific ligands of this K_V isoform. Finally, using computer simulations, we demonstrate that the preference of the new ligand to $K_V1.1$ can be realized through a specific positioning of the toxin in complex with the channel.

Keywords: neurotoxin, voltage-gated potassium channel, potassium channel blocker, scorpion venom, molecular modeling, molecular dynamics

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 605-615

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ У КРЫС С ФЕТАЛЬНЫМ ВАЛЬПРОАТНЫМ СИНДРОМОМ

© 2021 г. А. Ю. Архипов¹, Д. В. Самигуллин¹, И. И. Семина², А. И. Маломуж^{1, *}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия ²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия *E-mail: artur57@gmail.com

> Поступила в редакцию 14.01.2021 г. После доработки 29.01.2021 г. Принята к публикации 01.02.2021 г.

Одной из распространенных экспериментальных моделей для изучения развития расстройств аутистического спектра (РАС) и методов их терапии является модель вальпроатного синдрома у грызунов. Особи, рожденные от самок, получавших инъекции вальпроевой кислоты в периоде беременности, демонстрируют ряд нарушений, свойственных для РАС. Ранее было установлено, что вальпроевая кислота влияет на нервно-мышечную передачу и, более того, изменяет экспрессию набора генов при развитии нервно-мышечного синапса. Однако до последнего времени не было известно, изменяется ли нервно-мышечная нейротрансмиссия у животных с фетальным вальпроатным синдромом и если да, то как? С помощью функционального теста "вращающийся стержень" нами было установлено, что у крыс с выработанной моделью вальпроатного синдрома координация движений не отличалась от контрольных животных. С помощью методов микроэлектродной электрофизиологии анализировали (i) амплитудно-временные параметры одиночных постсинаптических сигналов; (ii) частоту спонтанного выделения квантов ацетилхолина; (iii) количество квантов ацетилхолина, выделившегося в ответ на стимул; (iv) амплитуды вызванных ответов в процессе ритмической стимуляции. Нами не было выявлено каких-либо изменений в процессах выделения ацетилхолина из нервного окончания и его рецепции на мембране мышечного волокна как в покое, так и при стимуляции нерва. Таким образом, можно заключить, что у крыс с фетальным вальпроатным синдромом периферическая холинергическая нейротрансмиссия не претерпевает каких-либо функционально-значимых изменений.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, фетальный вальпроатный синдром, физическая активность, нервно-мышечный синапс, ацетилхолин, нейротрансмиссия

DOI: 10.31857/S0869813921040026

Аутизм относят к расстройствам аутистического спектра (РАС). РАС – это пожизненное расстройство психического развития, характеризующееся ранними нарушениями социальной коммуникации и социального взаимодействия, которые сопровождаются тревожностью и стереотипным поведением [1–3]. Кроме классических симптомов, при аутизме отмечается наличие целого спектра неврологических нарушений. Последние включают в себя нарушения в функционировании опорно-двигательного аппарата: мышечные дистония и гипотония, проблемы со статической и динамической координацией, неравномерное становление крупных и мелких моторных актов, проблемы с построением ритма и выдерживанием темпа в сложных повторяющихся движениях, и т.д. [4]. Несмотря на то, что причины большинства из этих нарушений, несомненно, лежат в области ЦНС, тем не менее, наличие изменений в периферическом отделе нервной системы (в том числе и в функционировании нервно-мышечной передачи) не отрицается. Более того, дефект в синаптической передаче сигнала действительно рассматривается как один из элементов в патогенезе аутизма [1]. Поскольку нервно-мышечный контакт является ключевым звеном в инициации любого двигательного акта — от произвольного движения тела или конечностей до дыхания и сокращения голосовых связок, то изучение процессов функционирования этого контакта в рамках аутистических расстройств является весьма актуальным.

Аутизм — это полиэтиологичное заболевание, поэтому только экспериментальные модели на животных позволяют комплексно изучать и получать новые сведения о его патогенезе, в который вовлекаются как центральные, так и периферические звенья нервной системы. Одной из наиболее популярных моделей РАС является экспериментальная модель фетального вальпроатного синдрома (ФВС) на грызунах, в которой используется введение вальпроевой кислоты в пренатальном периоде [5]. Потомство, полученное от таких крыс, демонстрирует поведение, имеющее общие черты с основными симптомами аутизма: дефицит социального поведения, нарушение коммуникации, наличие стереотипности и тревожности [6–8]. Данная модель признана учеными и клиническими специалистами во всем мире и считается одной из самых адекватных моделей РАС и по настоящее время [9].

На фоне множества данных о поведенческих нарушениях у грызунов с ФВС, обусловленных изменениями в функционировании ЦНС, до сих пор отсутствуют сведения о работе периферической нервной системы, и не изучены механизмы синаптической передачи у крыс с данной моделью РАС. При этом есть целый ряд экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу того, что вальпроевая кислота влияет на функционирование нервно-мышечного контакта, снижая [10] или усиливая [11] силу сокращений мышцы. Кроме того, установлено, что вальпроевая кислота изменяет работу большого количества генов, участвующих в процессе развития нервно-мышечного синапса [12]. Все эти перечисленные факты и предопределили выполнение настоящего исследования, цель которого заключалась в проведении функциональной оценки нервно-мышечной нейротрансмиссии у крыс с ФВС. Среди показателей на уровне целого организма были выбраны функциональная оценка координации движений и устойчивость к физической утомляемости. На уровне нервно-мышечного контакта оценивали чувствительность мембраны мышечного волокна к ацетилхолину (АХ), интенсивность процессов выделения АХ из двигательного нервного окончания в покое и в ответ на одиночную и ритмическую стимуляцию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Исследование проводили на крысах линии Вистар. До начала проведения экспериментов все животные содержались в стандартных условиях, в естественном световом режиме на полнорациональной сбалансированной диете (согласно ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением международных требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, и согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (согласно ГОСТ З 51000.3-96 и 510004-96). Все исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанского ГМУ Минздрава России, протокол заседания № 81 от 11.10.2017.

Экспериментальная модель РАС, фетальный вальпроатный синдром (ФВС). Для моделирования аутизма у крыс была использована вальпроевая модель [5]. Вальпроевую кислоту (Конвулекс; G.L.PHARMA, Австрия) вводили самкам крыс подкожно в дозе 500 мг/кг на 13-й день беременности, так как именно этот период является критическим для эмбрионального развития, и на него приходится пик нейрогенеза и экспрессии генов в нейромедиаторных системах. Эксперименты проведены на потомстве (самцах) этих крыс в возрасте 85–95 дней. Для данного исследования были выбраны самцы, поскольку, согласно эпидемиологическим данным, РАС встречается чаще у мальчиков, чем у девочек (примерно 4 : 1 в пользу мужского пола) [13].

В качестве контроля использовали самцов такого же возраста (85–95 дней), полученных от самок, которым вводили на 13-й день беременности такой же объем физиологического раствора, что и экспериментальным животным, но без вальпроевой кислоты.

Оценка развития вальпроатного синдрома. Для получения доказательства того, что у потомства крыс действительно развились аутистически-подобные нарушения, нами были проведены характерные поведенческие тесты. Учитывая то, что одним из значимых нарушений поведения у крыс с ФВС является тревожность, нами была проведена оценка этого показателя с использованием тестов "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) и "Открытое поле" (ОП).

Тест ПКЛ позиционируется как один из наиболее чувствительных методов для исследования тревожности животного [14]. Установка (НПО "Открытая наука", Россия) представляет собой квадратную площадку (14×14 см) и четыре перпендикулярно расположенных рукава: два закрытых и два открытых. Закрытые рукава являются аналогом норы, а открытые — потенциально опасной областью. Размер рукавов для крыс составляет 50×14 см. Лабиринт приподнят над полом на 70 см. Продолжительность теста для каждого животного составляла 3 мин. Крысу помещали в центр лабиринта, носом к открытому рукаву. Фиксировали продолжительность пребывания крысы в открытых рукавах лабиринта, уменьшение которой рассматривается как показатель развития тревожности.

Тест ОП мы использовали в качестве дополнительной оценки степени развития аутистически-подобных нарушений. Установка ОП представляет собой камеру круглой формы (диаметром 97 см) с непрозрачными стенами (высотой 42 см). Пол расчерчен на сектора для удобства визуальной регистрации и имеет на своей поверхности отверстия, имитирующие норы. Критерием перехода из одного сектора в другой являлось нахождение задних лап в новом секторе. За 3 мин тестирования регистрировали: число пересеченных линий, что отражает неспецифический уровень возбуждения (двигательная активность); количество обследованных отверстий, что является показателем исследовательской активности; число актов умывания (груминг), что отражает общую стереотипную активность животных; число актов дефекации, что отражает уровень эмоциональности (в том числе, тревожности) животных.

Фиксация поведенческих актов осуществлялась при помощи цифровой видеосистемы с использованием компьютерной программы Ethovision XT "Noldus" (Нидерланды) с автоматическим анализом треков. Это позволяло получить точную количественную оценку динамики формирования поведенческих навыков, стратегии поведения животного в ходе опыта, а также обнаруживать даже самые слабые различия в поведении на модели в сравнении с контрольной группой.

Функциональная оценка двигательной активности. Для выявления возможных нарушений координации, мышечной дистонии или других двигательных нарушений использовали методику тестирования "Вращающийся стержень". Тестирование проводили на установке Ротарод (Нейроботикс, Россия). Перед тестированием крысы были помещены для адаптации на барабан, который вращался со скоростью 7 об/мин, где находились до первого падения, после чего животные удалялись в домашнюю клетку. Далее через 30 мин осуществляли тестирование при вращении барабана со скоростью 15 об/мин, при этом проводили регистрацию времени удержания животных на барабане.

Оценка функционирования нервно-мышечного синапса методами электрофизиологии. Исследование холинергической периферической нейротрансмиссии проводили на нервно-мышечном препарате *n. facial — musculus levator auris longus (m. LAL)*, который хорошо зарекомендовал себя как удобная модель для изучения различных функциональных аспектов нервно-мышечной трансмиссии [15, 16].

Изолированный нервно-мышечный препарат выделяли из декапитированных под изофлурановым наркозом животных и помещали в экспериментальную ванночку, перфузируемую оксигенированным (95% $O_2 + 5\%$ CO₂) раствором Рингера–Кребса (ммоль/л): NaCl 137.0, KCl 5.0, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 11.0, Na₂HPO₄ 1.0, d-glucose 11.0; pH 7.3–7.4. Для предотвращения мышечных сокращений во время стимуляции и регистрации полноценного квантового выброса АХ препарат инкубировали с μ -конотоксином GIIIB (1 мкмоль/л, Peptide; Peptide Institute, Inc., Япония). Эксперименты проводили при 20.0 ± 0.3°C.

Процессы нейросекреции AX из двигательной нервной терминали и чувствительность постсинаптической мембраны оценивали по изменениям потенциала на сарколемме вследствие активации ионотропных ацетилхолиновых рецепторов медиатором, выделяющемся как в покое (спонтанное выделение), так и при электрической стимуляции нерва (вызванное выделение). Мембранный потенциал покоя (МПП), миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП; результат выделения одиночных порций, квантов, AX), и вызванные потенциалы концевой пластинки (ПКП; результат одновременного выделения множества квантов AX в ответ на электрический стимул) регистрировались в синаптической зоне мышечного волокна стандартной микроэлектродной техникой. Стеклянные микроэлектроды (с сопротивлением кончика 20–30 М Ω) заполнялись раствором КСl в концентрации 3 моль/л.

Спонтанную квантовую секрецию AX, ее уровень, оценивали по частоте возникновения МПКП.

Об изменениях в чувствительности постсинаптической мембраны к AX судили, анализируя амплитуду и постоянную времени спада МПКП.

Вызванную квантовую секрецию AX оценивали по величине квантового состава (количество порций медиатора, приведшее к возникновению конкретного вызванного постсинаптического ответа) при редкой частоте стимуляции (0.5 Гц). Квантовый состав рассчитывался путем деления средней амплитуды вызванного ответа на среднюю амплитуду МПКП, зарегистрированного в этой же синаптической области [17]. При стимуляции пачками импульсов (10 и 30 Гц) вызванную квантовую секрецию АХ оценивали по изменениям амплитуд ПКП в пачке. Для сравнения темпа снижения сигналов у разных животных амплитуду каждого сигнала нормализовали к амплитуде первого в пачке стимулов [18]. Оценивали отношение средней амплитуды от 10 последних сигналов к амплитуде первого в пачке [19].

Для регистрации синаптических сигналов использовали усилитель Axoclamp 900A (Molecular Devices, США), аналого-цифровой преобразователь Digidata 1440A (Molecular Devices, США) и программу pClamp 10.4 (Molecular Devices, США). Во всех экспериментах регистрация проводилась в синаптической зоне волокон с МПП от -60 и до -80 мВ. Данные экспериментов, в которых мембрана деполяризовалась более, чем на 5 мВ, исключались из обработки [20]. В каждом нервно-мы-

	Тест ПКЛ			Тест ОП		
Группа	время нахождения в открытых рукавах ПКЛ, с	двигательная активность, (кол-во пересеченных линий) кол-в		кол-во актов дефекации	исследовательская активность (число обследованных отверстий)	
Контроль (<i>n</i> = 10)	69.0 ± 21.6	43.2 ± 6.3	1.9 ± 0.7	1.3 ± 0.5	14 ± 2.5	
Крысы с ФВС $(n = 8)$	$37.9\pm5.6^*$	58.8 ± 8.7	$6.6\pm2.1*$	$6.5\pm1.8^*$	7.9 ± 3.3	

Таблица 1. Параметры поведения крыс с фетальным вальпроатным синдромом (ФВС) в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) и в тесте "Открытое поле" (ОП)

Данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего, **p* < 0.05.

шечном препарате регистрировали МПКП в течение 2-х мин и около 50 ПКП (при стимуляции в 0.5 Гц) в 5–15 синаптических контактах. Далее, регистрировали 50 ПКП при стимуляции нерва 10 и 30 Гц.

Статистика. Все результаты представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. В поведенческих тестах n – количество животных, в электрофизиологических исследованиях n – количество синапсов. Проверку выборки на нормальное распределение проводили во всех сериях экспериментов с помощью критерия Д'Агостино–Пирсона. В данном случае статистическую значимость выявляли с помощью критерия Стьюдента. Статистическую обработку данных по вызванной пачечной активности проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследования была проведена оценка развития ФВС у экспериментальных животных. Поскольку именно повышенный уровень тревожности является одним из ключевых показателей развития вальпроатного синдрома и одним из "классических" атрибутов развития РАС [6–8], то оценивали ее у животных на установках ПКЛ и ОП.

Численные значения результатов экспериментов, проведенных на ПКЛ, представлены в табл. 1. Крысы, рожденные от самок, которым вводили вальпроевую кислоту, значительно меньше времени (на 45%, p < 0.05) проводили в открытых рукавах лабиринта по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует о более высоком уровне их тревожности.

О развитии тревожности у крыс с ФВС также свидетельствует и значительное повышение (в 5 раз, p < 0.05) количества актов дефекации на установке ОП (табл. 1). Кроме того, о развитии другой, характерной для РАС черты поведения (а именно повышение стереотипной активности), свидетельствует увеличение количества актов груминга более чем в 3.5 раза (p < 0.05; табл. 1).

Таким образом, у экспериментальных крыс подтверждается наличие изменений в поведении, характерных для вальпроевой модели РАС, и эти животные были использованы в дальнейшем для функциональной оценки периферической холинергической нейротрансмиссии.

Для исследования возможных функциональных изменений со стороны периферической нервной системы и скелетной мускулатуры, нами была изучена способность крыс удерживаться на вращающемся стержне (установка Ротарод). Время удержания у контрольных животных составило 64.3 ± 7.8 с (n = 10), а у крыс с $\Phi BC - 63.1 \pm 7.6$ с (n = 8).

На основании полученных результатов мы сделали вывод, что у крыс с ФВС отсутствуют какие-либо двигательные нарушения, изменение координации и мы-

Таблица 2. Параметры миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызван-
ных потенциалов концевой пластинки (ПКП) в синапсах m . LAL у контрольных крыс и крыс
с фетальным вальпроатным синдромом (ФВС)

]	Параметры МПК	СП	Параметры ПКП		
Группа	частота МПКП, с ⁻¹	амплитуда, мВ	постоянная времени спада сигнала, мс	амплитуда, мВ	квантовый состав	
Контроль (<i>n</i> = 32)	1.29 ± 0.16	0.82 ± 0.05	3.30 ± 0.12	21.8 ± 1.2	29.0 ± 1.7	
Крысы с Φ BC ($n = 41$)	1.29 ± 0.13	0.80 ± 0.05	3.44 ± 0.09	24.0 ± 1.2	34.0 ± 2.3	

Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего.

шечного тонуса, однако вопрос о возможных изменениях в функционировании нервно-мышечного синапса все же оставался открытым.

Подробное исследование функциональных аспектов периферической холинергической нейротрансмиссии было начато с анализа процесса спонтанной нейросекреции и чувствительности постсинаптической мембраны мышечного волокна к ацетилхолину.

Средняя частота регистрируемых МПКП, характеризующая уровень спонтанного выделения квантов АХ, в синапсах нервно-мышечного препарата контрольных животных составила $1.29 \pm 0.16 \text{ c}^{-1}$ (n = 32). Амплитуда и постоянная времени спада зарегистрированных сигналов, изменение которых свидетельствует как о чувствительности постсинаптической мембраны к АХ, так и о свойствах размера кванта медиатора, представлены в табл. 2. У животных с выработанным фетальным вальпроатным синдромом никаких изменений в регистрируемых параметрах МПКП отмечено не было (табл. 2, рис. 1, во всех случаях p > 0.05, n = 41). Следовательно, ни уровень спонтанного выделения АХ из двигательных нервных окончаний, ни чувствительность постсинаптических рецепторов к АХ у животных с ФВС не претерпевают изменений.

Поскольку в основе передачи возбуждения с нейрона на эффекторную клетку лежит вызванный стимулом процесс синхронного выделения множества квантов медиатора, то необходимо было оценить и данный вид нейросекреции у экспериментальных животных. Средние значения амплитуды и квантового состава ПКП при редкой стимуляции (0.5 Гц) нерва *m. LAL* представлены в табл. 2. В синапсах животных экспериментальной группы эти значения были схожими и достоверного отличия не наблюдалось (p > 0,05 для обоих параметров; табл. 2, рис. 1).

При эпизодах ритмической активности, когда нерв раздражают пачками стимулов, проявляется такой феномен как депрессия амплитуды ПКП, что является интегральной характеристикой таких процессов, как экзоцитоз, эндоцитоз, рециклирование и заполнение медиатором синаптических везикул [21].

Степень этой депрессии амплитуд зависит от частоты стимуляции. Так, в синапсах контрольных животных при частоте стимуляции в 10 и 30 Гц средняя амплитуда десяти последних ответов по отношению к первому снижалась на $22.0 \pm 5.2\%$ (n = 7) и $39.2 \pm 5.3\%$ (n = 5) соответственно. У животных с ФВС мы не наблюдали каких-либо изменений в динамике снижения постсинаптических сигналов (в обоих случаях p > 0.05; рис. 2). Так, средняя амплитуда последних десяти ПКП снижалась на $22.4 \pm 4.9\%$ (n = 7) и $30.5 \pm 4.6\%$ (n = 8), при частотах стимуляции 10 и 30 Гц соответственно. Таким образом, нами не было выявлено никаких функциональных изменений не только в процессах спонтанной, но и вызванной нейротрансмиссии в нервно-мышечных синапсах у крыс с ФВС.



Рис. 1. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки (mEPPs) и вызванные потенциалы концевой пластинки (EPPs), зарегистрированные в нервно-мышечном синапсе *m. LAL* контрольной крысы (Control) и крысы с фетальным вальпроатным синдромом, моделью PAC (VPA model of ASDs).

