На правах рукописи

КРАВЦОВА

Виолетта Васильевна

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

03.03.01 – физиология

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена на кафедре общей физиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

Научный консультант:
Кривой Игорь Ильич, доктор биологических наук, профессор кафедры общей физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

Официальные оппоненты:
Юрий Петрович Герасименко, член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии движения, ФГБУН Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН.
Денис Борисович Тихонов, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов, ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.
Ольга Сергеевна Тарасова, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация – ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН.

Защита состоится " _____ " _____ 2018 г. в " ____ " часов на заседании Диссертационного совета Д 212.232.10 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, ауд. 90.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. А.М. Горького ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, а также на сайте Санкт-Петербургского государственного университета: https://disser.spbu.ru/disser/soiskatelyu-uchjonoj-stepeni/dis-list/details/14/1640.html

Автореферат разослан " ___ " _____ 2018 года

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор Н.П. Алексеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Двигательная активность, обеспечиваемая скелетной мускулатурой, является важным фактором полноценного качества жизни (Gerasimenko et al., 2016; Radak et al., 2016). При интенсивной двигательной активности происходит снижение трансмембранных градиентов Na^+ и K^+, что может привести к нарушениям в пресинаптическом и мышечном звеньях нервно-мышечной передачи, снижению работоспособности и утомлению (Matyushkin et al., 1995; Sejersted, Sjøgaard, 2000; Clausen, 2003; 2015; DiFranco et al., 2015). Среди механизмов поддержания мышечного электрогенеза и сократительной функции (Kristensen, Juel, 2010; Matchkov, 2010; Shestopalov et al., 2017) важнейшую роль играет активность Na,K-АТФазы. Эта ферментная система, открытая д-ром J. Skou (Skou, 1957) (Нобелевская премия по химии 1997 г.), является интегральным белком, поддерживающим трансмембранные градиенты Na^+ и K^+ за счет их активного транспорта, что обеспечивает электрогенез, возбудимость, а также ряд сопряженных транспортных механизмов клетки (Blanco, Mercer, 1998; Mobasheri et al., 2000; Sejersted, Sjogaard, 2000; Clausen et al., 2017). Скелетные мышцы содержат основной пул Na,K-АТФазы, плотность распределения которой в сарколемме достигает 1000 – 3350/мкм^2, благодаря чему этот пул Na,K-АТФазы чрезвычайно важен для поддержания калиевого гомеостазиса всего организма (Clausen, 2003).

Na,K-АТФаза состоит из α-субъединицы, выполняющей каталитическую и транспортную функции, β-субъединицы, в основном функционирующей в качестве шаперона, а также включает ассоциированный белок семейства FXYD, являющийся модулятором активности фермента (Mijatovic et al., 2007; Pirkmajer, Chibalin, 2016; Clausen et al., 2017). Внеклеточные участки α-субъединицы Na,K-АТФазы формируют специфический сайт связывания (рецептор) для кардиотонических стероидов являющихся ингибиторами Na,K-АТФазы и имеющих эндогенные циркулирующие аналоги (Mijatovic et al., 2007; Bagrov et al., 2009; Lingrel, 2010; Blaustein, 2017).

Na,K-АТФаза экспрессируется в различных молекулярных формах. Для млекопитающих известны четыре изоформы α-субъединицы (α1 – α4), три изоформы β-субъединицы Na,K-АТФазы, а также семь белков семейства FXYD (Blanco, Mercer, 1998; Pirkmajer, Chibalin, 2016; Clausen et al., 2017), что обеспечивает широкое молекулярное и функциональное разнообразие Na,K-АТФазы. Клетки большинства тканей, помимо изоформы α1, выполняющей основную насосную функцию, экспрессируют также одну из изоформ α2 – α4,

которые выполняют специфические для данной клетки функции.

Важно, что функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы обусловлена не только её молекулярным разнообразием, но также специфической мембранной локализацией, особенностями регуляции и взаимодействием с белковым и липидным окружением (обзоры: Кривой, 2014; Matchkov, Krivoi, 2016). Благодаря ряду структурных доменов Na,K-АТФаза участвует в качестве скаффолда в формировании функциональных мультимолекулярных комплексов, за счет чего достигается регуляция самых разнообразных свойств клетки, реализуется модуляция самой Na,K-АТФазы и её сигнальная функция (Крылов и др., 1999; Xie, Askari, 2002; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007; Reinhard et al., 2013).

В скелетных мышцах ко-экспрессируются α1- и α2-изоформы Na,K-АТФазы, физиологическая роль, особенности локализации и функционирования которых являются предметом интенсивного изучения (Кривой, 2012; Matchkov, Krivoi, 2016; Pirkmajer, Chibalin, 2016; Kutz et al., 2018). К наиболее принципиально важным и нерешенным относятся следующие вопросы.