Представлены данные в рамках одного репрезентативного эксперимента (один синаптический контакт у контрольного животного и у животного с моделью РАС). Слева – фрагмент нативной записи миниатюрных потенциалов концевой пластинки и их суперпозиция (30 сигналов); справа – суперпозиция 30 вызванных потенциалов концевой пластинки (серым – нативные сигналы, черным – усредненный сигнал).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы установили, что у крыс с ФВС как одной из популярных экспериментальных моделей РАС, по крайне мере к трехмесячному возрасту, не обнаруживается значимых отличий от контрольных животных ни в координации движений, ни в параметрах нервно-мышечной трансмиссии. Необходимость получения этих данных была продиктована наличием целого ряда предпосылок, о которых стоит упомянуть подробнее.

На нервно-мышечном препарате крысы *in vitro* было продемонстрировано, что вальпроевая кислота обладает способностью частично блокировать мышечные сокращения при прямой или непрямой стимуляции [10]. При этом авторы приходят к следующему заключению: несмотря на то, что возникающий частичный блок вызван преимущественно прямым ингибирующим действием на мышцу, эффекты вальпроевой кислоты отражают прямое действие этого агента на нервно-мышечное соединение [10]. При введении же вальпроата *in vivo*, наоборот, наблюдалось быстрое и устойчивое увеличение силы сокращения скелетных мышц у трансгенных мышей с боковым амиотрофическим склерозом [11]. Более того, увеличение силы мышечного сокращения при терапии вальпроатом было отмечено у пациентов со спинальной мышечной атрофией III/IV типа [22]. Эти описанные эффекты совсем не означают, что вальпроат влияет только на мышцу. Например, в уже упомянутой работе [11] показано наличие нейропротекторного действия вальпроата непосредственно на холинергические мотонейроны, иннервирующие скелетную



Рис. 2. Депрессия амплитуд потенциалов концевой пластинки (ЕРР) в синапсе *m. LAL* при стимуляции двигательного нерва с частотами 10 и 30 Гц у контрольной крысы (Control) и крысы с фетальным валь-проатным синдромом, моделью PAC (VPA model of ASDs).

На левой панели представлено относительное изменение амплитуд постсинаптических ответов в ходе пачки импульсов. Данные представлены как % от амплитуды первого сигнала в пачке (средние значения ± стандартная ошибка среднего). Средняя и правая панели – запись нативных первого и пятидесятого сигналов в пачке, зарегистрированных в одном репрезентативном эксперименте (один синаптический контакт контрольного животного и животного с моделью РАС).

мышцу. Судя по всему, это действие вальпроата имеет многофакторную природу. В частности, выявлено, что вальпроат повышает уровень белка SMN (survival motor neuron protein) [23]. Кроме того, показано увеличение уровней антиапоптотических факторов Bcl-2 и Bcl-xL в нейронах спинного мозга при действии вальпроата [24].

Хотя вышеприведенные данные и относятся к эпизодическому или хроническому действию вальпроата на нервно-мышечный аппарат молодого или взрослого организма, тем не менее, имеются данные и о значительном, долговременном влиянии этого агента на развитие синаптических контактов на ранних этапах онтогенеза. Так, в возрасте 4 нед. животные с ФВС демонстрируют снижение уровня глутаматдекарбоксилазы (маркера ГАМКергической сигнализации) [25]. При этом имеет место увеличение экспрессии везикулярного транспортера глутамата (маркера глутаматергической сигнализации) [25]. К настоящему моменту в холинергическом нервно-мышечном синапсе позвоночных выявлены как глутаматергический, так и ГАМКергический сигнальные пути [26, 27]. Поскольку их функционирование отражается как на процессах выделения АХ [28, 29], так и на сократительной функции скелетной мускулатуры [30, 31], то возможные изменения в глутаматергической и ГАМКергической сигнализации у экспериментальных животных вполне могли быть выявлены используемыми нами методами исследования. О значительных изменениях в развивающемся синаптическом контакте при действии вальпроата свидетельствуют и результаты работы Yoshida с соавт. [12], которые демонстрируют, что данный фармакологический агент приводит к изменениям экспрессии целого ряда генов в культивируемых мотонейронах и миотрубках. Так, в частности,
в культивируемых мотонейронах 227 генов увеличивают свою экспрессию более чем в два раза при действии вальпроата [12].

Таким образом, подводя итог вышесказанному, можно было полагать, что системное воздействие вальпроата на ранних стадиях онтогенеза (на пренатальном этапе развития) вполне могло сказаться и на функционировании нервно-мышечного контакта в зрелом организме. Однако, как показывают результаты наших исследований, в зрелом организме крыс с ФВС не наблюдается каких-либо функциональных изменений в процессе холинергической сигнализации на уровне периферического синаптического контакта.

Полученные результаты не исключают возможных изменений в работе других молекулярных сигнальных систем, что диктует необходимость продолжения комплексного изучения синаптической функции периферической нервной системы на моделях РАС.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 18-00-01658 КОМФИ) в части моделирования вальпроатного синдрома у крыс и исследования механизма нервномышечной передачи; отработка методики электрофизиологического анализа процессов нейротрансмиссии и материальное сопровождение электрофизиологических экспериментов осуществлено при поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (С.И.И., М.А.И.), сбор данных (А.А.Ю.), обработка данных (С.И.И., А.А.Ю., М.А.И.), написание и редактирование манускрипта (С.И.И., М.А.И., А.А.Ю., С.Д.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abrahams B.S., Geschwind D.H. (2008) Advances in autism genetics: On the threshold of a new neurobiology. Nat. Rev. Genet. 9: 341–355. https://doi.org/10.1038/nrg2346
- 2. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Am. Psychiatr Associat Arlington. 2013.
- 3. Lai M.C., Lombardo M.V., Baron-Cohen S. (2014) Autism. Lancet. 383: 896–910. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1
- 4. Zavadenko N., Pechatnikova N.L., Semashkova N.V., Zavadenko A.N. Orlova K.A. (2015) Neurological disorders in children with autism. Ros. Vestn Perinatol i Pediatr [(Russ. Bull. Perinatol. Pediatr) 60: 14–21 (In Russ)].
- Schneider T., Roman A., Basta-Kaim A., Kubera M., Budziszewska B., Schneider K., Przewłocki R. (2008) Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. Psychoneuroendocrinology. 33: 728–740. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011
- Christensen J., Grønborg T.K., Sørensen J., Schendel D., Parner E.T., Pedersen L., Vestergaard M. (2013) Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. JAMA 309: 696–703. https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270
- Chomiak T., Turner N., Hu B. (2013) What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. Patholog, Res. Int. 2013: 712–758. https://doi.org/10.1155/2013/712758
- Baronio D., Castro K., Gonchoroski, de Melo G.M., Nunes G.D.F., Bambini-Junior V., Riesgo R. (2015) Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. PLoS One. 10: 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116363

- 9. *Nicolini C., Fahnestock M.* (2018) The valproic acid-induced rodent model of autism. Exp. Neurol. 299(Pt A): 217–227.
- https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017
- 10. Nguyen A., Ramzan I. (1997) In vitro neuromuscular effects of valproic acid. Br. J. Anaesth. 78: 197–200.
 - https://doi.org/10.1093/bja/78.2.197
- Rouaux C., Panteleeva I., René F., Gonzalez de Aguilar J.L., Echaniz-Laguna A., Dupuis L., Menger Y., Boutillier A.L., Loeffler J.P. (2007) Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. J. Neurosci. 27: 5535–5545. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1139-07.2007
- Yoshida M., Kitaoka S., Egawa N., Yamane M., Ikeda R., Tsukita K., Amano N., Watanabe A., Morimoto M., Takahashi J., Hosoi H., Nakahata T., Inoue H., Saito M.K. (2015) Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs Stem. Cell Rep. 4: 561–568. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.02.010
- Newschaffer C.J., Croen L.A., Daniels J., Giarelli E., Grether J.K., Levy S.E., Mandell D.S., Miller L.A., Pinto-Martin J., Reaven J., Reynolds A.M., Rice C.E., Schendel D., Windham G.C. (2007) The epidemiology of autism spectrum disorders. Annu. Rev. Public. Health. 28: 235–258. https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007
- Walf A.A., Frye C.A. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat. Protoc. 2: 322–328. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44
- Angaut-Petit D., Molgo J., Connold A.L., Faille L. (1987) The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. Neurosci Lett. 82: 83–88. https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90175-3
- Burke S.R.A., Reed E.J. Romer S.H., Voss A.A. (2018) Levator Auris Longus Preparation for Examination of Mammalian Neuromuscular Transmission Under Voltage Clamp Conditions. J. Vis. Exp. 135: 57482. https://doi.org/10.3791/57482
- 17. Grubb B.D., Harris J.B., Schofield I.S. (1991) Neuromuscular transmission at newly formed neuromuscular junctions in the regenerating soleus muscle of the rat. J. Physiol. 441: 405–421. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018758
- Moyer M., van Lunteren E. (2001) Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm. J. Neurophysiol. 85: 2070–2075. https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.5.2070
- 19. *Miteva A., Gaydukov A., Balezina O.* (2020) Interaction between Calcium Chelators and the Activity of P2X7 Receptors in Mouse Motor Synapses. Int. J. Mol. Sci. 21: 2034.
- Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Balezina O.P. (2016) Calcitonin gene-related peptide increases acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice. Neurosci. Lett. 628: 17–23. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.014
- 21. Ruiz R., Cano R., Casañas J.J., Gaffield M.A., Betz W.J., Tabares L. (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. J. Neurosci. 31: 2000–2008.
 - https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011
- 22. Weihl C.C., Connolly A.M., Pestronk A. (2006) Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. Neurology. 67: 500–501. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000231139.26253.d0
- Sumner C., Huynh T., Markowitz J., Perhac J., Hill B., Coovert D., Schussler K., Chen X., Jarecki J., Burghes A., Taylor J., Fischbeck K. (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. Ann. Neurol. 54: 647–654. https://doi.org/10.1002/ana.10743
- Tsai L.K., Tsai M.S., Ting C.H., Li H. (2008) Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. J. Mol. Med. (Berl) 86: 1243–1254. https://doi.org/10.1007/s00109-008-0388-1
- Kin K.C., Kim P., Go H.S., Choi C.S., Park J.H., Kim H.J., Jeon S.J., Dela Pena I.C., Han S.H., Cheong J.H., Ryu J.H., Shin C.Y. (2013) Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. J. Neurochem. 124: 832–843. https://doi.org/10.1111/jnc.12147
- 26. Colombo M.N., Francolini M. (2019) Glutamate at the Vertebrate Neuromuscular Junction: From Modulation to Neurotransmission. Cells. 8: 996. https://doi.org/10.3390/cells8090996
- 27. *Malomouzh A., Ilyin V., Nikolsky E.* (2019) Components of the GABAergic signaling in the peripheral cholinergic synapses of vertebrates: a review. Amino Acids 51: 1093–1102. https://doi.org/10.1007/s00726-019-02754-x

- Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E., Vyskocil F., Lieberman E.M., Urazaev A.K. (2003) Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. J. Neurochem. 85: 206–213. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01660.x
- Malomouzh A.I., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. (2015) Metabotropic GABAB receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. J. Neurochem. 135: 1149–1160. https://doi.org/10.1111/jnc.13373
- 30. Koyuncuoğlu H., Kara I., Günel M.A., Nurten A., Yamantürk P. (1998) N-methyl-D-aspartate antagonists, glutamate release inhibitors, 4-aminopyridine at neuromuscular transmission. Pharmacol. Res. 37: 485–491. https://doi.org/10.1006/phrs.1998.0318
- Lenina O., Petrov K., Kovyazina I., Malomouzh A. (2019) Enhancement of mouse diaphragm contractility in the presence of antagonists of GABA_A and GABA_B receptors. Exp. Physiol. 104: 1004–1010. https://doi.org/10.1113/EP087611

Functional Assessment of Peripheral Cholinergic Neurotransmission in Rats with Fetal Valproate Syndrome

A. Yu. Arkhipov^a, D. V. Samigullin^a, I. I. Semina^b, and A. I. Malomouzh^{a, *}

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

> ^bKazan State Medical University, Kazan, Russia *e-mail: artur57@gmail.com

One of the most widespread experimental models for studying the development of autism spectrum disorders (ASD) and methods of their therapy is the prenatal valproic acid exposure model in rodents. Individuals born of females who received injections of valproic acid during pregnancy demonstrate a number of ASD-specific impairments. It was previously found that valproic acid affects neuromuscular transmission and, moreover, alters the expression of a set of genes during the development of neuromuscular synapse. However, until recently it was not known whether neuromuscular neurotransmission changes in animals with fetal valproate syndrome and, if so, how? Using the functional test "rotating rod", we found that in rats with a developed valproate syndrome, the coordination of movements did not differ from control animals. Using the methods of microelectrode electrophysiology, we analyzed (i) the amplitude-time parameters of single postsynaptic signals; (ii) the frequency of spontaneous release of acetylcholine quanta, (iii) the number of acetylcholine quanta released in response to the stimulus, (iv) the amplitude of evoked responses during rhythmic stimulation. We did not reveal any changes in the processes of acetylcholine release from the nerve ending and its reception on the muscle fiber membrane, both at rest and during nerve stimulation. Thus, it can be concluded that in rats with developed fetal valproate syndrome, peripheral cholinergic neurotransmission does not undergo any functionally significant changes.

Keywords: autism spectrum disorders, fetal valproate syndrome, physical activity, neuromuscular junction, acetylcholine, neurotransmission РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 616-628

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ С-КОНЦЕВОГО ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИОННОГО КАНАЛА ASIC3

© 2021 г. Д. И. Осмаков^{1, 2}, Ю. В. Королькова¹, К. И. Лубова¹, Е. Е. Малеева¹, Я. А. Андреев^{1, 2}, С. А. Козлов^{1, *}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²Институт молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия *E-mail: serg@ibch.ru

> Поступила в редакцию 15.01.2021 г. После доработки 01.02.2021 г. Принята к публикации 01.02.2021 г.

Повышение концентрации протонов в синаптической щели при выбросе нейромедиаторов считается одним из возможных способов сенсибилизации постсинаптической мембраны. Одними из основных сенсоров закисления являются представители семейства кислоточувствительных ионных каналов (ASIC). Канал ASIC3, представленный на мембране чувствительных нейронов, вносит большой вклад в восприятие болевых ощущений и считается перспективной мишенью для разработки терапевтических средств. Несмотря на высокую степень идентичности, между ортологами ASIC3-каналов млекопитающих имеется ряд различий. Наиболее важное отличие заключается в том, что при физиологическом значении внеклеточного pH 7.4 человеческий ASIC3 отвечает на кислотный стимул практически только длительной компонентой, в то время как крысиный ASIC3 имеет длительную компоненту тока и намного превосходящую ее по амплитуде транзиентную компоненту тока. В данной работе нам удалось показать, что С-концевой внутриклеточный домен (СТD) канала является регуляторной последовательностью, и его модификация оказывает значительное воздействие на транзиентный ток у ASIC3 человека и крысы. Укорочение CTD на 20 аминокислотных остатков приводит к росту транзиентной и ослаблению длительной компонент тока, а модификация CTD у hASIC3 приводит к появлению тока аналогичного rASIC3, что было продемонстрировано в экспериментах whole-cell на гетерологически экспрессированных каналах. Также делеция 20 аминокислотных остатков в СТD на порядок увеличивает амплитуду регистрируемых токов как у rASIC3, так и у hASIC3. Полученные результаты демонстрируют особую роль CTD во внутриклеточной регуляции каналов ASIC3.

Ключевые слова: кислоточувствительный ионный канал, внутриклеточный домен, мутагенез, десенситизация, межмолекулярное взаимодействие **DOI:** 10.31857/S0869813921040129

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция синаптической передачи — сложный многокомпонентный процесс, в который вовлечено множество структурных, ферментативных и рецепторных белков. Несмотря на то, что кислоточувствительные каналы семейства амилорид-чувствительных эпителиальных натриевых каналов (ASIC) не относят к основным рецепторам на пресинаптической и постсинаптической мембране, последние исследования выявили определенную роль этих рецепторов в синаптической передаче. Две основные изоформы канала – ASIC1 и ASIC2 – хорошо представлены в областях ЦНС с высокой синаптической плотностью, а их солокализация является обычным явлением [1]. ASIC1 и ASIC2 экспрессируются во многих отделах мозга, среди которых амигдала, гиппокамп, кора головного мозга и мозжечок. Внутри нервных клеток ASICs были обнаружены по всей соме и вдоль ветвей аксонов и дендритов [2, 3].

Ранее было показано преимущественное расположение ASIC1a на постсинаптической мембране [4], но последние данные с использованием селективных флуоресцентных зондов и иммуноокрашивания доказали, что субъединицы ASIC1a и ASIC2a локализованы по всей аксональной зоне и имеют к тому же и пресинаптическое расположение [5]. Пресинаптическое расположение хорошо объясняет ранее наблюдавшиеся эффекты, когда фармакологическое и генетическое нарушение активности ASIC1a усиливало высвобождение трансмиттера [6] и, напротив, активация ASIC1a отрицательно коррелировала с высвобождением пресинаптических нейромедиаторов [7].

Долгое время постсинаптические ASIC-генерируемые токи не могли зафиксировать во время синаптической передачи нейромедиаторов, однако, как оказалось, это возможно сделать при использовании селективных ингибиторов основных постсинаптических лиганд-управляемых каналов. В итоге, токи, опосредованные ASIC1a- и/или ASIC2-активацией, были выявлены после фармакологической блокировки рецепторов AMPA, NMDA и GABA [8, 9]. Выявленный ток имел малую амплитуду, и поэтому не мог быть детектирован прямой активацией синапса кислотой, с учетом того, что сами протоны ингибируют NMDA- и AMPA-рецепторы, причем значения ингибирующей концентрации сопоставимо со значениями активирующей концентрации для ASIC-каналов [10–13]. ASIC1a облегчает активацию NMDA-рецептора, возникающую при индукции долгосрочной потенциации (LTP), предполагая функциональное взаимодействие между этими рецепторами в регуляции синаптической пластичности гиппокампа [14-16]. Также в гиппокампе ASIC1a участвует в увеличении потенциала действия, вызываемым при участии метаботропного рецептора mGlu I группы, и участвует в индуцированной долгосрочной депрессии (LTD) через этот рецептор [17]. В нейронах MNTB каликса грызунов вызываемые ASICs токи имеют настолько значительную амплитуду, что способны вызывать потенциалы действия в отсутствие глутаматергической передачи [18].

Помимо ЦНС, были изучены синаптические контакты в периферической нервной системе (ПНС), и показана роль протонов как дополнительных нейромодуляторов [19]. В ПНС помимо ASIC1a широко представлена изоформа ASIC3, при активации которой протонами формируется двухкомпонентный ответ из быстро десенситизируемого (транзиентного) и постоянного (длительного) тока. Баланс между быстрой и постоянной компонентой тока в ASIC3 отличен у каналов грызунов и человека. Помимо этого, лиганды могут по-разному влиять на ту или иную компоненту [20–23]. Все это делает ASIC3 интересным объектом для изучения. Изучая синапс, образованный вестибулярными волосковыми клетками внутреннего уха типа I и постсинаптическими нервными окончаниями каликса, Highstein с соавт. [24] представили доказательства того, что протоны действуют как неквантовые нейромедиаторы и подолгу находятся в синаптической щели. Это подразумевает, что постсинаптический ответ может быть следствием активации ASIC3, так как остальные кислото-чувствительные каналы быстро десенситизируются кислотой.

Особенности пространственной организации каналов ASIC в целом, так же, как и структурно-функциональная взаимосвязь отдельных остатков внеклеточного домена, составляющего большую часть молекулы, были подробно проанализированы

в обзоре [22]. Структура гомотримерного комплекса куриного канала ASIC была получена ранее не один раз в различных условиях, но всегда в качестве объекта выбирался мутант с усеченными внутриклеточными N- и C-концевыми последовательностями. В электрофизиологических экспериментах такой мутант сохранял способность активироваться при действии протонов так же, как и полноразмерный канал [25]. В данной работе мы впервые демонстрируем, что C-концевой внутриклеточный домен (CTD) у ASIC3 человека определяет чувствительность канала к протонам, а также форму и кинетику ответа на кислотный стимул.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этическое заявление. Данное исследование строго соответствовало принципам Всемирной организации по охране здоровья животных. Все эксперименты были одобрены институциональной политикой использования лабораторных животных Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (протокол № 267/2018; дата утверждения: 2 октября 2018 г.).