1. Хотя фракция α2-изоформы доминирует и достигает 87% от общего количества Na,K-АТФазы в скелетной мышце (Orlowski, Lingrel, 1988; He et al., 2001), она в покое малоактивна и базовую насосную функцию в основном выполняет α1-изоформа (Krivoi et al., 2003; Heiny et al., 2010). Однако показана важная роль локализованного в Т-системе пула α2-изоформы в поддержании мышечной работоспособности при интенсивной нагрузке, когда происходит накопление K^+ в узких пространствах Т-системы (Radzyukevich et al., 2013; DiFranco et al., 2015). Особенности локализации, функционирования и регуляции α2-изоформы Na,K-АТФазы в постсинаптической области мембраны (концевая пластинка) не исследованы.

2. Выявлены функциональные и межмолекулярные взаимодействия между Na,K-АТФазой и белками (рецепторы, транспортеры и др.), вовлеченными в регуляцию синаптической функции (Hazelwood et al., 2008; Matos et al., 2013; Illarionava et al., 2014), включая взаимодействие с никотиновыми холинорецепторами (Кривой и др., 2004; Park et al., 2010; Bao et al., 2015; Matchkov, Krivoi, 2016), механизм которого требует специального анализа.

3. Роль холестерина в компартментализации, стабилизации и регуляции Na,K-АТФазы изучена достаточно подробно (Chen et al., 2011; Haviv et al., 2013; Cornelius et al., 2015), однако изоформ-специфичность этих взаимодействий во многом остается неясной и исследована в основном на экспрессионных клеточных системах (Lifshitz et al., 2007; Kapri-Pardes et al.,

2011). На скелетной мышце подобные исследования не проводили.

4. Немногочисленные данные свидетельствуют об изоформ-специфичности влияния двигательной активности в отношении Na,K-АТФазы и в основном касаются долговременных нарушений, связанных с травмами и возрастом (Clausen, 2013; Wyckelsma, McKenna, 2016). Только начинает изучаться функционирование Na,K-АТФазы в скелетных мышцах гибернирующих животных (Guo et al., 2017). Факты серьезных нарушений в постуральных мышцах в ходе космического полета (гравитационная, двигательная разгрузка) (Шенкман,2016: Kozlovskaya et al., 1988) также настоятельно требуют подобных исследований, причем, с точки зрения поиска ключевых сигнальных событий, запускающих атрофическую программу, особый интерес представляет начальный этап двигательной разгрузки (Vilchinskaya et al., 2017).

5. Ультраструктура концевой пластинки пластична и ее нарушения наблюдаются после продолжительной двигательной разгрузки при возрастных изменениях, миодистрофии и других формах мышечной патологии (Nishimune et al., 2014; Tintignac et al., 2015; Rogers, Nishimune, 2017); структурные изменения на начальных этапах двигательной дисфункции не изучены.

6. Хорошо известна изоформ-специфичность регуляции α2-изоформы Na,K-АТФазы скелетных мышц тиреоидными гормонами, инсулином, глюкокортикоидами и др. Однако лишь единичные исследования посвящены изучению эффектов эндогенных кардиотонических стероидов в скелетных мышцах (Radzyukevich et al., 2009), хотя этот вопрос детально разработан в отношении сердечной и гладкой мышц (Blaustein et al., 2016).

Цель настоящей работы – исследование функционального разнообразия Na,K-АТФазы в скелетной мышце, основанного на особенностях локализации, регуляции и функциональных взаимодействий с молекулярным окружением α1- и α2-изоформ ее α-субъединицы.

Основные задачи исследования:

1) Исследовать особенности локализации α2-изоформы Na,K-АТФазы в области концевой пластинки и её функционального взаимодействия с никотиновыми холинорецепторами.

2) Исследовать возможность влияния циркулирующего никотина на функционирование Na,K-АТФазы в скелетной мышце.

3) Изучить возможность функционального взаимодействия между α2-изоформой Na,K-АТФазы и мембранным холестерином.

4) Исследовать изоформ-специфичность влияния двигательной разгрузки в отношении Na,K-АТФазы в период, предшествующий развитию атрофии.

5) Исследовать возможность структурных нарушений концевой пластинки на ранних этапах двигательной разгрузки.

6) Проверить возможность регуляции сократительной функции скелетной мышцы кардиотоническими стероидами в концентрациях, соответствующих уровню их циркулирующих эндогенных аналогов.

Положения, выносимые на защиту:

1) Особенностью распределения и функционирования α2-изоформы Na,K-АТФазы является локализация одного из её пулов в области концевой пластинки и участие в специализированном физиологическом механизме поддержания постсинаптического электрогенеза.

2) Изоформ-специфичность α2-изоформы Na,K-АТФазы проявляется в её функциональных взаимодействиях с никотиновыми холинорецепторами и мембранным холестерином, специфической зависимости от двигательной активности, а также в регуляции мышечного сокращения кардиотоническими стероидами.

3) В скелетной мышце α1-изоформа Na,K-АТФазы функционально стабильна по сравнению с α2-изоформой, адаптационная пластичность которой определяется изоформ-специфичностью локализации и регуляции её различных пулов, а также функциональных взаимодействий с молекулярным окружением.

Научная новизна. Новизна данной работы заключается в первой попытке комплексного исследования функционального разнообразия Na,K-АТФазы в скелетной мышце, основанного на особенностях локализации и механизмов регуляции, а также функциональных взаимодействий с молекулярными партнерами изоформ α-субъединицы этого белка.

Впервые выявлена специфика локализации α2-изоформы Na,K-АТФазы в области концевой пластинки, где эта изоформа функционально взаимодействует с никотиновыми холинорецепторами и мембранным холестерином, что лежит в основе физиологического механизма поддержания потенциала покоя постсинаптической мембраны. Впервые установлены особенности этих взаимодействий: модулирующим сигналом для α2-изоформы Na,K-АТФазы является конформационный переход никотиновых холинорецепторов в состояние десенситизации; получены доказательства реципрокного взаимодействия между α2-изоформой и холестерином липидных плотиков (рафтов). При исследовании начального периода двигательной разгрузки скелетной мышцы впервые выявлен ряд структурно-функциональных перестроек. Установлен адаптационный характер функциональных изменений α2-изоформы Na,K-АТФазы; эти изменения проявляются по-разному для постсинаптического и внесинаптического пулов α2-изоформы без нарушения

её локализации в сарколемме. Наблюдаемые изменения сопровождаются дестабилизацией липид-упорядоченной фазы сарколеммы за счет частичной утраты мембранного холестерина, а также нарушениями распределения никотиновых холинорецепторов и структуры концевых пластинок. Получено подтверждение возможности участия α2-изоформы Na,K-АТФазы в регуляции сократительной функции скелетной мышцы эндогенными кардиотоническими стероидами. Проведенный комплексный анализ свидетельствует о функциональной пластичности α2-изоформы Na,K-АТФазы по сравнению с функционально стабильной α1-изоформой.

Научно-теоретическое и практическое значение. Выяснение функциональной специализации разных молекулярных форм одного и того же белка является важной теоретической и практической задачей современной физиологии. Именно на выявлении таких новых механизмов физиологических функций основаны современные стратегии поиска эффективных лекарственных препаратов и путей профилактики и коррекции различных патологических состояний. Данное исследование направлено на разработку этой проблемы на примерах молекулярного и функционального разнообразия транспортного белка Na,K-АТФазы. Этот белок является витальным, нарушения функционирования которого приводят к тяжелым последствиям вплоть до смертельного исхода.

Выявленный в данной работе принцип регуляции за счет функционального взаимодействия α2-изоформы Na,K-АТФазы с никотиновыми холинорецепторами и холестерином применим также для анализа эффективности синаптических связей и молекулярного разнообразия Na,K-АТФазы в ЦНС. Этот принцип важен для более глубокого понимания механизмов побочных эффектов применяемых в клинике антихолинэстеразных препаратов, при отравлении такими веществами, а также для изучения механизмов никотиновой зависимости и интоксикации. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых методов профилактики и коррекции двигательных расстройств при травмах, возрастных нарушениях, в авиационной и космической медицине (проблемы адаптации к гравитационной разгрузке). Выявленное влияние сверхнизких концентраций кардиотонических стероидов на сократительную функцию скелетной мускулатуры следует учитывать при использовании этих препаратов в клинике сердечно-сосудистых заболеваний.

Результаты могут быть использованы академическими и медицинскими учреждениями, а также университетами и научно-исследовательскими институтами, могут быть востребованы при написании учебников, учебных

пособий и руководств; при подготовке диссертаций и курсов лекций для студентов бакалавриата и магистратуры.

Апробация работы. Материалы исследований доложены и обсуждены на российских и международных конференциях: 12th International ATPase Conference «Na,K-ATPase and Related Transport ATPases of P-type: Structures, Mechanisms, and Roles in Health and Disease» (Denmark, 2008); International Symposium «Biological Motility» (Pushchino, 2008; 2010); 17th IAA Humans in Space Symposium (Moscow, 2009); PENS Summer Course «Contemporary problems of Neurobiology: Molecular mechanisms of synaptic plasticity» (Kazan, 2007); 6-я Всероссийская с международным участием Школа-конференция «Системные и клеточные механизмы в физиологии двигательной системы и мышечной деятельности» (Москва, 2011); 14th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases: Structure, Mechanism, Cell Biology, Health and Disease (The Netherlands, 2014), 10th и 11th International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for Medicine and Psychology» (Sudak, Crimea, 2014; 2015); Съезды Физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва, 2007; Калуга, 2010; Волгоград, 2013; Воронеж, 2017).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 25 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 20 входят в международные базы научного цитирования Web of Science Core Collection и Scopus; 5 статей в других изданиях; 27 публикаций в сборниках тезисов – всего 57 работ.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные на защиту, получены лично диссертантом или при его непосредственном участии. Автором определены цель, задачи и направления исследования, осуществлены организация и проведение экспериментов, обработка и анализ данных и их интерпретация, подготовка к публикации статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация объемом 236 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных результатов и их обсуждения, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 416 наименований (37 отечественных и 379 зарубежных источников). Диссертация иллюстрирована 62 рисунками и 3 таблицами.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 07-04-01027а; 10-04-00970а, 13-04-00973а, 16-04-00562а, а также грантами СПбГУ №№ 1.0.133.2010, 1.37.118.2011, 1.38.231.2014.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной и камбаловидной мышц самцов крыс линии Вистар, мышей линий C57Bl/6 и mdx, а также Монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*). Условия содержания животных и приемы работы с ними соответствовали нормам российского законодательства, а также рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773. В работе использовали проаэрированные (95% O_2 + 5% CO_2) физиологические растворы, содержащие (в мМ): 137 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 24 $NaHCO_3$, 1 NaH_2PO_4, 11 глюкоза, pH 7.4. Растворы приготовляли на основе бидистиллированной воды из реактивов фирмы Sigma.