Реактивы. В работе использованы соли и растворители подходящего качества фирмы Merck приобретенные в Sigma-Aldrich Rus. Для активации каналов, помимо кислых буферных растворов, использовали рекомбинантный ноцистатин крысы (аминокислотная последовательность, аналогичная остаткам 98–132 в Q62923(Uniprot)), полученный при экспрессии в клетках *Esherichia coli* конструкции, собранной на основе вектора pET32b (Merck, Германия).

Молекулярное клонирование и направленный мутагенез ионных каналов. Гены rASIC3 и hASIC3, ранее использованные в работе [21], были амплифицированы с использованием праймеров hA3-Hind3 frw (5'-ATCAAGCTTTAAATAATAATAAGCCCACCTCAGGCC-3'), hA3-EcoR1 rev (5'-ATTGGATTCCTAGAGCTGTGTGACAAGGTAGCAG-3') для hASIC3, и rA3-Hind3 frw (5'-ATCAAGCTTTAAATAATAATAATGAAACCTCGCTCCGGACTG-3'), rA3-EcoR1 rev (5'-ATTGAATTCCTAGAGCCTTGTGACGAGGTAACAG-3') для rASIC3 и клонированы в плазмидный вектор pVAX1 (Thermo Fisher Scientific, США) по сайтам EcoRI/HindIII. Мутации вводили в полученные верифицированные конструкции с помощью набора Phusion SiteDirected Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Были использованы следующие праймеры: hA3 FLH6 frw (5'-GATCACGATATCCATCACCATCAC-CATCACTAGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAG-3'), hA3_FLH6_rev (5'-CTTG-TAATCGCCATCGTGATCCTTGTAGTCGAGCTGTGTGACAAGGTAGCAGGTG-3'), hA3d20 FLH6 rev (5'-CTTGTAATCGCCATCGTGATCCTTGTAGTCGGGAGGG-GTGGGAGGTCTG-3'), A3_d20_frw (5'-TAGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAG-3'), hA3 d20H6 frw (5'-CATCACCATCACCATCACTAGGAATTCT-3'), hA3 d20 rev (5'-GGGAGGGGGGGGGGGGGGTCTG-3'), rA3 d20 rev (5'-GGGAGTGGTAGGAGG-ССТС-3') в следующих комбинациях: hA3 FLH6 frw/hA3 FLH6 rev (конструкция hASIC3 + FLAG + H6), hA3 FLH6 frw/ hA3d20 FLH6 rev (конструкция hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6), A3 d20 frw/hA3 d20 rev (конструкция hASIC3- $\Delta 20$), A3 d20 frw/rA3 d20 rev (конструкция rASIC3- Δ 20). Правильность сборки проверяли секвенированием ДНК.

Синтез кэпированной мРНК. Плазмидные конструкции с дикими и мутантными генами *hASIC3* и *rASIC3* были линеаризованы с использованием рестриктаз NdeI и MluI для hASIC3 и rASIC3, соответственно. мРНК была синтезирована с использованием набора mMACHINETM T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, CША) в соответствии со стандартным протоколом для кэпированных транскриптов. Конечную мРНК ресуспендировали в воде, свободной от РНКазы, до концентрации 50 нг/мкл и хранили при -70° С.

618

Электрофизиологические эксперименты. Электрофизиологические эксперименты проводили на неоплодотворенных ооцитах лягушки вида Xenopus laevis. Этил-таминобензонат метасульфона (MS222) (0.17%-ный раствор) использовался для анестезии лягушек, которые после операции содержались в отдельном резервуаре до полного восстановления от наркоза. Слои фолликулярных клеток удаляли с поверхности ооцитов обработкой коллагеназой тип I или тип II (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл при комнатной температуре в течение 1.5-2 ч в среде ND96 (мМ: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂ и 5 HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), титрованная до pH 7.4 с помощью NaOH) без кальция. В отобранные здоровые ооциты стадии IV и V вводили 5–10 нг мРНК, содержащей соответствующие гены каналов, с использованием системы микроинъекции Nanoliter 2000 (World Precision Instruments, США). Инъецированные ооциты выдерживали 48-72 ч при 19° С, а затем до 5 дней при 15° С в среде ND96 с добавлением антибиотика (гентамицин, 50 мкг/мл) и пирувата (5 мМ). Записи токов производились методом двухэлектродной фиксации потенциала при удерживающем потенциале -50 мВ с использованием усилителя GeneClamp500 (AxonInstruments, Inverurie, Великобритания). Микроэлектроды заполнялись 3 М КСІ. Данные были отфильтрованы и оцифрованы при 20 и 100 Гц, соответственно, с использованием преобразователя L780 AD (L-Card, Москва, Россия). Для внешнего базового раствора использовали буфер ND96 с pH 7.4 или 7.8. Активирующим раствором служил ND96 с pH 5.5, в котором HEPES был заменен на 10 мМ MES (2- (N-морфолино)-этансульфоновая кислота). Клапанная система с регулируемым давлением с компьютерным управлением использовалась для достижения скорости обмена растворов около 60 мл/мин в записывающей камере.

Математическая обработка и статистический анализ. Анализ электрофизиологических данных проводили с помощью программы OriginPro 8.6 (OriginLab, Hoptremnтон, Maccaчусетс, США). Временной ход затухания кривой тока был аппроксимирован с использованием моноэкспоненциального уравнения: $F(x) = A1 \times e^{(-x/\tau_{des})} + A0$, где F(x) – амплитуда тока в момент времени x, A1 – максимальная амплитуда тока, A0 – его установившееся значение, τ_{des} – константа времени десенситизации.

Все данные представлены как среднее значение $\pm SEM$. Достоверность различий в нормализованных данных определялась с помощью теста Тьюки ANOVA с уровнем значимости **p* < 0.05, ***p* < 0.01 и ****p* < 0.005; пѕ незначимо.

Предсказание элементов вторичной структуры для внутриклеточных доменов ионного канала проводили с привлечением on-line RaptorX Property Prediction Server [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Токи каналов ASIC3 человека (hASIC3), активирующиеся в условиях физиологических значений pH внеклеточной среды (pH 7.3–7.4), характеризуются практически отсутствующей транзиентной компонентой. Повышение базового pH среды до слабо щелочных значений (pH 7.8) позволяет детектировать слабо выраженную транзиентную компоненту, за которой следует ярко выраженная длительная компонента, превосходящая первую во много раз (рис. 1а, левая панель). Такая картина является нетипичной и в большой степени отличает hASIC3 от остальных изоформ каналов ASIC, а также от его ортологов из других видов млекопитающих.

Недавно было показано, что С-концевой домен ответствен за уменьшение транзиентного тока у каналов ASIC3 крысы (rASIC3) [27]. Мы предположили, что подобная ситуация может быть и в случае hASIC3. Используя сайт-направленный мутагенез, мы удалили 20 С-концевых аминокислотных остатков (а.о.) последовательности каналов rASIC3 и hASIC3, получив укороченные аналоги rASIC3-Δ20 и







Рис. 1. Профили токов через каналы hASIC3, экспрессированные в ооцитах лягушки X. laevis. (a) Контрольные токи через канал ASIC3 дикого типа (hASIC3, левая панель) и его мутантный аналог, укороченный с С-конца на 20 аминокислотных остатков (hASIC3-Δ20, правая панель). (b) Действие на hASIC3-Δ20 эндогенного нейропептида крысы ноцистатина (rNS), в концентрации 1 мМ (зеленая линия); для сравнения показан контрольный ток через hASIC3-Δ20 (черная линия). Активацию проводили быстрой сменой буферного раствора с pH 7.8 на раствор с pH 5.5.

hASIC3-Δ20, и проанализировали профиль активации каналов, экспрессированных в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Действительно, делеция 20 а.о. hASIC3 привела к изменению формы ответа канала на изменение pH, при этом наблюдалось возникновение ярко выраженного



Рис. 2. Профили токов через канал hASIC3 дикого типа (левая панель), удлиненный на 20 а.о. канал hASIC3 + FLAG + H6 (средняя панель), а также канал hASIC3-∆20 + FLAG + H6, в котором последние 20 а.о. на С-конце заменены на (FLAG + H6)-последовательность (правая панель). Активацию проводили буфером с pH 5.5 из базового внеклеточного раствора с pH 7.4 (черные линии) и pH 7.8 (синие линии).

транзиентного тока (рис. 1а, правая панель), а длительная компонента практически отсутствовала. Интересно, что подобный ответ и отсутствие длительной компоненты наблюдалось при активации hASIC3- Δ 20 протонами. Однако ноцистатин крысы (rNS) вызывает двухкомпонентный ток, состоящий из транзиентной и длительной компонент (рис. 1b, зеленая линия). Ноцистатин — это нейропептид, который способен активировать любые ASICs [28].

Для hASIC3 были собраны дополнительные мутантные конструкции. Одна из конструкций (hASIC3 + FLAG + H6) представляла собой полноразмерный канал с увеличенной на 20 а.о. С-концевой последовательностью (DYKDHDGDYKDHDIHHHHHH), которая включала два последовательно соединенных через остаток глицина аффинных FLAG-тага (DYKDHD) и 6 а.о., формирующих His-таг. Вторая конструкция (hASIC3- Δ 20 + FLAG + H6) являлась аналогичной FLAG и His меченой формой мутанта hASIC3- Δ 20. Данные конструкции имели прикладное значение, поскольку позволяли, при необходимости, выделять из клеточного лизата экспрессированные ионные каналы с использованием аффинной хроматографии.

Оба дополнительных варианта мутантных каналов значительно отличались от hASIC3-канала дикого типа по форме ответа на закисление. Для представленных на рис. 2 входящих токов каналов hASIC3, hASIC3 + FLAG + H6 и hASIC3- Δ 20 + + FLAG + H6, в месте перехода от транзиентной к длительной компоненте заметен явный минимум, который может свидетельствовать о протекании двух независимых процессов: десенситизации транзиентной компоненты тока и медленного роста длительной компоненты тока, которая наблюдается на всем протяжении действия импульса. Ранее такой феномен уже был описан в работе для ASIC3 крысы [29].

Было проведено сравнение каналов по эффективности их активации раствором с pH 5.5 из двух различных стартовых условий — нейтрального pH 7.4 и слабощелочного pH 7.8 в омывающем клетку растворе. Активация из слабощелочного буфера всегда приводила к более выраженной транзиентной компоненте тока и существенно не влияла на длительный ток (рис. 2). Добавление дополнительной по-



Рис. 3. Сравнение параметров токов исходного hASIC3-канала с параметрами hASIC3- $\Delta 20$ - и hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6-мутантных каналов. (а) Профили нормализованных токов через hASIC3- $\Delta 20$ (черные линии) и hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6 (синие линии), активированные раствором с pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). (b) Амплитуды (в наноамперах, нА) транзиентных компонент токов hASIC-, hASIC3- $\Delta 20$ - и hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6-каналов, активированных при pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель) и pH 7.8 (правая панель). (c) Подгонка транзиентной компоненты тока hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6 моноэкспоненциальной функцией для ответа (серая сплошная линия) на стимул с pH 5.5 из базового внеклеточного раствора с pH 7.8. Аппроксимация моноэкспоненциальной функцией (сплошная линия) проводилась для индивидуальной выведенной транзиентной компоненты (точечная линия), полученной в результате вычитания длительной компоненты (пунктирная линия) из начального двухфазного тока. (d) Константы времени десенситизации (в миллисекундах, мс) транзиентных компонент токов hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6-каналов, активированных при pH 5.5 из базовых растворов с рH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). Каждый столбец на графике представлен как среднее значение ± *SEM* 4–7 измерений. *p < 0.05 и ***p < 0.001; ns – незначимое различие; Тьюки ANOVA.

следовательности к каналу дикого типа (конструкт hASIC3 + FLAG + H6) привело к появлению выраженной транзиентной компоненты тока с амплитудой, сопоставимой с амплитудой следующей за ней длительной компоненты (рис. 2, средняя панель). Для hASIC3- Δ 20 + FLAG + H6 транзиентная компонента превосходила по амплитуде транзиентные компоненты как hASIC3, так и его FLAG + His меченого аналога hASIC3 + FLAG + H6 уже на порядок (рис. 2, правая панель).

У мутантного канала hASIC3- $\Delta 20$ практически не наблюдали недесенситизируемого тока при активации протонами (рис. 3а), однако по абсолютной амплитуде транзиентного тока он показал наибольшую проводимость (рис. 3b). Амплитуды токов для канала hASIC3 и его мутантных форм hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6 и hASIC3- $\Delta 20$, активированных pH 5.5 со значения базового pH 7.4 (рис. 3b), составляли 1.9 ± 0.3, 28.3 ± 7.1 и 64.6 ± 22.1 нА соответственно. Значимое расхождение наблюдалось между величинами амплитуд токов hASIC3 и hASIC3- $\Delta 20 + FLAG + H6$ и hASIC3 и hASIC3- $\Delta 20$ каналов (p < 0.05), тогда как между самими мутантными формами, при видимой тенденции, значимого расхождения не было (p = 0.23). Аналогичная ситуация сохранялась и в условиях активации данных каналов с pH 7.8 до 5.5: значения амплитуд для hASIC3, hASIC3- $\Delta 20 + FLAG + H6$ и hASIC3- $\Delta 20$ составили 3.68 \pm 0.45, 79.6 \pm 29.6 и 259.7 \pm 91.6 нА соответственно; значимые отличия величин амплитуд наблюдались только между hASIC3 и его мутантными формами (p < 0.05), тогда как между hASIC3- $\Delta 20 + FLAG + H6$ и hASIC3- $\Delta 20$ значимого расхождения также не было (p = 0.17). Как уже отмечалось выше, амплитуда транзиентного тока возрастала в зависимости от pH базового раствора, с которого производилась активация. Так, во всех вышеперечисленных каналах при повышении pH базового раствора с 7.4 до 7.8 амплитуда возрастала в 2.1 \pm 0.3 раза для hASIC3 и в 2.7 \pm 0.4 раза для hASIC3- $\Delta 20 + FLAG + H6$ и более значительно – в 4.04 \pm 0.13 раза для hASIC3- $\Delta 20$.

Для $\Delta 20$ -мутантных каналов с делетированной С-концевой последовательностью была рассчитана скорость десенситизации транзиентного тока (рис. 3с). Константа времени десенситизации (τ_{des}) у транзиентной компоненты тока при активации pH 5.5 раствором с базового pH 7.4 значительно различалась у мутантов hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6 и hASIC3- $\Delta 20$ (0.29 ± 0.02 и 0.53 ± 0.03 с соответственно) (p < 0.001). Однако это отличие нивелировалось при повышении значения pH базового раствора до pH 7.8: τ_{des} для hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6 и hASIC3- $\Delta 20$ составило значимо не различимые 0.30 ± 0.01 и 0.36 ± 0.06 с соответственно (p = 0.4) (рис. 3d). Стоит отметить, что вне зависимости от значений pH базового раствора, при котором проводилась активация каналов, значения τ_{des} у данных мутантных каналов наименьшие из всех ранее опубликованных данных [28, 30], что позволяет характеризовать $\Delta 20$ -мутанты hASIC3 как одни из самых быстро десенситизируемых каналов среди всех ASIC-каналов.

Аналогичная мутантная конструкция с делецией 20-ти С-концевых а.о. была получена для канала ASIC3 крысы (rASIC3- $\Delta 20$). Сравнение параметров активации нативного и мутантного ASIC3-каналов крысы показало, что делеция 20 а.о. в СТD (rASIC3- $\Delta 20$) приводит к значительному увеличению амплитуды транзиентного тока и уменьшению амплитуды длительной компоненты (рис. 4а–с). Амплитуды транзиентного токов для rASIC3 и rASIC3- $\Delta 20$, активированных при pH 5.5 со значения базового pH 7.4, демонстрировали значимое расхождение и составляли 87.7 ± 22.7 и 649.9 \pm 100.8 нА соответственно (p < 0.01). При базовом pH 7.8 значения амплитуды транзиентного токов для rASIC3 и rASIC3 и rASIC3 и rASIC3. До 20 также значимо расходились и составляли 105.7 ± 27.2 и 868.7 ± 140.6 нА соответственно (p < 0.01) (рис. 4b). В отличие от hASIC3 увеличение базового pH раствора не приводило к значимому увеличению амплитуды транзиентного тока.

Сравнение относительных величин амплитуд компонент ($I_{sustained}/I_{transient}$) для каналов rASIC3 и rASIC3- $\Delta 20$ показало тенденцию к уменьшению этого значения у мутантной формы, которая наблюдалась и в случае ортологов человека hASIC3 и hASIC3- $\Delta 20$. Значения $I_{sustained}/I_{transient}$ для rASIC3 и rASIC3- $\Delta 20$ значимо отличались и составляли 0.20 ± 0.08 и 0.03 ± 0.01 соответственно (p < 0.05). Однако данный параметр был более чем в 3 раза меньше, чем у мутанта hASIC3- $\Delta 20 + FLAG + H6$, который соответствовал значению 0.63 ± 0.16 (рис. 4с).

Константы τ_{des} у транзиентной компоненты тока при активации раствором pH 5.5 с базового pH 7.4 не значимо различались между rASIC3 и rASIC3- Δ 20 и составляли 0.33 \pm 0.05 и 0.38 \pm 0.04 с соответственно. Такая же ситуация наблюдалась и при базовом pH 7.8: значения τ_{des} rASIC3 и rASIC3- Δ 20 различались не значимо и составляли 0.33 \pm 0.07 и 0.36 \pm 0.06 с соответственно. При этом в условиях базового



Рис. 4. Сравнение параметров токов для ASIC3-канала крысы дикого типа (rASIC3) и мутантного канала с делецией 20 а.о. на С-конце (rASIC3- Δ 20). (а) Профили нормализованных токов через rASIC3 (черные линии) и rASIC3- Δ 20 (синие линии), активированные раствором с pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). (b) Амплитуды (в нА) транзиентных компонент токов rASIC3 и rASIC3- Δ 20, активированных при pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). (b) Амплитуды (в нА) транзиентных компонент токов rASIC3 и rASIC3- Δ 20, активированных при pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). (c) Соотношение амплитуды длительной компоненты к амплитуде транзиентной компоненты тока rASIC3 и rASIC3- Δ 20, а также hASIC3- Δ 20 + FLAG + H6 каналов. (d) Константы времени десенситизации (в мс) транзиентных компонент токов rASIC3 - и rASIC3- Δ 20-, а также hASIC3- Δ 20-ка-налов, активированных при pH 5.5 из базовых растворов с pH 7.4 (левая панель) и pH 7.8 (правая панель). Каждый столбик на графике представлен как среднее значение ± *SEM* 4–7 измерений. * *p* < 0.05 и ** *p* < 0.01; пѕ – незначимое различие; Тьюки ANOVA.

pH 7.4 rASIC3- Δ 20-каналы оказались значимо более быстро десенситизируемыми, чем hASIC3- Δ 20-каналы (p < 0.05) (рис. 4d, левая панель); однако при слабо щелочных условиях (pH 7.8) разница в скорости десенситизации нивелирована (p = 0.07) (рис. 4d, правая панель).