Электрофизиологические исследования и механография. Мембранный потенциал покоя (МПП), потенциалы действия и входное сопротивление мембраны регистрировали внутриклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов с внутренними капиллярами (BF150-110-10, Sutter Instrument, Co., USA), изготовленных на микрокузнице Sutter P-97 (Sutter Instrument, Co., USA) как описано ранее (Krivoi et al., 2006), под контролем бинокулярного микроскопа PZMTIII (WPI). Мышечные сокращения регистрировали в изометрическом режиме при помощи механотрона FT03 C (Grass Instrument Co, USA) и стимулятора Isostim A320 (WPI). Регистрируемые ответы оцифровывались с частотой квантования 44000/с (электрофизиологические исследования) и 5000/с (механография), далее ответы хранились и анализировались на персональном компьютере.

Конфокальная микроскопия. Для определения локализации никотиновых холинорецепторов (нХР) и α2-изоформы Na,K-АТФазы использовали соответственно α-бунгаротоксин (α-БТХ) (tetramethylrhodamine-α-bungarotoxin, Biotium, USA) и уабаин, меченый специфической флуоресцентной меткой BODIPY (Ouabain-Bodipy, Invitrogen) (Heiny et al., 2010). Распределение липидных плотиков оценивали с помощью субъединицы B холерного токсина (CTxB), конъюгированной с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Fujinaga et al., 2003; Margheri et al., 2014). Для исследования липид-упорядоченной фазы плазматической мембраны также применяли флуоресцентные стеролы: 22-NBD-холестерин (22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3β-Ol, Molecular Probes) (Loura et al., 2001; Ostašov et al., 2013) и дигидроэргостерол (ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, Sigma Aldrich) (Hao et al., 2002; Gallegos et al., 2004; McIntosh et al., 2008). Использовали конфокальную систему Leica TCS SP5 или микроскоп Olympus

BX51WI с конфокальной установкой Disk Speed Unit. Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ.

Методом ПЦР в режиме реального времени с использованием Taq-Man probe (FAM) определяли количество мРНК, кодирующей α1- и α2-изоформы Na,K-АТФазы. РНК выделяли с использованием Mini kit (QIAGEN). Реакцию проводили с использованием обратной транскриптазы III (Invitrogen), SUPERase (Ambion) и специфических праймеров для α1- и α2-изоформ (Applied Biosystems) на аппарате MX3000P (Agilent Technologies).

Вестерн-блот анализ использовали для определения количества белка α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы в общем гомогенате мышц (Matchkov et al., 2012). Для распределения белков с помощью электрофореза использовали 10% Трис глициновый гель (Bio-rad, USA). Далее белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, Life Sciences, USA). Использовали поликлональные антитела: козьи против α1-изоформы Na,K-АТФазы (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), кроличьи против α2-изоформы (EMD Millipore) в разведении 1:2000. В качестве контроля использовали пан-актин (Cell Signaling Technology) в разведении 1:1000. Связанные антитела проявлялись с помощью усовершенствованного набора хемилюминесценции (ECL; GE Healthcare). Количественный анализ проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health). Разница в экспрессии белков между пробами нормализовалась по отношению к экспрессии пан-актина.

Методом пламенной фотометрии измеряли внутриклеточную концентрацию ионов натрия и калия (FLM3, Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Двигательная (функциональная) разгрузка задних конечностей. Применяли метод антиортостатического вывешивания задних конечностей по Новикову–Ильину в модификации, широко используемой в качестве лабораторной модели гравитационной и двигательной разгрузки (Morey-Holton et al., 2005). В этой модели фиксирование производится за хвост, который крепится к ползунку на растяжке вверху клетки, животное может беспрепятственно передвигается только на передних конечностях, имея свободный доступ к корму и воде. При этом сразу и полностью снимается весовая нагрузка на задние конечности и наблюдается отсутствие электромиограммы в камбаловидной мышце крысы в течение первых суток разгрузки с постепенным восстановлением в последующий период (Kawano et al., 2004; De-Doncker et al., 2005).

Хроническое действие никотина. При исследовании хронического действия никотина использовали три различных метода с применением протоколов, описанных ранее: метод локальной доставки никотина к скелетной

мышце в течение 3-х суток с помощью нетоксичных силиконовых имплантатов (Connold et al., 1997); подкожные инъекции раствора никотина (Wang et al., 1994; Mayhan et al., 2010) в течение 14 – 21 суток; метод потребления никотина с питьевой водой (Larsson et al., 1988; Sparks, Pauly, 1999; Brunzell et al., 2003) в течение 21 – 31 суток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ ORIGIN 6.1., Microsoft Excel, GraphPad Prizm5. В тексте и на рисунках приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. Достоверность различия оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при условии нормального распределения в выборках, либо однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (программное обеспечение ORIGIN 6.1). Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения и достоверности различия кумулятивных кривых.

Основные эксперименты проведены на базе кафедры общей физиологии и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета. Частично эксперименты проведены совместно с д.б.н. А.М. Петровым на базе кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета (зав. чл.-корр. РАН А.Л. Зефиров), а также совместно с д-рами В.В. Мачковым и Е.В. Бузиновой на базе Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Локализация и функционирование α2-изоформы Na,K-АТФазы в концевой пластинке

Данная часть работы базируется на следующих предпосылках. Во-первых, установлено, что концентрация ацетилхолина (АХ), освобождающегося в неквантовом виде, достигает в синаптической щели десятков наномолей, за счет чего возникает дополнительная локальная гиперполяризация (surplus polarization) мембраны в области концевой пластинки (Vyskocil et al., 1983; Nikolsky et al., 1994). Предполагается, что этот эффект неквантового АХ имеет важное физиологическое значение при формировании синаптического контакта и способствует поддержанию постсинаптического электрогенеза скелетных мышечных волокон (Маломуж, Никольский, 2010; Vyskocil et al., 2009). Как установлено работами акад. Е.Е. Никольского и соавторов, локальная гиперполяризация возникает за счет активации электрогенного Na,K-насоса (Vyskocil et al., 1983; Nikolsky et al., 1994), однако механизм этого эффекта и его

изоформ-специфичность не были изучены. Во-вторых, исследования на мембранных препаратах из электрического органа *Torpedo* и данные ко-иммунопреципитации позволяют предположить существование не только прямой молекулярной, но и функциональной связи между нХР и Na,K-АТФазой (Krivoi et al., 2006; Heiny et al., 2010; Chibalin et al., 2012).

Локализация α2-изоформы Na,K-АТФазы. В наших опытах при исследовании локализации α2-изоформы Na,K-АТФазы в диафрагмальной мышце мыши C57Bl/6 и в камбаловидной мышце крысы установлено, что сигналы от меченого α-BTX (красный канал, нХР) и Ouabain-Bodipy (зеленый канал, α2-изоформа) сконцентрированы в области концевой пластинки и совпадают при наложении. В обеих мышцах наблюдается локальная гиперполяризация постсинаптической мембраны величиной 3 – 4 мВ (рис. 1 А, Б). Аналогичная локализация нХР и α2-изоформы отмечена нами и в диафрагмальной мышце мыши mdx (не показано).