Функциональный ASIC3-канал образован тремя субъединицами, каждая из которых имеет внутриклеточный N-концевой и C-концевой домены, два трансмембранных спиральных домена и протяженную сложно организованную внеклеточную часть (рис. 5). Гомология аминокислотных остатков внутриклеточных доменов между rASIC3 и hASIC3 значительна. 4 остатка цистеина располагаются во внутриклеточной части канала, но идет ли образование внутри- или межсубъединичных дисульфидных связей и их возможная схема замыкания пока не установлены. Как видно из рис. 5, N-концевой домен склонен к образованию спиральных структур, и единственный остаток цистеина располагается на значительном расстоянии от трансмембранного участка. В СТD один из остатков цистеина расположен в непо-



Рис. 5. Аминокислотные последовательности внутриклеточных доменов ионных каналов ASIC3 человека и крысы. Элементы вторичной структуры, предсказанные по *on-line* сервису RaptorX-Property, обозначены спиралью для α-спиральных элементов и стрелкой для β-листовых участков. Аминокислотные остатки цистеина выделены желтым цветом, красным выделены аминокислотные остатки, различные между двумя ортологами.

средственной близости от трансмембранного участка, а два других удалены от него на значительное расстояние. Также для CTD наблюдается склонность к укладке с образованием β -листового слоя, в которую, предположительно, вовлечены последние аминокислотные остатки. При удалении 20 С-концевых а.о. rASIC3 и hASIC3, вероятно, происходит разрушение β -укладки, а удаление двух остатков цистеина приводит к дестабилизации внутриклеточных доменов за счет дисульфидных связей, что, по-видимому, определяет изменение параметров десенситизации канала ASIC3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования являются наглядной демонстрацией роли СТD в процессе функционирования ASIC3-канала. Для ASIC3 крысы ранее было показано, что связывание внутриклеточного интегрального мембранного белка стоматина с С-концом канала оказывает существенное негативное влияние на активность канала [27, 31]. Подобное взаимодействие, по-видимому, является универсальным: известны примеры аналогичной регуляции стоматин-подобным белком MEC-2 гомолога ASIC-каналов у *Caenorhabditis elegans* [32]. В ходе работы мы показали, что делеция С-концевого участка СТD способствует значительному изменению проводимости канала ASIC3 крысы и человека. Также на примере мутантного канала hASIC3 + FLAG + H6 нами показано, что вмешательство в CTD может оказывать эффект потенцирования транзиентной компоненты тока. Стоит отметить, что у мутанта hASIC3- $\Delta 20$ + FLAG + H6, в отличие от hASIC3- $\Delta 20$, длительная компонента сохранялась (рис. 3a), и, наоборот, у канала rASIC3-Δ20 длительная компонента практически полностью пропадала. Таким образом, присутствие какой-либо аминокислотной последовательности в С-концевой части канала (при этом не обязательно содержащей остатки цистеина и/или сайт узнавания регуляторных белков) играет важную роль в генерации длительной компоненты тока при активации канала протонами. Вероятно, изменение конформации СТД, происходящее при делеции или добавлении а.о., приводит к уменьшению скорости десенситизации канала и появлению соответствующей транзиентной компоненты тока. Структурные фрагменты канала, задействованные в формировании длительной компоненты ответа на действие протонов, по-видимому, не связаны с внутриклеточной частью канала ASIC, что также подтверждают ранние исследования по сравнению полноразмерных каналов и их укороченных аналогов [25].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.И.О., Ю.В.К. и С.А.К. разработали план исследования; Е.Е.М. выполняла биохимические эксперименты и получала рекомбинантный пептид; Ю.В.К., Я.А.А. и К.И.Л. провели эксперименты по молекулярному клонированию и созданию мутантных конструктов; Д.И.О. и К.И.Л. провели электрофизиологические эксперименты на ооцитах; С.А.К. руководил проектом; Д.И.О., Ю.В.К., Я.А.А. и С.А.К. проанализировали данные и написали рукопись. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Сильвию Диохо (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Вальбонн, Франция) за предоставленную плазмиду PCi, содержащую кДНК крысиного ASIC3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Price M.P., Gong H., Parsons M.G., Kundert J.R., Reznikov L.R., Bernardinelli L., Chaloner K., Buchanan G.F., Wemmie J.A., Richerson G.B., Cassell M.D., Welsh M.J. (2014) Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli. Genes. Brain. Behav. 13: 179–194. https://doi.org/10.1111/gbb.12108
- Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Cassell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J. (2003) Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. J. Neurosci. 23: 5496–5502. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05496.2003
- Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Shao D., White F., Canessa C.M. (2002) Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 2326–2331. https://doi.org/10.1073/pnas.042688199
- 4. *Zha X.-M., Wemmie J.A., Green S.H., Welsh M.J.* (2006) Acid-sensing ion channel la is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 16556–16561.
 - https://doi.org/10.1073/pnas.0608018103
- Liu X., Liu C., Ye J., Zhang S., Wang K., Su R. (2020) Distribution of Acid Sensing Ion Channels in Axonal Growth Cones and Presynaptic Membrane of Cultured Hippocampal Neurons. Front. Cell Neurosci. 14: 205. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00205
- Urbano F.J., Lino N.G., González-Inchauspe C.M.F., González L.E., Colettis N., Vattino L.G., Wunsch A.M., Wemmie J.A., Uchitel O.D. (2014) Acid-sensing ion channels 1a (ASIC1a) inhibit neuromuscular transmission in female mice. Am. J. Physiol. Physiol. 306: C396–C406. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00301.2013
- Cho J.-H., Askwith C.C. (2008) Presynaptic Release Probability Is Increased in Hippocampal Neurons From ASIC1 Knockout Mice. J. Neurophysiol. 99: 426–441. https://doi.org/10.1152/jn.00940.2007
- Du J., Reznikov L.R., Price M.P., Zha X.-m., Lu Y., Moninger T.O., Wemmie J.A., Welsh M.J. (2014) Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. Proc. Natl. Acad. Sci. 111: 8961–8966. https://doi.org/10.1073/pnas.1407018111
- Kreple C.J., Lu Y., Taugher R.J., Schwager-Gutman A.L., Du J., Stump M., Wang Y., Ghobbeh A., Fan R., Cosme C.V., Sowers L.P., Welsh M.J., Radley J.J., LaLumiere R.T., Wemmie J.A. (2014) Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. Nat. Neurosci. 17: 1083–1091. https://doi.org/10.1038/nn.3750

- Giffard R.G., Monyer H., Christine C.W., Choi D.W. (1990) Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. Brain. Res. 506: 339–342. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91276-M
- Traynelis S.F., Cull-Candy S.G. (1990) Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. Nature. 345: 347–350. https://doi.org/10.1038/345347a0
- Tang C.M., Dichter M., Morad M. (1990) Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H+. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6445–6449. https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6445
- Lei S., Orser B.A., Thatcher G.R.L., Reynolds J.N., MacDonald J.F. (2001) Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors Reduce Proton-Induced Receptor Desensitization in Rat Hippocampal Neurons. J. Neurophysiol. 85: 2030–2038. https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.5.2030
- Buta A., Maximyuk O., Kovalskyy D., Sukach V., Vovk M., Ievglevskyi O., Isaeva E., Isaev D., Savotchenko A., Krishtal O. (2015) Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction. J. Med. Chem. 58: 4449–4461. https://doi.org/10.1021/jm5017329
- Liu M.-G., Li H.-S., Li W.-G., Wu Y.-J., Deng S.-N., Huang C., Maximyuk O., Sukach V., Krishtal O., Zhu M.X., Xu T.-L. (2016) Acid-sensing ion channel 1a contributes to hippocampal LTP inducibility through multiple mechanisms. Sci. Rep. 6: 23350. https://doi.org/10.1038/srep23350
- Ma C.-L., Sun H., Yang L., Wang X.-T., Gao S., Chen X.-W., Ma Z.-Y., Wang G., Shi Z., Zheng Q.-Y. (2019) Acid-Sensing Ion Channel 1a Modulates NMDA Receptor Function Through Targeting NR1/NR2A/NR2B Triheteromeric Receptors. Neuroscience. 406: 389–404. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.044
- Mango D., Braksator E., Battaglia G., Marcelli S., Mercuri N.B., Feligioni M., Nicoletti F., Bashir Z.I., Nisticò R. (2017) Acid-sensing ion channel 1a is required for mGlu receptor dependent long-term depression in the hippocampus. Pharmacol. Res. 119: 12–19. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.028
- González-Inchauspe C., Urbano F.J., Di Guilmi M.N., Uchitel O.D. (2017) Acid-Sensing Ion Channels Activated by Evoked Released Protons Modulate Synaptic Transmission at the Mouse Calyx of Held Synapse. J. Neurosci. 37: 2589–2599. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2566-16.2017
- Blaustein M., Wirth S., Saldaña G., Piantanida A.P., Bogetti M.E., Martin M.E., Colman-Lerner A., Uchitel O.D. (2020) A new tool to sense pH changes at the neuromuscular junction synaptic cleft. Sci. Rep. 10: 20480. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77154-3
- Osmakov D.I., Koshelev S.G., Andreev Y.A., Kozlov S.A. (2017) Endogenous isoquinoline alkaloids agonists of acid-sensing ion channel type 3. Front. Mol. Neurosci. 10: 282. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00282
- Osmakov D.I., Koshelev S.G., Andreev Y.A., Dubinnyi M.A., Kublitski V.S., Efremov R.G. Sobolevsky A.I., Kozlov S.A. (2018) Proton-independent activation of acid-sensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from Laurus nobilis. Br. J. Pharmacol. 175: 924–937. https://doi.org/10.1111/bph.14134
- 22. Osmakov D.I., Khasanov T.A., Andreev Y.A., Lyukmanova E.N., Kozlov S.A. (2020) Animal, Herb, and Microbial Toxins for Structural and Pharmacological Study of Acid-Sensing Ion Channels. Front. Pharmacol. 11: 991. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00991
- Shteinikov V., Potapieva N., Gmiro V., Tikhonov D. (2019) Hydrophobic Amines and Their Guanidine Analogues Modulate Activation and Desensitization of ASIC3. Int. J. Mol. Sci. 20: 1713. https://doi.org/10.3390/ijms20071713
- Highstein S.M., Holstein G.R, Mann M.A., Rabbitt R.D. (2014) Evidence that protons act as neurotransmitters at vestibular hair cell-calyx afferent synapses. Proc. Natl. Acad. Sci. 111: 5421–5426. https://doi.org/10.1073/pnas.1319561111
- Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. (2018) Gating mechanisms of acid-sensing ion channels. Nature. 555: 397–401.
 - https://doi.org/10.1038/nature25782
- Wang S., Peng J., Ma J., Xu J. (2016) Protein Secondary Structure Prediction Using Deep Convolutional Neural Fields. Sci. Rep. 6: 18962. https://doi.org/10.1038/srep18962
- Klipp R.C., Cullinan M.M., Bankston J.R. (2020) Insights into the molecular mechanisms underlying the inhibition of acid-sensing ion channel 3 gating by stomatin. J. Gen. Physiol. 152: (3): e201912471. https://doi.org/10.1085/jgp.201912471

- Osmakov D.I., Koshelev S.G., Ivanov I.A., Andreev Y.A., Kozlov S.A. (2019) Endogenous neuropeptide nocistatin is a direct agonist of acid-sensing ion channels (ASIC1, ASIC2 and ASIC3). Biomolecules. 9 (9): 401. https://doi.org/10.3390/biom9090401
- Waldmann R., Bassilana F., de Weille J., Champigny G., Heurteaux C., Lazdunski M. (1997) Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na⁺ Channel Specific for Sensory Neurons. J. Biol. Chem. 272: 20975–20978. https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20975
- Gründer S., Pusch M. (2015) Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). Neuropharmacology. 94: 9–18. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.016
- Price M.P., Thompson R.J., Eshcol J.O., Wemmie J.A., Benson C.J. (2004) Stomatin Modulates Gating of Acid-sensing Ion Channels. J. Biol. Chem. 279: 53886–53891. https://doi.org/10.1074/jbc.M407708200
- 32. Goodman M.B., Ernstrom G.G., Chelur D.S., O'Hagan R., Yao C.A., Chalfie M. (2002) MEC-2 regulates C. elegans DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. Nature. 415: 1039–1042. https://doi.org/10.1038/4151039a

Investigation of the Role of the C-Terminal Intracellular Domain for ASIC3 Ion Channel Functioning

D. I. Osmakov^{*a*, *b*}, Yu. V. Korolkova^{*a*}, K. I. Lubova^{*a*}, E. E. Maleeva^{*a*}, Ya. A. Andreev ^{*a*, *b*}, and S. A. Kozlov^{*a*}, *

^aShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, Russia

^bInstitute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia *e-mail: serg@ibch.ru

Increasing of protons concentration in the synaptic cleft during neurotransmitters release is considered as a possible way for the postsynaptic membrane sensitization. The main sensors of acidification are acid-sensing ion channels (ASICs). The ASIC3 localized on the sensing neurons membrane well contributed to the perception of pain and is considered as one of promising target for a novel therapeutic agents development. Despite the high degree of homology between mammalian ASIC3 channels, there are a number of differences for their orthologs present. One potent difference among human and rat ASIC3 is a respond to fast acidic stimulus at physiological pH 7.4. Human ASIC3 produces particularly solitary sustained current through membrane, while rat has a transient current before sustained component. In this paper, we showed the importance of C-terminal intracellular domain (CTD) for a regulatory function of the transient current development in human and rat ASIC3. Shortening of CTD by 20 amino acid residues leads to a dramatically increase of transient current and attenuation of the sustained current, while CTD modification in hASIC3 leads to the appearance of a welldefined transient current like rASIC3, which was demonstrated in whole-cell experiments for heterologously expressed channels. Also, the deletion of 20 amino acid residues in CTD increased the current amplitude by an order of magnitude in both rASIC3 and hASIC3. The obtained results demonstrate the special role of CTD in the intracellular regulation of ASIC3 channels.

Keywords: acid-sensing ion channel, intracellular domain, mutagenesis, desensitization, intermolecular interaction

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 629-640

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РОЛЬ РИАНОДИНОВЫХ И ІР₃-РЕЦЕПТОРОВ В ГЕНЕРАЦИИ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ТРИЦИКЛИЧЕСКИМИ АНТИДЕПРЕССАНТАМИ В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА КРЫСЫ

© 2021 г. С. И. Бойков¹, Д. А. Сибаров^{1,} *, Т. В. Карелина¹, Н. Н. Шестакова¹, С. М. Антонов¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dsibarov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2021 г. После доработки 31.01.2021 г. Принята к публикации 31.01.2021 г.

Трициклические антидепрессанты, в частности, амитриптилин (ATL) и дезипрамин (DES), применяются в настоящее время для терапии депрессий и лечения хронических болей различного происхождения, важную роль в которых играют дисфункции NMDA-рецепторов. Известно влияние терапевтических концентраций ATL на кальций-зависимую десенситизацию NMDA-рецепторов, управляемую уровнем свободного кальция в цитоплазме. К тому же в кардиомиоцитах ATL и DES могут вызывать выброс кальция в цитоплазму из внутриклеточных депо за счет открывания каналов инозитол-3-фосфатных рецепторов (IP₃R) и/или рианодиновых рецепторов (RyR). Данный аспект действия этих препаратов на нейроны остается плохо исследованным. На нейронах неокортекса крыс в первичной культуре ткани мы изучили зависимость кальциевого ответа на DES и ATL от активации IP₃R и RyR эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Кратковременные (30 с) парные (с интервалом 5 мин) аппликации 200 мкМ DES или 200 мкМ ATL вызывают в нейронах коры кальциевые ответы, не различающиеся по величине. Использование антагонистов RyR и IP₃R показало, что ответы на ATL блокируются антагонистом $IP_3R - 2$ -APB (100 мкM), а ответы на DES блокируются рианодином – антагонистом RvR (100 нМ). Поскольку в нейронах RyR и IP₃R распределены негомогенно, можно предполагать, что DES и ATL стимулируют высвобождение разных пулов депонированного кальция, сосредоточенных либо в разных сегментах ретикулума, либо в ретикулуме и митохондриях. Кроме того, ATL и DES, будучи каналоблокаторами NMDA-рецепторов, ингибировали вход кальция извне клетки через активированные NMDA-рецепторы. Учитывая высокие концентрации DES и ATL (более 100 мкМ), необходимые для стимуляции выброса депонированного кальция в нейронах, представляется маловероятным, что подобные эффекты проявляются при их терапевтическом действии. Тем не менее, обнаруженная специфичность DES и ATL в отношении RyR и IP₃R соответственно может использоваться в качестве инструмента в экспериментальных целях.

Ключевые слова: дезипрамин, амитриптилин, трициклические антидепрессанты, кальций, нейроны, IP₃-рецепторы, рианодиновые рецепторы

DOI: 10.31857/S086981392104004X

Трициклические антидепрессанты (ТСА) применяются в настоящее время как для терапии депрессий, так и для лечения хронических болей различного происхождения (невралгии, нейропатические боли, фибромиалгии и диабетической нейропатии [1–3]). Амитриптилин (ATL) принадлежит к TCA и в терапевтических концентрациях (до 3 мкМ) имеет широкий спектр эффектов на ионные каналы и транспортеры, действуя, например, как ингибитор транспортера серотонина [4], рецептора серотонина 5-HT_{2C} [5], рецептора гистамина H1 [6] и другие. Известно также, что ATL в концентрациях >10 мкМ способен блокировать каналы NMDAрецепторов [7–9]. К тому же недавно продемонстрировано кальций-зависимое ингибирование активности NMDA-рецепторов амитриптилином, которое не связано с каналоблокадой, но при физиологических концентрациях внеклеточного кальция может иметь терапевтическое значение при лечении нейропатической боли и проявляться в терапевтических дозах ATL (<1 мкМ) [9]. Предполагается, что ATL способен взаимодействовать с натрий-кальциевым обменником [10, 11], ингибирование активности которого провоцирует, подобно действию низких доз этанола [12], кальций-зависимую десенситизацию NMDA-рецепторов за счет накопления кальция внутри нейронов [13, 14]. Дезипрамин (DES), сходный по химической структуре с ATL, преимущественно ингибирует захват норадреналина [15], однако также блокирует каналы NMDA-рецепторов [8]. Следует отметить, что ATL при блокировании каналов NMDA-рецепторов может проходить через каналы внутрь клетки, хотя вероятность проникновения имеет очень низкое значение (<0.05) [9].

Таким образом, можно предполагать, что TCA, в частности ATL, влияют на кальций-зависимую десенситизацию рецепторов, которая, в свою очередь, модулируется уровнем свободного кальция в примембранной области цитоплазмы [16]. Известны два источника повышения концентрации свободного кальция в нейронах. Кальций может поступать в цитоплазму извне через кальций-проницаемые ионные каналы, а также освобождаться из внутриклеточных депо (эндоплазматического или саркоплазматического ретикулумов, митохондрий, аппарата Гольджи). Последнее происходит за счет открывания каналов инозитол-3-фосфатных рецепторов (IP₃R) и/или рианодиновых рецепторов (RyR). Интересно, что ATL уже в концентрации 10 мкМ может ослаблять сократимость сердца, нарушая прохождение кальциевых волн, а в более высоких концентрациях вызывает максимальный выброс Ca²⁺ из саркоплазматического ретикулума [17]. Многие TCA, в частности, амитриптилин, имипрамин и дезипрамин, вызывают временное повышение уровня свободного внутриклеточного кальция ([Ca²⁺],) в культуре нейронов неокортекса в концентрации от 100 мкМ до 1 мМ [18]. Все три ТСА увеличивают содержание инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃) в клетках, т.е. мобилизуют Ca^{2+} из IP₃-чувствительных депо, причем, независимо от цАМФ [18]. В кардиомиоцитах ATL активирует RyR2 в концентрации 0.5–3 мкМ, вызывая выброс кальция из саркоплазматического ретикулума [19], а также ингибирование захвата Ca^{2+} в депо [17].