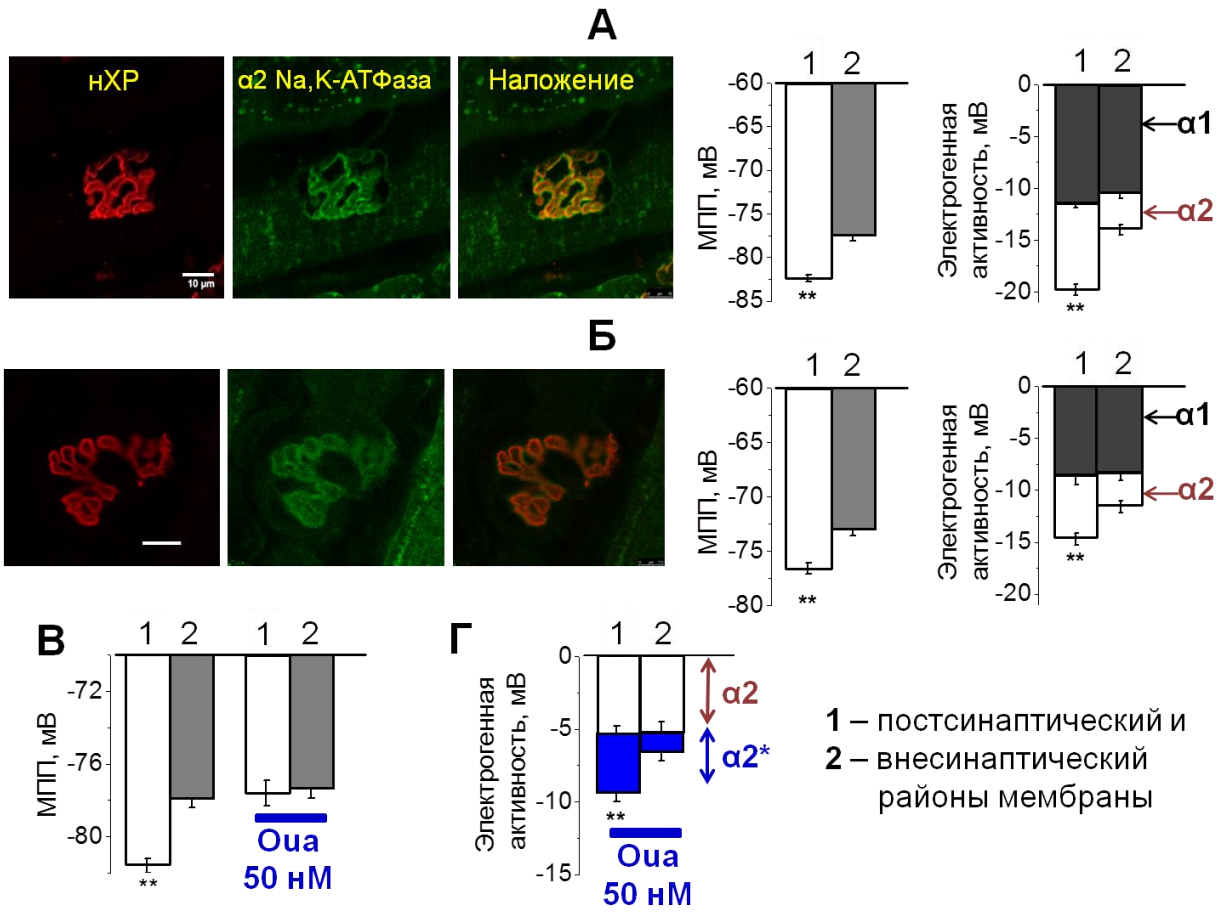

Рис. 1. Особенности локализации и функционирования α2-изоформы Na,K-АТФазы в концевой пластинке. А и **Б** – Распределение никотиновых холинорецепторов, меченых α-BTX (красный канал), и α2-изоформы, меченой Ouabain-Bodipy (зеленый канал), в концевых пластинках диафрагмальной мышцы мыши C57Bl/6 (А) и камбаловидной мышцы крысы (Б). Масштаб: 10 мкМ. Графики справа – соответствующие величины МПП и электрогенной

активности α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы в разных районах мембраны. **В** и **Г** – Влияние 50 нМ уабаина на МПП и электрогенную активность α1- и α2-изоформ в диафрагмальной мышце крысы. Синие столбцы – величина электрогенной активности (мВ), блокируемая 50 нМ уабаина. **1** и **2** – соответственно, постсинаптический и внесинаптический районы мембраны. **p < 0.01 – различие между указанными районами мембраны.

Для оценки электрогенной активности α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы мы использовали электрофизиологический анализ констант их блокирования уабаином. Как ранее установлено, в скелетной мышце уабаин в концентрации 1 мкМ селективно подавляет уабаин-чувствительную α2-изоформу, для подавления уабаин-резистентной α1-изоформы требуется 500 мкМ уабаина (Krivoi et al., 2003). Проведенный нами анализ показал, что локальная гиперполяризация постсинаптической мембраны является следствием повышенной электрогенной активности именно α2-изоформы, активность α1-изоформы в разных районах мембраны не различается (рис. 1 А, Б).

Важно отметить, что эта локальная гиперполяризация полностью блокируется 50 нМ уабаина без изменений мембранного потенциала покоя (МПП) во внесинаптическом районе сарколеммы (рис. 1 В). При этом в постсинаптическом районе электрогенная активность α2-изоформы снижается почти вдвое, но не изменяется во внесинаптическом районе мембраны (рис. 1 Г). Эти факты можно объяснить тем, что ранее было предсказано наличие двух пулов α2-изоформы Na,K-АТФазы, блокируемых уабаином с константами 150 нМ и 9 нМ, причем только пул с более высоким сродством к уабаину (α2* на рис. 1 Г) функционально взаимодействует с нХР (Krivoi et al., 2006). Мы полагаем, что именно этот пул α2-изоформы активируется неквантовым АХ и отвечает за локальную гиперполяризацию постсинаптической мембраны и именно он блокируется уабаином в концентрации 50 нМ.

Функциональная связь никотиновых холинорецепторов и α2-изоформы Na,K-АТФазы. Каким может быть механизм этой связи? Ранее было показано, что устойчивая следовая гиперполяризация ганглионарных нейронов крысы после действия микромолярных концентраций АХ в основном осуществляется за счёт входящих через каналы нХР ионов натрия, активирующих Na,K-АТФазу (Park et al., 2010). В наших опытах инкубация с никотином (100 нМ) действительно вызывала увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ на 22 %. ($p < 0.05$) (рис. 2 А). Однако после замены наружного Na^+ на N-methyl-d-glucamine chloride (NMG-Cl), что исключает вход Na^+ через открытые каналы нХР (Henning et al., 1994), локальная гиперполяризация мембраны сохранялась (рис. 2 Б). Таким образом, входящий Na^+ не является решающим фактором

функциональной связи между нХР и Na,K-АТФазой.