Несмотря на то, что влияние TCA на высвобождение кальция из внутриклеточных депо в кардиомиоцитах ранее было изучено, подобный аспект действия этих препаратов на клетки, являющиеся основными мишенями TCA в ЦНС, — нейроны, остается плохо исследованным. Очевидно, что нейроны значительно отличаются от кардиомиоцитов по многим биохимическим параметрам, включая экспрессию различных подтипов IP₃R и RyR [20]. Хотя эффекты ATL на IP₃R описаны на многих типах клеток, действие ATL на RyR в нейронах ранее не изучалось. Остаются неизвестными также эффекты DES на RyR. В настоящей работе, проведенной на нейронах коры большого мозга крыс, мы изучили кальциевые ответы нейронов на DES и ATL и их зависимость от активации IP₃R и RyR эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Крыс Вистар (всего 20 беременных самок) подвергали эвтаназии путем 1-минутной ингаляции углекислого газа. Эмбрионы использовали для приготовления первичных культур кортикальных нейронов с использованием стандартных процедур, описанных ранее [21, 22]. Процедуры соответствовали требованиям по работе с лабораторными животными Federation of European Laboratory Animal Science Associations и протоколом, утвержденным этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями. Выращивание культуры нейронов в среде Neurobasal с добавкой В-27 (Gibco-Invitrogen, Великобритания) осуществляли на покровных стеклах, покрытых поли-D-лизином. Культуры использовали для экспериментов через 10–16 дней инкубации *in vitro*.

В опытах использовали внеклеточный перфузионный раствор следующего состава (концентрации указаны в мМ): 144 NaCl; 2.8 KCl; 10 HEPES, при рН 7.2-7.4 и температуре 22–24°С. Бескальциевый раствор применяли, чтобы исключить влияние входа кальция в цитоплазму из внеклеточной среды. В экспериментах с использованием NMDA во внеклеточный раствор добавляли 1 мМ CaCl₂. Непосредственно перед экспериментом в цитоплазму нейронов загружали флуоресцентный кальций-чувствительный краситель Fluo-8. Для этого нейроны инкубировали в растворе, содержащем 2 мкМ ацетоксиметилового эфира Fluo-8 (Fluo-8 AM), при комнатной температуре в течение 60 мин. Клетки отмывали от красителя путем 20-минутной инкубации в перфузионном растворе, затем покровные стекла переносили в инвертированный микроскоп Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Германия). Ванночку для визуализации постоянно перфузировали при скорости потока 1.2 мл/мин тем же раствором. Быструю смену раствора в области наблюдения осуществляли с помощью системы быстрой локальной перфузии (ALA Science, BPS-8). Флуоресценцию Fluo-8 возбуждали лазером 488 нм и регистрировали в спектральном диапазоне 510-560 нм с интервалом дискретизации ~2 с (кадр 1024×1024 пикселей, объектив $20 \times$).

Для индукции внутриклеточных кальциевых ответов использовали 30-секундные аппликации DES или ATL отдельно или в сочетании с ингибиторами IP₃-зависимого (2-аминоэтоксидифенил-борат, 2-APB, 100 мкМ) или рианодин-зависимого (рианодин, 100 нМ) выхода кальция из внутриклеточных депо. Выбор в пользу 2-APB для ингибирования IP₃R в наших экспериментах относительно других ингибиторов, в частности, гепарина и кофеина [23], обусловлен мембранной проницаемостью 2-APB [24], действием на все подтипы IP₃R и отсутствием эффектов на RyR [25], что присуще гепарину и кофеину [26, 27]. Кроме того, эффект 2-APB на депо-зависимый вход кальция в клетку [28–30] не проявляется в бескальциевом внеклеточном растворе.

Для анализа кальциевых ответов оценивали изменения интенсивности свечения тел отдельных нейронов. Для каждой клетки оценивали выход кальция в цитоплазму из внутриклеточных депо как интеграл превышения свечения над базовой линией (F) за время аппликации фармакологических агентов. Для статистического анализа за один опыт (n = 1) принято среднее значение кальций-индуцированного свечения для всех клеток с одного стекла с культурой нейронов. Для сравнения групп, состоящих из нескольких опытов, применяли парный критерий Стьюдента. Достоверность различий обозначали звездочками, соответствующими различным уровням доверительной вероятности: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**) и p < 0.001 (***).



Рис. 1. Кальциевые ответы нейронов на повторяющиеся 30-секундные аппликации 200 мкМ дезипрамина (DES) или 200 мкМ амитриптилина (ATL) в бескальциевом растворе. (а) Примеры кальциевых ответов отдельных нейронов на две аппликации DES с интервалом в 5 мин, полученные в одном опыте. Жирная линия соответствует усредненному флуоресцентному сигналу от тел нейронов в пределах поля зрения. (b) Опыт аналогичный (A), но при аппликациях ATL. (c) Усредненная величина второго кальциевого ответа на DES и ATL (F_2) нормализованая на величину сигнала при первой аппликации (F_1). Кружки соответствуют отдельным опытам. Показано среднее значение и стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В каждом опыте использовали две 30-секундные аппликации ATL или DES, разделенные интервалом не менее 5 мин. Оказалось, что времени в 5 мин после первой аппликации достаточно для возвращения уровня $[Ca^{2+}]_i$ к базовым значениям (рис. 1a, b). Кроме того, амплитуда кальциевого ответа при повторной аппликации достоверно не отличалась от таковой при первой аппликации (рис. 1c) как в случае DES (p = 0.46; n = 11), так и в случае ATL (p = 0.44; n = 5). Оба TCA вызывали кальциевые ответы, превышающие базовый уровень кальция в 3.8 ± 0.3 раза (n = 26) для DES и в 3.9 ± 0.6 раза (n = 21) для ATL. Таким образом, эффект аппликаций ATL или DES был обратим и в условиях использованного протокола не вызывал "истощения" запасов депонированного кальция. В связи с этим в следующей серии опытов во время второй аппликации мы комбинировали ATL или DES с фармакологическими блокаторами IP₃-рецепторов или рианодиновых рецепторов как главных триггеров выхода кальция из внутриклеточных депо.

Кальциевый ответ нейронов на DES достоверно не подавлялся антагонистом IP₃-рецепторов 2-APB (рис. 2а). Более того, 2-APB парадоксальным образом усиливал ответ нейронов на DES (p = 0.025; n = 9) (рис. 2с). Ингибирование рианодиновых рецепторов (RyR), напротив, достоверно подавляло кальциевые ответы на DES (p = 0.004; n = 4) (рис. 2b, c). Таким образом, кальциевые ответы на DES преимущественно зависят от активации RyR, но не IP₃-рецепторов.

Кальциевый ответ нейронов на ATL подавлялся в присутствии 2-APB, но не рианодина (рис. 3а, b). Достоверное ингибирование кальциевых ответов в присутствии 2-APB (p = 0.033; n = 4) (рис. 3с) указывает на IP₃-зависимый характер действия ATL. Несмотря на тенденцию к усилению ответов на ATL рианодином, эффект последнего был недостоверен (p = 0.11; n = 5).

Учитывая обнаруженное в некоторых опытах потенцирование при использовании 2-АРВ или рианодина кальциевых ответов, были проведены дополнительные опыты, в которых проверяли возможность индуцирования кальциевых ответов



Рис. 2. Модуляция кальциевых ответов нейронов на аппликации 200 мкМ дезипрамина (DES) антагонистами IP₃-рецепторов (2-APB, 100 мкМ) и рианодиновых рецепторов (Ry, 100 нМ) в бескальциевом растворе. (а) Пример отдельного опыта, показывающего кальциевые ответы отдельных нейронов на DES и DES в присутствии 2-APB. Жирная линия соответствует усредненному флуоресцентному сигналу от тел нейронов в пределах поля зрения. (b) Пример отдельного опыта, показывающего кальциевые ответы отдельных нейронов на DES и DES в присутствии рианодина (Ry). Жирная линия соответствует усредненному флуоресцентному сигналу от тел нейронов в пределах поля зрения. (c) Средние по нескольким опытам значения флуоресцентных ответов нейронов на DES в присутствии антагонистов RyR и IP₃R блокаторов (F_2), нормализованные относительно флуоресцентных ответов в отсутствие блокаторов (F_1 , контроль). Кружки соответствуют отдельным опытам. Показано среднее значение и стандартная ошибка среднего. *, ** – значения достоверно отличаются от контроля.

нейронов аппликациями 2-APB или рианодина (рис. 4). Нами не выявлено достоверно детектируемых ответов нейронов ни на 30-секундные аппликации 100 мкМ 2-APB (рис. 4а), ни на аппликации 100 нМ рианодина (рис. 4b). При этом DES вызывал отчетливые кальциевые ответы в тех же нейронах. Таким образом, наблюдаемое нами потенцирование кальциевых ответов на DES в присутствии 2-APB или ответов на ATL в присутствии рианодина не связано с индукцией дополнительного кальциевого выброса 2-APB или рианодином.

Ввиду того, что DES и ATL являются ингибиторами NMDA-рецепторов [7–9], мы оценили влияние этих веществ на вход кальция в нейроны при активации NMDA-рецепторов 100 мкМ NMDA (+30 мкМ глицина в качестве коагониста) (рис. 5а, b). Опыты проводили во внеклеточном растворе, содержащем 1 мМ Ca²⁺. Как DES, так и ATL вызывали достоверное подавление входа кальция в нейроны при активации NMDA-рецепторов (рис. 5с), однако, даже сверхвысокие концентрации в 200 мкМ обоих TCA не вызывали полного блокирования входа кальция при действии NMDA. Этот результат был неожиданным, поскольку в электрофизиологических экспериментах такие высокие концентрации ATL и DES почти полностью блокировали токи через NMDA-рецепторы [7, 8]. Возможным объяснением неполного подавления кальциевого сигнала мог быть ранее показанный дополнительный выброс кальция из внутриклеточных депо при действии ATL или DES, проникающих в клетки через каналы NMDA-рецепторов.



Рис. 3. Модуляция кальциевых ответов нейронов на аппликации 200 мкМ амитриптилина (ATL) антагонистами IP₃-рецепторов (2-APB, 100 мкМ) и рианодиновых рецепторов (Ry, 100 нМ) в бескальциевом растворе. (а) Пример отдельного опыта, показывающего кальциевые ответы отдельных нейронов на ATL и ATL в присутствии 2-APB. Жирная линия соответствует усредненному флуоресцентному сигналу от тел нейронов в пределах поля зрения. (b) Пример отдельного опыта, показывающего кальциевые ответы отдельных нейронов на ATL и ATL в присутствии рианодина (Ry). Жирная линия соответствует усредненному флуоресцентному сигналу от тел нейронов в пределах поля зрения. (c) Средние по нескольким опытам значения флуоресцентных ответов нейронов на ATL в присутствии антагонистов RyR и IP₃R блокаторов (F_2), нормализованные относительно флуоресцентных ответов в отсутствие блокаторов (F_1 , контроль). Кружки соответствуют отдельным опытам. Показано среднее значение и стандартная ошибка среднего. * – значение достоверно отличается от контроля.

Соотношение кальциевых ответов нейронов на выход депонированного кальция и вход кальция из внеклеточной среды при активации NMDA-рецепторов исследовали в следующей серии экспериментов. Опыты проводили в базовом растворе, содержащем 1 мМ кальция. Амплитуда кальциевых ответов на аппликацию 200 мкМ ATL была в среднем в 40 раз меньше, чем при аппликации 100 мкМ NMDA (+30 мкМ глицина в качестве коагониста) (рис. 5d). Т.е. даже сверхвысокие концентрации ATL не вызывали в нейронах кальциевых ответов, сопоставимых по амплитуде с таковыми при активации NMDA-рецепторов. Тем не менее, неполное блокирование DES и ATL кальциевых ответов, активированных NMDA, по-видимому, может определяться совокупностью факторов, в частности, проникновением блокирующих каналы NMDA-рецепторов молекул в клетку и высвобождением депонированного в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях кальция.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что кратковременные аппликации как ATL, так и DES вызывают в нейронах коры кальциевые ответы, не различающиеся по величине. Однако использование антагонистов RyR и IP₃R выявило, что ответы на ATL блокируются антагонистом IP₃R – 2-APB (100 мкM), а ответы на DES блокируются рианодином – антагонистом RyR при применении в концентрации 100 нМ.



Рис. 4. Сравнение амплитуд кальциевых ответов на 30-секундные аппликации 200 мкМ дезипрамина (DES) и 100 мкМ (2-APB) (а) или 100 нМ рианодина (Ry) (b). *F*_{baseline} соответствует яркости свечения нейронов в отсутствие фармакологических агентов. Кружки соответствуют отдельным опытам. Показано среднее значение и стандартная ошибка среднего.

Механизм действия ATL на IP₃R слабо исследован, однако есть данные о том, что ATL прямо или косвенно стимулирует базовую активность фосфолипазы-С в мембране кортикальных нейронов и вызывает продукцию IP₃, что стимулирует IP₃-зависимый выход кальция из депо [31]. Кроме того, ATL и некоторые другие TCA связываются с сигма1-рецепторами, которые модулируют IP₃-зависимый кальциевый сигналинг [32, 33]. Механизм действия DES на RyR в настоящее время неизвестен.

Распределение RyR и IP₃R в пределах внутриклеточных органелл существенно различается [34]. Например, в клетках Пуркинье мозжечка [35], нейронах CA1 гиппокампа [36] RyR и IP₃R преимущественно локализованы в разных частях клеток и управляют функционально отдельными пулами депонированного кальция [37]. Различные эффекты антагонистов RyR и IP₃R на кальциевые ответы нейронов, вызванные ATL и DES, позволяют предполагать, что эти TCA, возможно, проявляют селективность в отношении различных внутриклеточных кальциевых депо. Поскольку ATL и DES вызывали кальциевые ответы нейронов в отсутствие активации кальций-проницаемых каналов, проникновение их в цитоплазму происходит, вероятно, не через поры ионных каналов, а напрямую через плазматическую мембрану [38].

Эффект потенцирования 2-АРВ выброса кальция при аппликации DES, вероятно, связан с неспецифическим подавлением захвата кальция митохондриями [28], за счет ингибирования 2-АРВ кальциевой АТФ-азы (SERCA) [28, 29]. Поэтому в отсутствие индуцированного кальциевого выхода из депо 2-АРВ не вызывал кальциевых ответов в наших экспериментах. 2-АРВ не действует на RyR [25], активируемые DES, поэтому при действии DES ингибирование 2-АРВ захвата кальция усиливает накопление последнего в цитоплазме. Однако кальциевые ответы на ATL



Рис. 5. Ингибирование дезипрамином (DES) и амитриптилином (ATL) входа кальция в нейроны, вызываемого 100 мкМ NMDA (+ глицин 30 мкМ) в присутствии 1 мМ кальция во внеклеточном растворе. Флуоресцентный ответ нейронов на NMDA в отсутствие TCA принят как контрольный ($F_{control}$). (а) Пример отдельного опыта, показывающего кальциевые ответы отдельных нейронов на аппликации NMDA отдельно и в комбинации с различными концентрациями дезипрамина (DES). (b) Опыт аналогичный (A), но при аппликациях амитриптилина (ATL). (c) Средние значения величины кальциевых ответов нейронов в присутствии различных концентраций DES или ATL, нормированные относительно контроля. Звездочками показано достоверное подавление TCA входа кальция в цитоплазму через активированные NMDA-рецепторы относительно контроля. (d) Сравнение амплитуд кальциевых ответов на аппликации NMDA и 200 мкМ амитриптилина (ATL). Кружки соответствуют отдельным клеткам. Показано среднее значение и стандартная ошибка среднего. $F_{baseline} - \phi_луоресценция без NMDA и ATL.$

IP₃-зависимы. Поэтому при подавлении 2-APB вызываемого ATL IP₃-зависимого кальциевого выхода побочный эффект на SERCA не играет значимой роли.

В растворе с физиологически нормальным содержанием кальция (1 мМ) флуоресцентный сигнал от вызываемого TCA выхода кальция из депо был в десятки раз слабее такового при входе кальция из внеклеточной среды в результате активации кальций-проницаемых каналов NMDA-рецепторов. Учитывая концентрации TCA (более 30 мкМ) необходимые для стимуляции выброса депонированного кальция в нейронах, представляется маловероятным, что подобные эффекты проявляются при их терапевтическом действии. Высокие концентрации TCA, необходимые для генерации кальциевых ответов, являются отличительной чертой именно нейронов, так как в кардиомиоцитах концентрация всего 10 мкМ ATL полностью блокировала кальциевые волны [17]. Тем не менее, обнаруженная специфичность DES и ATL в отношении RyR и IP₃R соответственно может использоваться в качестве инстру-

мента в экспериментальных целях.

ATL и DES, будучи каналоблокаторами NMDA-рецепторов [7–9], ожидаемо ингибировали вход кальция через активированные NMDA-рецепторы. Однако даже в сверхвысоких концентрациях (200 мкМ) оба TCA не смогли полностью заблокировать кальциевые ответы на NMDA. Остаточный кальциевый сигнал, по-видимому, может определяться совокупностью факторов, к которым относится проникновение ATL через каналы NMDA-рецепторов [9], позволяющий сохранить ничтожно малый вход кальция из внеклеточного раствора, и освобождение депонированного кальция из внутриклеточных органелл. Возможно, имеются и другие составляющие остаточного кальциевого сигнала, понимание которых требует дальнейшего изучения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Поддержано РФФИ грант № 20-515-18008 Болг_а и госзаданием АААА-А18-118012290427-7 ИЭФБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — Сибаров Д.А. и Антонов С.М., проведение экспериментов — Бойков С.И. и Карелина Т.В, обработка данных — Бойков С.И. и Сибаров Д.А., написание и редактирование рукописи — Сибаров Д.А., Шестакова Н.Н. и Антонов С.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rico-Villademoros F., Slim M., Calandre E.P. (2015) Amitriptyline for the treatment of fibromyalgia: a comprehensive review. Expert. Rev. Neurother. 15(10): 1123–1150. https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1091726
- 2. *Obata H.* (2017) Analgesic Mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. Int. J. Mol. Sci. 18(11): 2483.
- https://doi.org/10.3390/ijms18112483
- 3. *Russell J.W., Zilliox L.A.* (2014) Diabetic neuropathies. Peripheral Nervous System Disorders. 1226–1240.
 - https://doi.org/10.1212/01.CON.0000455884.29545.d2
- Tatsumi M., Groshan K., Blakely R.D., Richelson E. (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. Eur. J. Pharmacol. 340(2–3): 249–258. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01393-9
- Cusack B., Nelson A., Richelson E. (1994) Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. Psychopharmacology. 114(4): 559–565. https://doi.org/10.1007/BF02244985
- 6. Appl H., Holzammer T., Dove S., Haen E., Strasser A., Seifert R. (2012) Interactions of recombinant human histamine H1, H2, H3, and H4 receptors with 34 antidepressants and antipsychot-

ics. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 385(2): 145–170. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0704-0

- 7. *Tohda M., Urushihara H., Nomura Y.* (1995) Inhibitory effects of antidepressants on NMDAinduced currents in Xenopus oocytes injected with rat brain RNA. Neurochem. Internat. 26(1): 53–58.
 - https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)00101-y
- Barygin O.I., Nagaeva E.I., Tikhonov D.B., Belinskaya D.A., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. (2017) Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics. Brain Res. 1660: 58–66. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.028
- Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. (2019) Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block. Sci. Rep. 9(1): 19454. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z
- Lavoie P.A., Beauchamp G., Elie R. (1990) Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na⁺-Ca²⁺ exchange in rat brain cortex synaptosomes. Can. J. Physiol. Pharmacol. 68: 1414–1418. https://doi.org/10.1139/y90-215
- 11. Belinskaia D.A., Belinskaia M.A., Barygin O.I., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. (2019) Psychotropic drugs for the management of chronic pain and itch. Pharmaceuticals. 12(2): 99. https://doi.org/10.3390/ph12020099
- Boikov S.I., Sibarov D.A., Antonov S.M. (2020) Ethanol inhibition of NMDA receptors in calciumdependent and -independent modes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 522(4): 1046–1051. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.007
- Sibarov D.A., Abushik P.A., Poguzhelskaya E.E., Bolshakov K.V., Antonov S.M. (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 355(3): 484–495. https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173
- Sibarov D.A., Poguzhelskaya E.E., Antonov S.M. (2018) Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol. BMC Neurosci. 19(1): 73.
 https://doi.org/10.1196/c12968.018.0475.2

https://doi.org/10.1186/s12868-018-0475-3

- Janowsky D.S., Byerley B. (1984) Desipramine: an overview. J. Clin. Psychiatry. 45 (10 Pt 2): 3–9. PMID: 6384207
- Sibarov D.A., Antonov S.M. (2018) Calcium-dependent desensitization of NMDA receptors. Biochemistry (Mosc.) 83(10): 1173–1183. https://doi.org/10.1134/S0006297918100036
- Zima A.V., Qin J., Fill M., Blatter L.A. (2008) Tricyclic antidepressant amitriptyline alters sarcoplasmic reticulum calcium handling in ventricular myocytes. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 295(5): H2008–H2016. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00523.2008
- Joshi P.G., Singh A., Ravichandra B. (1999) High concentrations of tricyclic antidepressants increase intracellular Ca²⁺ in cultured neural cells. Neurochem. Res. 24: 391–398. https://doi.org/10.1023/a:1020937717260
- Chopra N., Laver D., Davies S.S., Knollmann B.C. (2008) Amitriptyline activates cardiac ryanodine channels and causes spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release. Mol. Pharmacol. 75 (1): 183–195. https://doi.org/10.1124/mol.108.051490
- Furuichi T., Kohda K., Miyawaki A., Mikoshiba K. (1994) Intracellular channels. Curr. Opin. Neurobiol. 4: 294–303.
- https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90089-2
 21. Mironova E.V., Evstratova A.A., Antonov S.M. (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. J. Neurosci. Methods. 163: 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010
- Han E.B., Stevens C.F. (2009) Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 10817–10822. https://doi.org/10.1073/pnas.0903603106
- Ehrlich B.E., Kaftan E., Bezprozvannaya S., Bezprozvanny I. (1994) The pharmacology of intracellular Ca²⁺-release channels. Trends Pharmacol. Sci. 15: 145–149. https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90074-4
- Maruyama T., Kanaji T., Nakade S., Kanno T., Mikoshiba K. (1997) 2APB,2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca²⁺ release. J. Biochem. 122: 498-505.

https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021780

- Saleem H., Tovey S.C., Molinski T.F., Taylor C.W. (2014) Interactions of antagonists with subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor. Br. J. Pharmacol. 171(13): 3298–3312. https://doi.org/10.1111/bph.12685
- 26. Palade P., Dettbam C., Brunder D., Stein P., Hals G. (1989) Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum. J. Bioenerg. Biomembr. 21: 295–319. https://doi.org/10.1007/BF00812074
- Bezprozvanny I., Ondrias K., Kaftan E., Stoyanovsky D.A., Ehrlich B.E. (1993) Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions. Molec. Biol. Cell. 4: 347–352.
 - https://doi.org/10.1091/mbc.4.3.347
- Missiaen L., Callewaert G., De Smedt H., Parys J.B. (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. Cell. Calcium. 29 (2): 111–116. https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0163
- 29. Bilmen J.G., Wootton L.L., Godfrey R.E., Smart O.S., Michelangeli F. (2002) Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. Eur. J. Biochem. 269: 3678–3687. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03060.x
- 30. Goto J., Suzuki A.Z., Ozaki S., Matsumoto N., Nakamura T., Ebisui E., Fleig A., Penner R., Mikoshiba K. (2010) Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca²⁺ entry via STIM proteins. Cell. Calcium. 47: 1–10. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.10.004
- Shimizu M., Nishida A., Yamawaki S. (1993) Forskolin and phorbol myristate acetate inhibit intracellular Ca²⁺ mobilization induced by amitriptyline and bradykinin in rat frontocortical neurons. J. Neurochem. 61(5): 1748–1754. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb09812.x
- 32. Hayashi T., Su T.P. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. Cell. 131(3): 596–610. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036
- Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. (2019) Neuronal Sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. Front. Neurosci. 13: 862. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00862
- Verkhratsky A. (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. Physiol. Rev. 85: 201–279. https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004
- Walton P.D., Airey J.A., Sutko J.L., Beck C.F., Mignery G.A., Südhof T.C., Deerinck T.J., Ellisman M.H. (1991) Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in avian cerebellar Purkinje neurons. J. Cell. Biol. 113(5): 1145–1157. https://doi.org/10.1083/jcb.113.5.1145
- 36. Segal M., Vlachos A., Korkotian E. (2010) The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. Neuroscientist. 16: 125–131. https://doi.org/10.1177/1073858409355829
- 37. Chen-Engerer H.J., Hartmann J., Karl R.M., Yang J., Feske S., Konnerth A. (2019) Two types of functionally distinct Ca2+ stores in hippocampal neurons. Nat. Commun. 10 (1): 3223. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11207-8
- Fisar Z. (2005) Interactions between tricyclic antidepressants and phospholipid bilayer membranes. Gen. Physiol. Biophys. 24 (2): 161–80. PMID: 16118470

The Role of Ryanodine and IP₃-Receptors in Calcium Responses to Tricyclic Antidepressants in Rat Neocortical Neurons

S. I. Boikov^a, D. A. Sibarov^a,*, T. V. Karelina^a, N. N. Shestakova^a, and S. M. Antonov^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia *e-mail: dsibarov@gmail.com

Tricyclic antidepressants, in particular amitriptyline (ATL) and desipramine (DES), are currently used to treat depression and chronic pain of various origins, in which NMDA receptor dysfunctions play an important role. The effect of therapeutic concentrations of ATL on calcium-dependent desensitization of NMDA receptors, driven by the level of

free calcium in the cytoplasm, is well-known. In addition, in cardiomyocytes, ATL and DES can cause the release of calcium into the cytoplasm from intracellular stores by opening inositol-3-phosphate (IP_3R) and / or ryanodine receptors (RyR) channels. The aspect of the effect of these drugs on neurons remains poorly understood. We studied the dependence of the calcium response to DES and ATL on the activation of IP₃R and RyR of the endoplasmic reticulum and mitochondria using rat neocortex neurons in primary culture. Short-term (30 s) paired (5 min interval) applications of 200 µM DES or 200 µM ATL induce similar magnitude calcium responses in cortical neurons. The use of RyR and IP_3R antagonists showed that responses to ATL are blocked by the IP_3R antagonist 2-APB (100 μ M), while responses to DES are blocked by ryanodine, the RyR antagonist (100 nM). Since intracellular distribution of RyR and IP_3R is not homogenous, it can be assumed that DES and ATL stimulate calcium release from different calcium depots, representing segments of the reticulum or mitochondria. In addition, ATL and DES, being channel blockers of NMDA receptors, inhibited calcium entry from outside the cell via activated NMDA receptors. Considering the high concentrations of DES and ATL (more than $100 \,\mu\text{M}$) required to stimulate the release of deposited calcium in neurons, it seems unlikely that such effects participate their therapeutic action. However, the found specificity of DES and ATL for RyR and IP₃R, respectively, can be used as a tool for experimental purposes.

Keywords: desipramine, amitriptyline, tricyclic antidepressants, calcium, neurons, IP₃-receptors, ryanodine receptors

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 641-646

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ИНГИБИТОР ГИСТОНДЕАЦИТИЛАЗ УСИЛИВАЕТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПОТЕНЦИАЦИЮ В НЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

© 2021 г. Д. Е. Колотова¹, А. Ю. Малышев¹, П. М. Балабан^{1, *}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия *E-mail: pmbalaban@gmail.com

> Поступила в редакцию 17.01.2021 г. После доработки 09.02.2021 г. Принята к публикации 09.02.2021 г.

В последнее время в литературе накапливается все больше данных о важной роли эпигенетических перестроек при формировании долговременной синаптической пластичности – основному клеточному механизму обучения и памяти. В данной работе мы изучили влияние ингибирования гистондеацетилаз, одного из видов эпигенетических модификаций, на формирование долговременной потенциации синаптических ответов в премоторных (командных) нейронах оборонительного поведения виноградной улитки. Потенциация синаптических входов премоторных нейронов лежит в основе аверзивной памяти этого животного. Мы показали, что применение ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия увеличивает амплитуду долговременной потенциации, вызванной пятикратной тетанизацией сенсорного нерва, совмещенной с аппликацией серотонина. Мы также обнаружили, что аппликация бутирата сама по себе вызывает увеличение амплитуды ВПСП через 4 ч после применения блокатора. Однако данное увеличение не может лежать в основе обнаруженного эффекта облегчения долговременной потенциации, который наблюдался на всем протяжении эксперимента. Таким образом, в нашей работе продемонстрирована роль модификации гистонов в механизмах синаптической пластичности.

Ключевые слова: эпигенетика, долговременная потенциация, ацетилирование гистонов, гистондеацетилаза, бутират натрия **DOI:** 10.31857/S0869813921040105

введение

Ацетилирование гистонов играет важную роль в эпигенетической регуляции синаптической пластичности и памяти у беспозвоночных и позвоночных животных [1, 2]. На ацетилирование гистонов оказывают влияние две группы ферментов гистонацетилтрансферазы и гистондеацетилазы. В литературе последних лет накопилось много данных о важной роли баланса гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз, изменения которого могут как нарушать, так и улучшать синаптическую пластичность, память и процессы обучения у взрослых животных [3]. Для изучения роли ацетилирования гистонов в регуляции синаптической пластичности эффективно применение ингибиторов гистондеацетилаз [4, 5], приводящих к усилению ацетилирования гистонов. В ряде работ, посвященных влиянию различных ингибиторов гистондеацетилаз на формирование долговременной синаптической пластичности показано, что ингибитор гистондеацетилаз класса I бутират натрия влияет на долговременные изменения эффективности синаптической передачи на клеточных и поведенческих моделях [6–10]. Было показано, что ингибирование деацетилирования гистонов может приводить к усилению формирования долговременных синаптических изменений и улучшению памяти у беспозвоночных животных [7, 8, 11]. Также получены данные о том, что аппликация бутирата натрия приводит к усилению долговременной потенциации на срезах гиппокампа крыс [6]. Однако влияние ингибирования гистондеацетилаз на формирование долговременной потенциации у виноградной улитки — важного модельного объекта в нейробиологических исследованиях, ранее не было изучено в электрофизиологических экспериментах. В данной работе с помощью ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия исследовалось влияние ацетилирования гистонов на формирование долговременной потенциации у виноградной улитки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на улитках *Helix lucorum taurica L*. массой 20–30 г. За 1-2 нед. до эксперимента улиток помещали во влажную среду, где они находились в активном состоянии. Протокол экспериментов утвержден Этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Электрофизиологические эксперименты проводили на изолированной ЦНС улиток. Препарирование и идентификацию нейронов осуществляли по стандартной методике [12]. Перед началом препарирования производили инъекцию холодного изотонического раствора MgCl₂ для обездвиживания и обезболивания животного. Изолированную ЦНС помещали в физиологический раствор Рингера (мМ): 100 NaCl, 4 KCl, 7 CaCl₂, 5 MgCl₂, 10 Trizma, pH 7.6.

Внутриклеточную регистрацию активности премоторных (командных) интернейронов париетальных ганглиев (РаЗ и Ра2) проводили при помощи острых стеклянных микроэлектродов, заполненных ацетатом калия (2 М), сопротивлением 20–30 МОм. Регистрировали возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП), вызванные электрической стимуляцией интестинального нерва, не содержащего отростков регистрируемых нейронов. В каждом эксперименте амплитуду стимула подбирали таким образом, чтобы стимуляция вызывала не потенциалы действия, а ВПСП амплитудой 5–15 мВ.

В начале записи проводили 5 тестовых стимуляций с интервалом между стимулами 10 мин, затем осуществляли тетанизацию интестинального нерва (пачка стимулов частотой 10 Гц, длительность пачки 10 с, 10-кратное увеличение амплитуды тестового стимула). Всего тетанизацию осуществляли 5 раз с интервалом 5 мин. Перед каждой тетанизацией в экспериментальную ванночку добавляли серотонин (10^{-5} M) , который отмывали через 2 мин после тетанизации. После пятой тетанизации продолжали тестирующую стимуляцию интестинального нерва с исходной амплитудой стимула каждые 10 мин в течение нескольких часов.

Первые 50 мин записи перфузионная система находилась в замкнутом режиме вплоть до момента первой тетанизации. В двух сериях экспериментов с ингибитором гистондеацетилаз в этот временной период в экспериментальной ванночке находился бутират натрия в концентрации 60 мкМ. После первой тетанизации (и первой аппликации серотонина) производился интенсивный "отмыв" препарата, который полностью удалял бутират из ванночки. После последней тетанизации система перфузии переводилась в разомкнутое состояние (отмыв), при этом скорость протока составляла 0.2 мл/мин при объеме ванночки 3 мл.

Достоверность изменений амплитуды синаптических потенциалов оценивали по статистическому критерию Манна–Уитни.



Рис. 1. Влияние бутирата натрия на формирование долговременной потенциации амплитуды комплексного ВПСП в премоторных (командных) гигантских нейронах париетальных ганглиев виноградной улитки, вызванной тетанизацией синаптического входа. Амплитуда ВПСП при первой тестовой стимуляции была принята за единицу. Серыми прямоугольниками обозначено время, когда бутират натрия присутствовал в экспериментальной ванночке и эпохи усреднения ВПСП, использованные для статистического анализа, и обозначаемые в тексте как "2 ч после тетанизации" и "4 ч после тетанизации". На графике представлены средние значения ± *SEM*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ритмическая тестирующая стимуляция интестинального нерва с частотой 1 стимул в 10 мин приводила в течение нескольких часов к постепенному уменьшению амплитуд ВПСП в командных нейронах – феномен, хорошо описанный для данного препарата [12] и вызванный, скорее всего, гомосинаптической депрессией (привыканием) (рис. 1, заполненные треугольники). Для статистического анализа изменений амплитуд ответов мы выделили два временных окна в записи: 120-170 мин после первой тетанизации (это временное окно далее в тексте называется "2 ч после тетанизации") и 210-260 мин после тетанизации (этот период в тексте будет обозначаться как "4 ч после тетанизации"). Пятикратная тетанизирующая стимуляция, совмещенная с аппликацией серотонина, вызывала выраженный рост амплитуд ВПСП (рис. 1, заполненные кружки). Так, через 2 ч после тетанизации усредненная амплитуда ВПСП составляла 101.8 \pm 8.8% от исходной (n = 12), в то время как в контрольных экспериментах эффект ослабления ответа приводил к тому, что в той же временной точке амплитуда ВПСП составляла в среднем $48.1 \pm 4.1\%$, n = 21 (p < 0.001). Через 4 ч после тетанизации амплитуда ВПСП тетанизированных входов также превышала средние амплитуды ответов в контрольной группе $(71.7 \pm 11.8\%, n = 12 \text{ и } 38.3 \pm 4.1\%, n = 21, p < 0.05)$. Ингибирование гистондеацетилаз путем добавления бутирата в экспериментальную ванночку за 1 ч до тетанизации приводило к достоверному увеличению амплитуды синаптической потенциации, вызванной сочетанным применением тетанизации нерва и аппликации серотонина (рис. 1, пустые кружки). Через 2 ч после тетанизации средняя амплитуда ВПСП в группе с бутиратом составляла 220.8 ± 59.4% (n = 14) и была достоверно выше средних амплитуд ВПСП в группе тетанизации без бутирата (101.8 ± 8.8%, n = 12, p < 0.01). Через 4 ч после тетанизации амплитуда ответов в группе с бутиратом была также выше, чем в группе тетанизации без бутирата натрия (151 ± 38.7, n = 14 и 71.7 ± 11.8%, n = 12, p < 0.05), что говорит о долговременности эффекта.

Для выяснения возможного влияния бутирата натрия на амплитуду ВПСП в командных нейронах была поставлена специальная контрольная серия экспериментов, в которых бутират также присутствовал в экспериментальной ванночке первые 50 мин записи, после которых препарат интенсивно отмывался и система перфузии переводилась в открытый режим, как и в остальных сериях экспериментов, но тетанизации при этом не проводилось. Выяснилось, что само по себе добавление бутирата не вызывало изменения амплитуды ВПСП во временном окне "2 ч после тетанизации". Средняя амплитуда ответов в этот временной период составляла $48.1 \pm 4.1\%$, n = 21 в контроле и 56.8 ± 6.1 , n = 1 1, для группы "контроль с бутиратом". Однако через 4 ч в группе "контроль с бутиратом" начинался небольшой, но достоверный рост амплитуды ВПСП. Так, в группе "контроль без бутирата" средняя амплитуда ВПСП в эпоху анализа "4 ч после тетанизации" составляла $38.3 \pm 4.1\%$, n = 21, в то время как в группе "контроль с бутиратом" усредненная амплитуда синаптических ответов была достоверно выше и равнялась $60.4 \pm 9.5\%$, n = 14, p < 0.05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего необходимо отметить, что исследованные в настоящей работе синаптические входы и идентифицированные нейроны прямо относятся к сети оборонительного поведения виноградной улитки. Роль гигантских FMRFamid-содержащих нейронов париетальных ганглиев хорошо описана [13], поэтому изменение эффективности синаптических входов к данным нейронам имеет прямое функциональное значение для регуляции оборонительного поведения животного.

На поведенческом уровне на этом животном проделана большая работа по выяснению возможности влияния двух различных ингибиторов гистондеацетилаз (бутирата натрия и трихостатина A) на оборонительное поведение и показаны достоверные эффекты увеличения величины оборонительных реакций улитки не только во время реконсолидации обстановочной памяти, но и восстановление памяти при ее нарушении двумя разными способами [2]. Существенным является тот факт, что введение ингибиторов гистондеацетилаз в этой работе без тестирования (реактивации) памяти не приводило к выраженным поведенческим эффектам при тестировании в течение нескольких дней, что предполагает регулирующее влияние ингибиторов гистондеацетилаз именно на молекулярную систему формирования и поддержания памяти. В настоящей работе эффекты ингибитора гистондеацетилаз без потенциации наблюдались только через несколько часов и были сравнительно слабо выраженными.