Наша модель основана на предположении о том, что функциональное взаимодействие между нХР и Na,K-АТФазой в скелетной мышце обусловлено прямым молекулярным взаимодействием этих белков (Krivoi et al., 2006; Heiny et al., 2010; Chibalin et al., 2012). При этом важно, что АХ способен связываться с нХР в непроводящем десенситизированном состоянии, при котором аффинность рецептора к АХ повышена на 2 – 4 порядка и лежит в наномолярном диапазоне (Prince, Sine, 1999; Wilson, Karlin, 2001; Mourot et al., 2006), сопоставимом с уровнем негидролизованного АХ в синаптической щели.

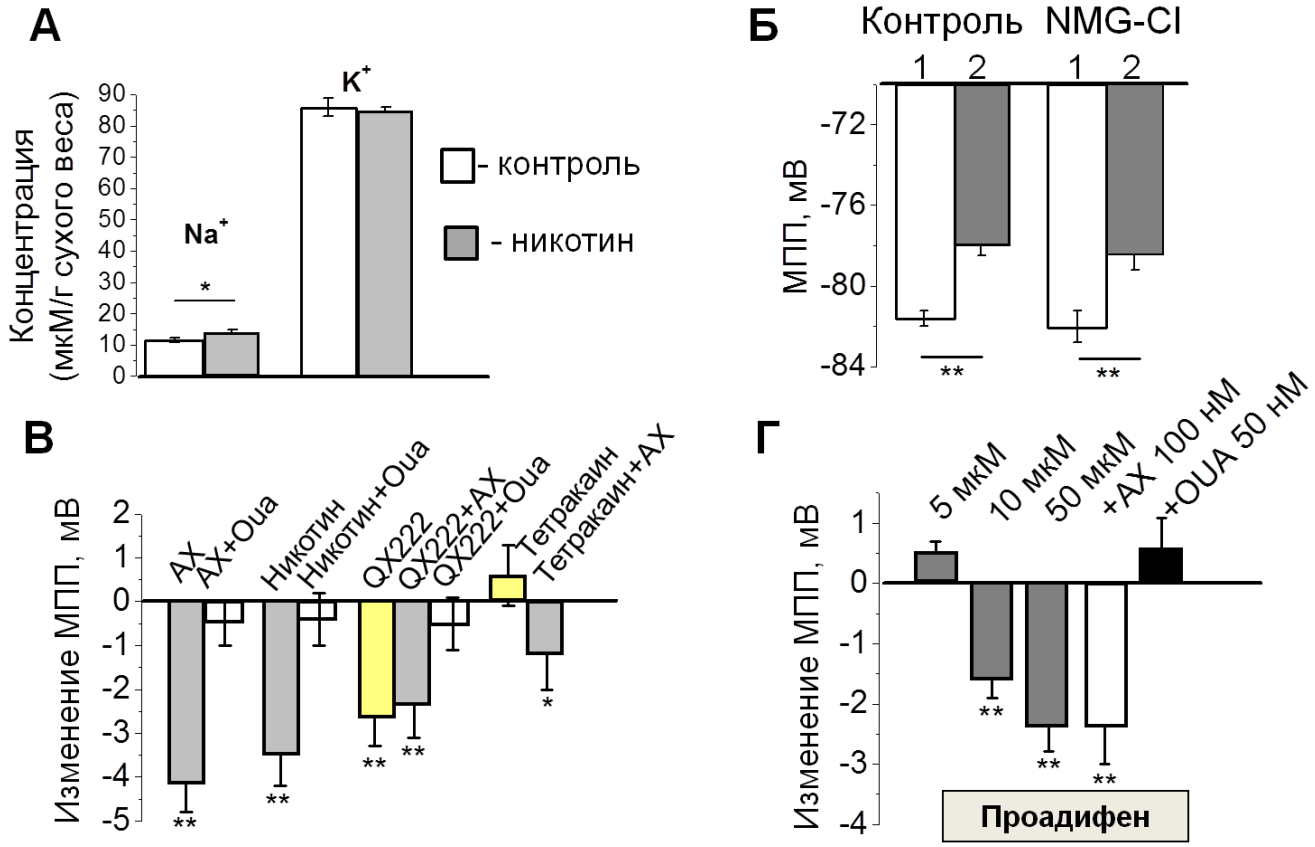

Рис. 2. Исследование механизма функциональной связи между нХР и Na,K-АТФазой. А – Изменение внутриклеточной концентрации Na^+ в m. soleus крысы при инкубации с никотином (100 нМ). **Б** – Величины МПП в постсинаптическом (1) и внесинаптическом (2) районах мембраны в контрольных диафрагмальных мышцах крысы, и в опытах с заменой наружного Na^+ на NMG-Cl. **В** – Изменение МПП при действии АХ или никотина (100 нМ), QX222 или тетракаина (50 мкМ), в том числе при их совместном применении и на фоне 50 нМ уабаина. **Г** – Изменение МПП при действии разных концентраций проадифена, а также при его совместном действии с АХ и на фоне 50 нМ уабаина. В и Г – изменение МПП в негативную сторону соответствует гиперполяризации мембраны. *$p < 0.05$ и **$p < 0.01$ по сравнению с исходным уровнем МПП перед применением перечисленных лигандов.