Полученные данные можно интерпретировать как нейросетевое объяснение поведенческих результатов на этих животных. С точки зрения возможной роли эпигенетических процессов в регуляции пластичности и памяти, можно сказать, что не только интибиторы гистондеацетилаз, но и другие регулирующие факторы координированно влияют на уровень экспрессии генов. По-видимому, влияние этих факторов без сильных внешних стимулов (потенциация, подкрепление при обучении и т.д.) заторможено специальными системами "молекулярных тормозов" и только в условиях сильных внешних воздействий эпигенетическими регуляторами открывается "окно возможностей" для долговременных изменений [3]. Существенно отметить, что деацетилирование гистонов приводит к изменениям плотности упаковки хроматина, которые большей частью обратимы, и по сути только открывают возможность ("окно") для долговременных изменений экспрессии генов, которые в основном осуществляются путем метилирования ДНК [3, 14]. Полученные в настоящей работе данные позволяют считать, что обратимые посттрансляционные модификации гистонов служат основой для пластических изменений в функциональных сетях нейронов. В то же время именно метилирование ДНК и метил-зависимые способы регуляции трехмерной организации хроматина могут служить стабильной молекулярной основой для долговременного хранения пластических изменений и памяти [3, 14].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-10067).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАЛ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Д.Е., М.А.Ю., Б.П.М.), сбор данных (К.Д.Е.), обработка данных (К.Д.Е., М.А.Ю.), написание и редактирование манускрипта (К.Д.Е., М.А.Ю., Б.П.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Campbell R.R., Wood M.A. (2019) How the epigenome integrates information and reshapes the synapse. Nat. Rev. Neurosci. 20: 133-147.
- 2. Zuzina A.B., Vinarskaya A.K., Balaban P.M. (2020) Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav Physiol. 206: 639-649.
- https://doi.org/10.1007/s00359-020-01422-w
- 3. Borodinova A.A., Balaban P.M. (2020) Epigenetic Regulation as a Basis for Long-Term Changes in the Nervous System: In Search of Specificity Mechanisms. Biochemistry (Mosc.). 85: 994– 1010.
- 4. Penney J., Tsai L.H. (2014) Histone deacetylases in memory and cognition. Sci. Signal 7: re12.
- 5. Peixoto L., Abel T. (2013) The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. Neuropsychopharmacology. 38: 62-76.
- 6. Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M.A., Molfese D.L., Sweatt J.D. (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. J. Biol. Chem. 279: 40545-40559. https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200
- 7. Federman N., Fustiñana M.S., Romano A. (2012) Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. Neuroscience. 219: 145–156. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.057
- 8. Federman N., Fustiñana M.S., Romano A. (2009) Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn Mem. 16: 600–606. https://doi.org/10.1101/lm.1537009
- 9. Lattal K.M., Barrett R.M., Wood M.A. (2007) Systemic or Intrahippocampal Delivery of Histone Deacetylase Inhibitors Facilitates Fear Extinction. Behav. Neurosci. 121: 1125–1131. https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.1125
- 10. Stefanko D.P., Barrett R.M., Ly A.R., Reolon G.K., Wood M.A. (2009) Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 9447-9452.

https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106

11. Chen S., Cai D., Pearce K., Sun P.Y.W., Roberts A.C., Glanzman D.L. (2014) Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in Aplysia. Elife. 3: 1-21.

https://doi.org/10.7554/eLife.03896

- 12. *Malyshev A.Y., Balaban P.M.* (2002) Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: Response properties and synaptic connections. J. Neurophysiol. 87: 2364–2371. https://doi.org/10.1152/jn.00185.2001
- Balaban P.M. (2002) Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. Neurosci. Biobehav. Rev. 26: 597–630.
- Miller C.A., Sweatt J.D. (2007) Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. Neuron. 53: 857–869. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.022

Histone Deacytylase Inhibitor Enhances Long-Term Synaptic Potentiation in the Neurons of a Grape Snail

D. E. Kolotova^a, A. Yu. Malyshev^a, and P. M. Balaban^{a, *}

^a Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia *e-mail: pmbalaban@gmail.com

Recently, substantial amount of data was accumulated in the literature suggesting an important role of epigenetics in formation of long-term synaptic plasticity – the main cellular mechanism of learning and memory. In this work, we studied the effect of inhibition of histone deacetylases, one of the types of epigenetic modifications, on the formation of long-term potentiation of synaptic responses in premotor (command) neurons of the avoidance behavior of the grape snail. Potentiation of synaptic inputs in these neurons underlies aversive memory in this animal. We showed that histone deacetylase inhibitor sodium butyrate increases the amplitude of long-term potentiation caused by five tetanizations of the sensory nerve, combined with application of serotonin. We also found that application of sodium butyrate by itself caused an increase in EPSP amplitude 4 hours after application. However, this increase cannot underlie the observed effect of long-term potentiation, which was observed throughout the experiment. Thus, in our work, we have demonstrated the role of histone modifications in long-term changes in synaptic plasticity.

Keywords: epigenetics, long-term potentiation, histone acetylation, histone deacetylase, sodium butyrate

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 4-5, с. 647-660

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕХАНИЗМОВ УГНЕТЕНИЯ КВАНТОВОГО ВЫДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ АКТИВАЦИИ ВАНИЛЛОИДНЫХ (TRPV1) И ПУРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ

© 2021 г. А. Ю. Архипов¹, Н. В. Жиляков¹, А. И. Маломуж¹, Д. В. Самигуллин^{1, 2, *}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань, Россия

*E-mail: samid75@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2021 г. После доработки 05.02.2021 г. Принята к публикации 05.02.2021 г.

Основной целью исследования стало изучение взаимосвязи между сигнальными путями регуляции квантового выделения ацетилхолина (АХ) в периферическом синапсе, которые инициируются активацией ваниллоидных и пуриновых рецепторов. В электрофизиологических экспериментах, проведенных на нервно-мышечном синапсе *m. Levator Auris Longus* мыши, было установлено, что частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки (мПКП) и квантовый состав потенциалов концевой пластинки (ПКП) уменьшаются в присутствии агониста ваниллоидных рецепторов (TRPV1) капсаицина. Данный эффект полностью устранялся соединением SB 366791, специфическим конкурентным антагонистом TRPV1-рецепторов. АТФ, так же, как и капсаицин, снижал частоту мПКП и квантовый состав ПКП. На фоне антагониста TRPV1 угнетающий эффект АТФ на секрешию АХ реализовывался в полном объеме. В то же время на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином действие АТФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию АХ отсутствовало. Было сделано предположение, что в основе механизмов действия АТФ и капсаицина может лежать изменение входа Ca²⁺ в нервное окончание. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты по оценке изменений пресинаптического уровня кальция (Ca²⁺-транзиента) при помощи флуоресцентного кальциевого красителя при стимуляции нерва. Амплитуда Ca^{2+} -транзиента не изменялась ни при аппликации AT Φ , ни при добавлении капсаицина. Таким образом, в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, наряду с пуринергическим путем регуляции АХ, имеет место и механизм модуляции нейросекреции, опосредованный активацией TRPV1-каналов. Запуск этих механизмов приводит к угнетению процессов как спонтанного, так и вызванного выделения квантов АХ из двигательного нервного окончания. Оба пути регуляции не сопровождаются изменением Ca²⁺-транзиента, но имеют общее звено в регуляции квантового выброса медиатора.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, ацетилхолин, TRPV1-рецептор, кальциевый транзиент, АТФ, нейросекреция

DOI: 10.31857/S0869813921040038

введение

Синаптическая передача в нервно-мышечном соединении опосредуется высвобождением из нервного окончания молекул ацетилхолина (АХ), которые связываются с рецепторами АХ в постсинаптической области сарколеммы, что приводит к возникновению спонтанных или вызванных потенциалов концевой пластинки [1]. Модуляция синаптической передачи может опосредоваться как собственно молекулами АХ [2], так и синаптически активными молекулами, способными выделяться как из двигательной нервной терминали, так и из глиальных клеток. В качестве таких регуляторов могут выступать молекулы аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и его производные, глутамат, N-ацетиласпартилглутамат, вещество Р (нейропептид из семейства тахикининов), оксид азота (NO) и др. [3–7].

Одним из наиболее активно изучаемых регуляторов нервно-мышечной трансмиссии является АТФ, который выделяется из синаптических везикул вместе с АХ [8]. Не только АТФ, но и его производные (АДФ, АМФ и аденозин) способны оказывать модуляторное действие на синаптическую передачу, активируя широкий спектр пуриновых рецепторов, среди которых выделяют две большие группы: рецепторы аденозина, или Р1, и рецепторы Р2, которые активируются АТФ, АДФ, уридин-5'-дифосфатом и уридин-5'-трифосфатом [8, 9]. АТФ и аденозин снижают уровень квантового высвобождения АХ, активируя пресинаптические пуриновые рецепторы [10, 11]. Предположительно, вышеупомянутые эффекты связаны с подавлением входа кальция в нервное окончание [10, 12].

АТФ является важным медиатором химически индуцированной ноцицепции и боли, высвобождаясь из поврежденной и/или воспаленной ткани [13]. АТФ сенситизирует каналы первого типа подсемейства TRPV, называемые ваниллоидными каналами (англ. "transient receptor potential cation channels", TRPV1), активируемые капсаицином или протонами [14, 15]. Помимо протонов, в качестве эндогенных активаторов могут выступать такие воспалительные агенты, как "эндованиллоиды" (анандамид, N-арахидоноил дофамин и др.) [14, 16]. Получены данные, указывающие на присутствие TRPV1-каналов в периферических нервно-мышечных синапсах [17]. Активация этих каналов приводит к снижению количества выделяемых квантов АХ при стимуляции двигательного нерва [18].

Таким образом, механизм снижения выделения АХ из нервного окончания может запускаться активацией как пуриновых рецепторов, так и TRPV1-каналов. В связи с этим встал вопрос о наличии или отсутствии взаимосвязи между сигнальными путями регуляции выделения АХ, которые инициируются пуриновыми и ваниллоидными рецепторами. Также встает вопрос о том, могут ли в механизмах модуляторного действия пуринов и агонистов TRPV1-рецепторов на квантовую секрецию АХ в периферических нервных окончаниях теплокровных быть задействованы цепочки, связанные с изменением пресинаптического уровня кальция. Поиск ответов на эти вопросы и стал целью настоящего исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с инструкциями по использованию лабораторных животных Казанского федерального университета и Казанского медицинского университета в соответствии с руководством NIH по уходу и использованию лабораторных животных. Протокол эксперимента соответствовал требованиям Директивы Совета европейских сообществ 86/609/EEC.

Исследования были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах мыши (линия BALB/c, *m. Levator Auris Longus*). Нервно-мышечные препараты помещали в ванночку объемом 3 мл, дно которой было покрыто смолой Sylgard (Dow Corning, США). Препараты растягивали на 15% от их исходного размера в
покое при помощи микроигл из нержавеющей стали. Через ванночку протекал раствор со скоростью 3 мл/мин. следующего состава (в мМ): 137 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl₂; 2 CaCl₂; 1 Na₂HPO₄; 15 NaHCO₃; 11 глюкоза. Раствор аэрировали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂), рН раствора составлял 7.2–7.4, температуру в ванночке поддерживали встроенными элементами Пельтье на уровне $20.0 \pm 0.3^{\circ}$ C.

Нерв раздражали прямоугольными стимулами длительностью 0.25 мс супрамаксимальной амплитуды с частотой 0.5 Гц при помощи всасывающего электрода. Во всех экспериментальных сериях сокращения нервно-мышечного препарата блокировали путем добавления в омывающий раствор µ-конотоксина GIIIB 2 мкМ (Рерtide Institute Inc., Япония).

В ходе экспериментов методами внутриклеточного отведения потенциала осуществлялась регистрация вызванных и спонтанных (миниатюрных) потенциалов концевой пластинки (ПКП и мПКП). Электроды для измерения потенциалов изготавливались на приборе P-97 Micropipette Puller (Sutter Instrument, США). Сопротивление электродов составляло порядка 30 МОм. Заполнялись электроды 3-х молярным раствором КСІ. Регистрация и анализ постсинаптических сигналов осуществлялись с помощью установки для электрофизиологических исследований, включающей в себя: микроскоп BX 51 (Olympus, Япония) с водно-иммерсионным объективом (увеличение $60\times$, апертура 1.00), двухканальный усилитель биопотенциалов AxoClamp 900A (Axon Instruments, США), стимулятор 2100 (A-M Systems, США), аналого-цифровой преобразователь Digidata 1440A (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 100 кГц, микроманипуляторы MPC-200 (Sutter Instruments, США) и компьютер. Для регистрации мембранного потенциала и непрерывной записи событий во время эксперимента к усилителю также был подключен медленный аналого-цифровой преобразователь MiniDigi 1B (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 1 кГц.

Обработка и регистрация данных производилась в программном пакете pCLAMP 10.4. Величина мембранного потенциала, при котором начинали регистрацию, варьировала в диапазоне 65–75 мВ. Результаты экспериментов, в которых мембранный потенциал покоя изменялся в течение опыта более, чем на 10 мВ не анализировались. В каждом эксперименте в одном синаптическом контакте регистрировали 30–50 вызванных ПКП, после чего, в течение 2-х минут записывали мПКП в контроле и после действия фармакологических агентов. Квантовый состав находили путем деления усредненных амплитуд вызванных ПКП на среднюю амплитуду мПКП. Для коррекции квантового состава на нелинейность суммации использовали поправку Мартина [19].

Для регистрации относительного изменения уровня Ca^{2+} в пресинаптической клетке (Ca^{2+} -транзиента) использовалась фотометрическая система на базе микроскопа Olympus BX 51, оснащенная высокоскоростной чувствительной камерой Red Shirt Imaging Neuro CCD-smq camera (Red Shirt Imaging, CША). Регистрация Ca^{2+} -транзиента осуществлялась с использованием специфического Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя Oregon Green 488 Bapta 1 hexapotassium salt (Molecular Probes, США). Загрузку кальциевого красителя (1 мМ) в двигательные моторные окончания осуществляли через культю нерва [20].

Для записи и обработки данных в экспериментах по измерению Ca²⁺-транзиента использовались программы Turbo-SM и ImageJ. Данные представлены в виде отношения: ($\Delta F/F_0 - 1$) × 100%, где ΔF – интенсивность флуоресценции во время стимуляции, F_0 – интенсивность флуоресценции в состоянии покоя.

Эксперименты осуществляли по следующему протоколу: записывали контрольные сигналы, после чего апплицировали вещество с помощью системы общей перфузии в течение 20 мин и регистрировали сигналы под действием вещества. Применяли следующие вещества: капсаицин (1 мкМ, 10 мкМ), SB 366791 (5 мкМ) и $AT\Phi$ (100 мкМ). В экспериментах с капсаицином и SB 366791 вещества предварительно растворяли в DMSO. В экспериментах, проведенных с этими агентами, в контрольный раствор добавляли такую же концентрацию DMSO, которая присутствовала в растворе с апплицируемым веществом. В конечном итоге концентрация DMSO в растворе не превышала 0.01%.

Экспериментальные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. В электрофизиологических экспериментах n – количество синапсов, соответствующее количеству нервно-мышечных препаратов. В экспериментах по регистрации кальциевого транзиента n – количество синапсов в нервно-мышечных препаратах от 4—6 животных. Для статистической обработки результатов использовали двухсторонний критерий Стьюдента. Проверку выборки на нормальное распределение проводили с помощью критерия Андерсона—Дарлинга. В экспериментах с тремя группами данных применяли поправку Бонферрони на множественную проверку гипотез. Различия считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследования оценивали влияние активации ваниллоидных и пуриновых рецепторов на процесс спонтанной квантовой секреции АХ. Частота мПКП в контроле в синапсах *m. LAL* составила 1.2 ± 0.1 имп/с (n = 15). На рис. 1 представлены фрагменты нативных записей миниатюрных потенциалов концевой пластинки и гистограммы распределения амплитуд мПКП в контроле и под действием капсаицина. Капсаицин в концентрациях 1 и 10 мкМ приводил к снижению частоты на $13.3 \pm 0.7\%$ (p < 0.05, n = 7) и $13.2 \pm 4.6\%$ (p < 0.05, n = 4) соответственно (рис. 1, 2). Так как не наблюдалось выраженного дозозависимого эффекта капсаицина на частоту (и, как показано ниже, на квантовый состав ПКП) в дальнейшем использовали агонист в концентрации 1 мкМ.

Конкурентный антагонист TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ не оказывал влияния на спонтанную секрецию AX, и частота мПКП составляла $94.6 \pm 6.3\%$ относительно контроля (p > 0.05, n = 8; рис. 2), в то же время на фоне SB 366791 эффект капсаицина полностью отсутствовал ($109.0 \pm 7.7\%$; p > 0.05, n = 8; рис. 2). Следовательно, снижение уровня спонтанного выделения AX под действием капсаицина опосредовано активацией TRPV1-каналов.

Ранее неоднократно было показано, что АТФ угнетающе влияет на процесс спонтанной нейросекреции АХ [10, 21, 22]. В наших экспериментах АТФ в концентрации 100 мкМ приводил к снижению частоты мПКП на $18.2 \pm 6.5\%$ (p < 0.05, n = 6; рис. 1, 2).

Поскольку АТФ способен модулировать работу TRPV1-каналов [14], то необходимо было оценить возможность реализации угнетающего действия нуклеозидтрифосфата посредством активации ваниллоидных рецепторов. На фоне антагониста TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ угнетающий эффект АТФ реализовывался в полном объеме, и частота мПКП снижалась на 25.5 ± 6.8% (p < 0.05, n = 7; рис. 2). В то же время на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином действие АТФ на спонтанную квантовую секрецию устранялось, и частота мПКП соответствовала уровню, зарегистрированному в присутствии только капсаицина ($101.0 \pm 9.4\%$; p > 0.05, n = 8; рис. 2). Во всех экспериментах с добавлением АТФ наблюдалось увеличение времени спада мПКП, которое в среднем составляло 3.0 ± 0.2 мс (n = 7) в контроле. При аппликации только нуклеозидтрифосфата время спада увеличивалось на $28.3 \pm 11.0\%$ (p < 0.05, n = 6); в экспериментах, где АТФ добавляли на фоне антагониста TRPV1-каналов, данный параметр увеличивался на 57.7 $\pm 16.3\%$ (p < 0.05, n = 7). В экспериментальной серии, когда апплицировали АТФ после



Рис. 1. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки (mEPPs), зарегистрированные в нервно-мышечных синапсах *m. LAL* в контроле (Control), под действием капсаицина (CAP) и ATФ (ATP). Представлены данные в рамках двух репрезентативных экспериментов: верхняя панель эксперимент с капсаицином, нижняя с ATФ. Слева – фрагменты нативных записей мПКП; в центре – гистограммы распределения амплитуд мПКП; справа – гистограммы распределения межимпульсных интервалов мПКП. Кривые на гистограммах – функции плотности вероятности для распределений Гаусса и Пуассона (черные – контроль, серые – после аппликации вещества).



Рис. 2. Влияние агониста TRPV1-каналов капсаицина (САР; 1 и 10 мкМ), блокатора TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ) и АТФ (АТР; 100 мкМ) на частоту мПКП (Frequency mEPP), выраженную в процентах от контрольного значения. В экспериментах с SB 366791 и АТФ капсаицин использовали в концентрации 1 мкМ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. n = 4-8, *p < 0.05 по сравнению с контролем.



Рис. 3. Угнетающее влияние капсаицина (САР) в концентрациях 1 мкМ (n = 7) и 10 мкМ (n = 4) на вызванное стимуляцией нерва выделение АХ. Панель (а) — нативные записи вызванных и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации капсаицина. Панель (b) — относительное изменение величины квантового состава потенциалов концевой пластинки (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. *p < 0.05 по сравнению с контролем.

капсаицина, время спада возрастало на 65.0 \pm 7.9% (p < 0.5, n = 8). Во всех других сериях (капсаицин 1 мкМ; капсаицин 10 мкМ; SB 366791; капсаицин 1 мкМ на фоне SB 366791) изменений во времени спада мПКП не наблюдалось (p > 0.05 во всех случаях).

Поскольку при активации TRPV1-рецепторов угнетающее влияние АТФ на частоту мПКП полностью отсутствует, то есть основания полагать наличие определенной взаимосвязи между сигнальными путями регуляции спонтанного выделения АХ, которые инициируются пуриновыми и ваниллоидными рецепторами. Возможность наличия такой взаимосвязи регуляторных механизмов была проверена далее в экспериментах с регистрацией вызванной квантовой секреции АХ.

Среднее значение квантового состава в контроле для препарата *m. LAL* составило 34.4 \pm 2.5% (*n* =25). Под действием капсаицина (1 мкМ) квантовый состав ПКП снижался на 16.0 \pm 3.6% (*p* < 0.05, *n* = 7; рис. 3). Повышение концентрации капсаицина до 10 мкМ не приводило к увеличению угнетающего эффекта, квантовый состав снижался на 15.4 \pm 5.7% (*p* < 0.05, *n* = 4; рис. 3). В присутствии антагониста TRPV1-каналов SB 366791 (5 мкМ) квантовый состав ПКП не изменялся (102.2 \pm 4.1%; *p* > 0.05, *n* = 8; рис. 4), однако ингибирующий эффект капсаицина устранялся полностью (101.1 \pm 2.1%; *p* > 0.05, *n* = 8; рис. 4).

Далее, как и в экспериментах со спонтанной квантовой секрецией, оценивали возможность взаимосвязи между пуринергическим и ваниллоидным сигнальными путями регуляции вызванного освобождения АХ.

АТФ в концентрации 100 мкМ снижал квантовый состав ПКП на 14.9 ± 3.3% (p < 0.05, n = 6; рис. 5). Данный угнетающий эффект АТФ на фоне антагониста TRPV1-каналов SB 366791 в концентрации 5 мкМ сохранялся, и квантовый состав снижался на 22.5 ± 2.0% (p < 0.05, n = 7; рис. 5). Далее было установлено, что АТФ на фоне активации TRPV1-каналов капсаицином не способен оказывать своего угнетающего влияния на вызванную квантовую секрецию АХ (квантовый состав составил 99.8 ± 4.8%; p > 0.05, n = 7; рис. 5).



Рис. 4. Отсутствие влияния блокатора TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ, n = 8), а также эффекта капсаицина (CAP; 1мкМ, n = 8) в присутствии этого блокатора на вызванное стимуляцией нерва выделение AX. Панель (а) – нативные записи вызванных и мПКП (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации фармакологических агентов. Панель (b) – относительное изменение величины квантового состава ПКП (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Как и в экспериментах с регистрацией мПКП, у вызванных ПКП также наблюдалось увеличение времени спада сигнала во всех случаях (p < 0.05), когда апплицировали АТФ (только АТФ, АТФ на фоне капсаицина, АТФ на фоне SB 366791). Эти данные предполагают наличие постсинаптического действия нуклеозидтрифосфата, не связанного напрямую с механизмом действия АТФ на процесс нейросекреции АХ.

Поскольку количество квантов АХ, выделившихся в ответ на стимуляцию двигательного нерва, сильно зависит от уровня входящего в нервную терминаль Ca^{2+} [23], то было сделано предположение, что в основе механизмов действия АТФ и капсаицина может лежать изменение входа Ca^{2+} . Проверка этого предположения весьма интересна, так как TRPV1-рецепторы представляют собой потенциал независимые кальциевые каналы [24].

При регистрации Ca²⁺-транзиента в нервной терминали, амплитуда которого коррелирует с входом Ca²⁺ в нервное окончание и изменением квантового освобождения медиатора [25], были получены следующие результаты.

Аппликация как агониста (капсаицин, 1 мкМ), так и блокатора (SB 366791, 5 мкМ) TRPV1-рецепторов никак не повлияла на амплитуду Ca²⁺-транзиента (106.7 ± 1.8%; p > 0.05, n = 9 и 101.4 ± 1.3%; p > 0.05, n = 18 соответственно; рис. 6). При исследовании механизма действия АТФ также не было обнаружено значимого изменения в Ca²⁺-транзиенте, амплитуда которого составила 97.6 ± 2.5% (p > 0.05, n = 12; рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые был обнаружен феномен угнетающего влияния капсаицина на процесс спонтанной квантовой секреции АХ из двигательных нервных окончаний и доказано участие TRPV1-рецепторов в этом регуляторном процессе. Впервые в нервно-мышечном синапсе описан эффект применения соединения SB 366791, специфического конкурентного антагониста TRPV1, кото-



Рис. 5. Угнетающее влияние АТФ (АТР; 100 мкМ) на вызванное стимуляцией нерва выделение АХ; отсутствие эффекта АТФ после предварительной аппликации агониста TRPV1-каналов капсаицина (САР; 1 мкМ) и проявление угнетающего действия АТФ после блокады TRPV1-каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ). Панели a, b и с – нативные записи вызванных и мПКП (усредненные по 50 сигналам) в отдельно взятом эксперименте в контроле и после аппликации фармакологических агентов. Панель d –относительное изменение величины квантового состава ПКП (QC), выраженное в процентах от контрольного значения (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. n = 6-7, *p < 0.05 по сравнению с контролем.

рый устраняет эффект капсаицина в более низкой концентрации, чем используемый в ряде работ капсазепин. Впервые показано, что предварительная активация TRPV1-каналов полностью препятствует развитию угнетающего действия АТФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию АХ. Впервые показано, что при инициации исследуемых регуляторных механизмов значимых изменений пресинаптического уровня кальция (Ca²⁺-транзиента) при стимуляции нерва не происходит.

Феномен пуринергической модуляции выделения АХ из двигательной нервной терминали позвоночных установлен достаточно давно [8], относительно хорошо исследован [10, 21, 22], и продолжает изучаться по настоящий момент [26]. Полученные в нашей работе данные об угнетающем влиянии АТФ на процессы спонтанной и вызванной квантовой секреции в нервно-мышечном синапсе *m. LAL* полностью согласуются с данными литературы [21, 22]. Более того, нами получены доказательства наличия и постсинаптического действия АТФ, заключающееся в увеличении времени спада сигналов (как мПКП, так и ПКП). Ранее было доказано, что в основе данного механизма действия АТФ на временные параметры пост-



Рис. 6. Отсутствие влияния агониста TRPV1-каналов капсаицина (CAP; 1 мкМ, n = 9), блокатора данных каналов SB 366791 (SB; 5 мкМ, n = 18) и ATФ (ATP; 100 мкМ, n = 12) на Ca²⁺-транзиент в нервном окончании при стимуляции двигательного нерва. Панели а, b и с – изменения интенсивности флуоресценции ($\Delta F/F_0$) в контроле и после аппликации фармакологических агентов (представлены нативные записи, усредненные по 8 сигналам и зарегистрированные в отдельно взятых экспериментах). Панель d – средние значения и ошибки, выраженные в процентах от контрольного значения амплитуды Ca²⁺-транзиента (по всем экспериментам в серии). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

синаптических сигналов лежит активация экстрасинаптических P2Y1-рецепторов и ингибирование хлорных каналов мембраны мышечного волокна [27].

Возможность участия ваниллоидных рецепторов в регуляции нервно-мышечной нейротрансмиссии у млекопитающих была обнаружена сравнительно недавно и все еще остается слабо изученным феноменом [17, 18]. Так, на препарате диафрагмы мыши было впервые показано угнетающее влияние капсаицина на процесс вызванной нейросекреции АХ, однако какого-либо эффекта агониста ваниллоидных рецепторов на процесс спонтанного квантового выделения медиатора обнаружено не было [18]. В наших же экспериментах получены результаты, подтверждающие наличие данного механизма, угнетающего вызванное высвобождение квантов АХ из нервного окончания. В то же время впервые обнаружено, что капсаицин способен снижать и уровень спонтанного выделения АХ, причем данный эффект агониста полностью устранялся селективным конкурентным антагонистом TRPV1-каналов SB 366791.

Обнаружение факта снижения спонтанной секреции АХ при активации TRPV1каналов в препарате *m. LAL*, в отличие от препарата диафрагмы, свидетельствует о наличии некоторых функциональных особенностей синаптических контактов в разных препаратах. Вероятно, эти особенности и накладывают свой отпечаток на то, что выраженность эффектов АТФ на процессы как спонтанной, так и вызванной секреции АХ несколько ниже, чем в синапсах диафрагмы [21, 22].

Схожесть во влиянии $AT\Phi$ и капсаицина (угнетение обеими фармакологическими агентами процессов как спонтанной, так и вызванной секреции AX) может свидетельствовать о возможном наличии общего звена в путях пуринергической и TRPV1-опосредованной регуляции процессов нейросекреции AX. В настоящем исследовании получены данные, демонстрирующие, что эффект ATФ как на спонтанную, так и на вызванную секрецию AX отсутствует при предварительной аппликации агониста TRPV1-рецепторов, но сохраняется при блокаде последних селективным антагонистом. Эти результаты позволяют нам заключить: в механизмах, запускаемых активацией как TRPV1-рецепторов, так и пуринорецепторов, имеет место наличие одного общего звена, которое отвечает за снижение количества выделяемых квантов AX.

В качестве такой мишени могли бы выступить молекулы, тем или иным образом влияющие на метаболизм кальция в нервном окончании. Это могут быть как потенциал-чувствительные кальциевые каналы [12, 28], так и внутриклеточные кальциевые депо [29]. Методика регистрации Ca²⁺-транзиента в нервном окончании как раз и позволяет нам фиксировать изменения интегрального внутриклеточного кальция. Ранее на нейронах крысы было установлено, что активация Р2У-рецепторов приводит к уменьшению входа ионов кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы N типа [30]. О снижении входа кальция в нервное окончание под действием $AT\Phi$ свидетельствуют и данные, полученные на нервно-мышечном синапсе лягушки [10, 12]. В свою очередь, TRPV1-каналы проявляют довольно большую селективность к Ca²⁺ и участвуют в регуляции содержания Ca²⁺ в цитозоле клетки [24, 31]. Кроме того, было высказано предположение, что кальций, входящий через TRPV1-каналы в двигательном нервном окончании, способен изменять уровень мембранного PIP2 и приводить, таким образом, к уменьшению уровня выделения АХ [18]. В наших же экспериментах какого-либо изменения интегрального кальция обнаружено не было ни при аппликации $AT\Phi$, ни при добавлении капсаицина. Исходя из эти данных, можно предположить, что эффекты активации TRPV1-рецепторов обусловлены увеличением базового уровня кальция, а не кальция, входящего при стимуляции двигательного нерва. Входящий через TRPV1-каналы кальций, в свою очередь, может приводить к активации кальций-зависимых белков, таких как кальмодулин и кальцинейрин, которые, как было установлено ранее, участвуют в механизмах снижения уровня выделения АХ [21, 32, 33]. В то же время подавляющий нейротрансмиссию эффект АТФ можно объяснить активацией метаботропных Р2У-рецепторов, которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в изменение входа Ca²⁺ через потенциал-чувствительные кальшиевые каналы и выделение Ca^{2+} из депо. При этом имеет место активация той же конечной мишени, регулирующей процесс экзоцитоза синаптических везикул, что и при активации TRPV1-каналов. И в данном случае, в качестве такой мишени может выступать кальмодулин, поскольку показано, что при ингибировании этого белка опосредованный активацией Р2У-рецепторов угнетающий эффект AT Φ на выделение AX полностью отсутствует [20].

Возможное физиологическое значение механизмов регуляции, запускаемых при активации пуриновых и ваниллоидных рецепторов, наиболее вероятно заключается в модуляции процесса нейросекреции АХ по принципу обратной отрицательной связи. Поскольку при квантовом выделении АХ в синаптической щели увеличивается концентрация как АТФ [8], так и протонов [34], то увеличивается и вероятность активации как пуринорецепторов, так и TRPV-каналов. Как следствие этого – снижение уровня выделения последующих порций медиатора. Кроме того, недавно было установлено, что TRPV1-рецепторы участвуют в реализации симпатической регуляции выброса AX в периферических нервных окончаниях мыши [35].

Таким образом, в нервно-мышечном синапсе млекопитающих, наряду с ранее установленным пуринергическим путем регуляции AX, имеет место и механизм модуляции нейросекреции, опосредованный активацией TRPV1-каналов. Запуск этих механизмов приводит к угнетению процессов как спонтанного, так и вызванного выделения квантов AX из двигательного нервного окончания. При этом продемонстрировано, что оба этих механизма регуляции не сопровождаются изменением Ca²⁺-транзиента в нервном окончании и имеют общее звено. На роль такого звена может претендовать белок кальмодулин, однако это еще необходимо проверить экспериментально в будущем.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00490, обработка флуоресцентных изображений выполнена при финансировании в рамках гос. задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Ю.А. и Д.В.С.), сбор данных (А.Ю.А., Н.В.Ж.), обработка данных (А.Ю.А., Н.В.Ж.), написание и редактирование манускрипта (А.Ю.А., А.И.М. и Д.В.С).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Fagerlund M.J., Eriksson L.I. (2009) Current concepts in neuromuscular transmission. Br. J. Anaesth. 103: 108–114. https://doi.org/10.1093/bja/aep150
- Petrov K.A., Nikolsky E.E., Masson P. (2018) Autoregulation of acetylcholine release and micropharmacodynamic mechanisms at neuromuscular junction: Selective acetylcholinesterase inhibitors for therapy of myasthenic syndromes. Front. Pharmacol. 9: 1–8. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00766
- 3. *Kilbinger H.* (1996) Modulation of acetylcholine release by nitric oxide. Prog. Brain. Res. 109: 219–224.

https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62105-6

- 4. Datar P., Srivastava S., Coutinho E., Govil G. (2005) Substance P: Structure, Function, and Therapeutics. Curr. Top. Med. Chem. 4: 75–103. https://doi.org/10.2174/1568026043451636
- 5. *Pinard A., Lévesque S., Vallée J., Robitaille R.* (2003) Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. Eur. J. Neurosci. 18: 3241–3250. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03028.x
- Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Lieberman E.M., Sherman J.A., Lubischer J.L., Grossfeld R.M., Urazaev A.K. (2005) Effect of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) on non-quantal and spontaneous quantal release of acetylcholine at the neuromuscular synapse of rat. J. Neurochem. 94: 257–267.

https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03194.x

 Ribeiro J.A., Cunha R.A., Correia-de-Sa P., Sebastiao A.M. (1996) Purinergic regulation of acetylcholine release. Prog. Brain Res. 109: 231–241. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62107-x

- 8. *Burnstock G.* (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol. Rev. 87: 659–797.
- https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006 9. *Surprenant A., North R.A.* (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. Annu. Rev. Physiol. 71: 333–359.
- https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630
- Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., Giniatullin R. (2005) Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. Eur. J. Neurosci. 21: 1271–1279.
 - https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03976.x
- 11. *Ginsborg B.L., Hirst G.D.S.* (1972) The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. J. Physiol. 224: 629–645. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009916
- Khaziev E.F., Samigulin D.V., Tsentsevitsky A.N., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. (2018) ATP Reduces the Entry of Calcium Ions into the Nerve Ending by Blocking L-type Calcium Channels. Acta Naturae. 10: 93–96. https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-2-93-96
- Tominaga M., Wada M., Masu M. (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 6951–695. https://doi.org/10.1073/pnas.111025298
- Morales-Lázaro Sara L., Simon Sidney A., Rosenbaum T. (2013) The role of endogenous molecules in modulating pain through TRPV1. J. Physiol. 591: 3109–3121. https://doi.org/10.1113/jphysiol.201
- Lishko P.V., Procko E., Jin X., Phelps C.B., Gaudet R. (2007) The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. Neuron. 54: 905–918. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027
- 16. Fernández-Carvajal A., Fernández-Ballester G., Devesa I., González-Ros J.M., Ferrer-Montiel (2011) New strategies to develop novel pain therapies: Addressing thermoreceptors from different points of view. Pharmaceuticals. 5: 16–48. https://doi.org/10.3390/ph5010016
- Thyagarajan B., Krivitskaya N, Potian J.G., Hognason K., Garcia C.C., McArdle J.J. (2009) Capsaicin protects mouse neuromuscular junctions from the neuroparalytic effects of botulinum neurotoxin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 331: 361–371. https://doi.org/10.1124/jpet.109.156901
- Thyagarajan B., Potian J.G., Baskaran P., McArdle J.J. (2014) Capsaicin modulates acetylcholine release at the myoneural junction. Eur. J. Pharmacol. 744: 211–219. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.044
- Martin A.R. (1976) The effect of membrane capacitance on non-linear summation of synaptic potentials. J. Theor. Biol. 59: 179–187. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(76)80031-8
- Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Sudakov I.A., Bukharaeva E.A, Nikolsky E.E. (2017) Calcium Transient Registration in Response to Single Stimulation and During Train of Pulses in Mouse Neuromuscular Junction. Bionanoscience. 7: 162–166. https://doi.org/10.1007/s12668-016-0318-6
- De Lorenzo S., Veggetti M., Muchnik S., Losavio A. (2006) Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. Neuroscience. 142: 71–85. 2006. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.05.062
- Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Švandová I., Grishin S.N., Vyskočil F. (2001) ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. Eur. J. Neurosci. 13: 2047–2053. 2001. https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01582.x
- 23. *Augustine G.J.* (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? Curr. Opin. Neurobiol. 11: 320–326.
 - https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00214-2
- 24. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M, Rosen T.A., Levine J.D, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature. 389: 816–824. https://doi.org/10.1038/39807
- Samigullin D.V., Zhilyakov N.V., Khaziev E.F., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. (2018) Calcium Transient and Quantal Release in Mouse Neuromuscular Junction Under Extracellular Calcium Concentration Change. Bionanoscience. 8: 984–987. https://doi.org/10.1007/s12668-018-0558-8
- 26. Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Hoyle C.H.V., Grishin S.N. (2020) Modulatory roles of ATP and adenosine in cholinergic neuromuscular transmission. Int. J. Mol. Sci. 21: 1–15. https://doi.org/10.3390/ijms21176423

- Voss A.A. (2009) Extracellular ATP inhibits chloride channels in mature mammalian skeletal muscle by activating P2Y1 receptors. J. Physiol. 587: 5739–5752. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179275
- Gaydukov A.E., Melnikova S.N., Balezina O.P. (2009) Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels. Bull. Exp. Biol. Med. 148: 163–166. https://doi.org/10.1007/s10517-009-0678-9
- Khuzakhmetova V.F., Samigullin D.V., Bukharaeva E.A. (2014) The role of presynaptic ryanodine receptors in regulation of the kinetics of the acetylcholine quantal release in the mouse neuromuscular junction. Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 8: 144–152. https://doi.org/10.1134/S199074781305005X
- 30. Filippov A.K., Brown D.A., Barnard E.A. (2000) The P2Y1 receptor closes the N-type Ca2+ channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. Br. J. Pharmacol. 129: 1063–1066. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703185
- Marshall I.C.B., Owen D.E., Cripps T.V., Davis J.B., McNulty S., Smart D. (2003) Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. Br. J. Pharmacol. 138: 172–176. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705003
- Tarasova E.O., Gaydukov A.E., Balezina O.P. (2018) Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission. Biochem. 83: 674–689. https://doi.org/10.1134/S0006297918060056
- Ando K., Kudo Y., Aoyagi K., Ishikawa R., Igarashi M., Takahashi M. (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. Brain Res. 1535: 1–13.
 - https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.018
- 34. Zhang Z., Nguyen K.T, Barrett E.F., David G. (2010) Vesicular ATPase Inserted into the Plasma Membrane of Motor Terminals by Exocytosis Alkalinizes Cytosolic pH and Facilitates Endocytosis. Neuron. 68: 1097–1108. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.035
- Rodrigues A.Z.C., Wang Z.M., Messi M.L., Delbono O. (2019) Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca 2+ channels. Mol. Cell. Neurosci. 95: 59–70. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.01.007

Interaction of the Mechanisms of Suppression of the Acetylcholine Quantal Release at the Activation of Vanilloid (TRPV1) and Purine Receptors in the Mouse Neuromuscular Junction

A. Y. Arkhipov^a, N. V. Zhilyakov^a, A. I. Malomouzh^a, and D. V. Samigullin^{a, b, *}

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

> ^bFederal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tupolev Kazan National Research Technical University–KAI", Kazan, Russia *e-mail: samid75@mail.ru

The main goal of the study was to analyze the relationship between the signaling pathways of the regulation of acetylcholine (ACh) quantal release in the peripheral synapse triggered by the activation of vanilloid (TRPV1) and purine receptors. In electrophysiological experiments carried out at the neuromuscular synapses of the *m. Levator Auris Longus*, it was found that the frequency of miniature endplate potentials (mEPPs) and the quantal content of endplate potentials (EPPs) decrease in the presence of TRPV1 agonist capsaicin. This effect was completely reversed by SB 366791, a specific competitive antagonist of TRPV1 receptors. ATP, like capsaicin, decreased the frequency of mEPPs and the EPP quantal content. Against the background of the TRPV1 antagonist, the inhibitory effect of ATP on ACh secretion was realized in full. At the same time, against the background of TRPV1 channels activation by capsaicin, the effect of ATP on both spontaneous and evoked ACh release was absent. It was suggested that the mechanisms of action of ATP and capsaicin may be associated with a change in Ca²⁺ entry into the nerve ending. To test this hypothesis, experiments were carried out to assess the changes in the presynaptic calcium level (Ca^{2+} transient) using a fluorescent calcium dye upon nerve stimulation. The amplitude of the calcium transient did not change either with the application of ATP or with the addition of capsaicin. Thus, in the neuromuscular synapse of mammals, along with purinergic pathway of ACh secretion regulation, there is also a mechanism of neurosecretion modulation mediated by the activation of TRPV1 channels. The triggering of these mechanisms leads to the suppression of the processes of both spontaneous and evoked release of ACh quanta from the motor nerve endings. It was demonstrated that both pathways of regulation are not accompanied by a change in the Ca^{2+} transient, but have a common link of regulation of the quantal neurosecretion.

Keywords: neuromuscular junction, acetylcholine, TRPV1 receptor, calcium transient, ATP, neurosecretion