Нами было установлено, что АХ или никотин в концентрациях 100 нМ (15 – 30 мин действия) вызывают гиперполяризацию мембраны величиной ~4 мВ (рис. 2 В). Далее мы применили блокаторы канала нХР, сдвигающие равновесие между конформационными состояниями покоя и десенситизации нХР. Блокаторы QX222 и проадифен (Tikhonov, Zhorov, 1998; Gentry, Lukas, 2001), сдвигающие равновесие в сторону десенситизации (Song, Pedersen, 2000; Ryan et al., 2002), также вызывали гиперполяризацию (30 мин действия), причем их эффекты не были аддитивны с эффектом АХ при совместном применении, что указывает на общий механизм реализации. Гиперполяризация при использовании всех перечисленных лигандов (АХ, никотин, QX222 и проадифен) блокировалась 50 нМ уабаина (30 мин преинкубации) (рис. 2 В, Г), что свидетельствует о её реализации через активацию α2-изоформы Na,K-АТФазы. Напротив, тетракаин, сдвигающий равновесие в сторону состояния покоя нХР (Boyd, Cohen, 1984), не влиял на величину МПП, и АХ на его фоне был способен вызывать гиперполяризацию мембраны (рис. 2 В).

Наши данные позволяют предположить, что переход нХР в конформационное состояние десенситизации служит модулирующим сигналом для α2-изоформы Na,K-АТФазы, причем неважно, чем этот переход вызван – длительным действием наномолярных концентраций агонистов нХР, или действием неконкурентных блокаторов ионного канала нХР.

Функциональное взаимодействие α2-изоформы Na,K-АТФазы и холестерина. Известно, что мембранные белки взаимодействуют с липидным окружением, причем холестерин молекулярно связан с нХР и играет важную роль в их кластеризации и стабилизации концевой пластинки (Burger et al., 2000; Zhu et al., 2006; Willmann et al., 2006; Brannigan et al., 2010). Учитывая эти данные, а также роль холестерина в компартментализации, стабилизации и регуляции Na,K-АТФазы (Chen et al., 2011; Haviv et al., 2013; Cornelius et al., 2015), можно предположить участие холестерина в формировании функциональной связи между нХР и α2-изоформой Na,K-АТФазы, в том числе в качестве молекулярного компонента этого комплекса. С другой стороны, известно, что не только холестерин участвует в регуляции Na,K-АТФазы, но и сама Na,K-АТФаза может влиять на формирование кавеол, синтез холестерина и его траффик. Это показано для α1-изоформы Na,K-АТФазы (Chen et al., 2009; 2011). В отношении α2-изоформы Na,K-АТФазы подобных данных нет.

Чтобы понять, может ли сама активность α2-изоформы влиять на стабильность липидных плотиков, нами были проведены опыты с применением уабаина в концентрации 1 мкМ, что селективно блокирует α2-изоформу Na,K-АТФазы (Krivoi et al., 2003; Heiny et al., 2010). В качестве маркера липидных

плотиков (рафтов) мы применяли субъединицу В холерного токсина (CTxB), снабженную флуоресцентной меткой (Fujinaga et al., 2003). В камбаловидной мышце крысы оба сигнала от меченого α-BTX (красный канал, нХР) и CTxB (зеленый канал, липидные плотики) были локализованы в области концевой пластинки и совпадали при наложении (рис. 3 А). Флуоресценция CTxB в постсинаптическом районе сарколеммы в 4 раза превышала таковую во внесинаптическом районе, что свидетельствует о концентрации липид-упорядоченной фазы мембраны в зоне концевой пластинки.

В течение 15 мин действия 1 мкМ уабаина уровень флуоресценции CTxB снижался в постсинаптическом и внесинаптическом районах мембраны на ~30% и на ~20%, что указывает на снижение стабильности липидных плотиков при блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы (рис. 3 Б). Эффект уабаина был полностью обратимым после 15 мин отмывания нормальным физиологическим раствором с последующим повторным окрашиванием CTxB (рис. 3 В). Поскольку повторное окрашивание маркирует вновь образованные липидные плотики, увеличение уровня флуоресценции CTxB свидетельствует о восстановлении их структуры. Для изучения роли холестерина в наблюдаемых эффектах мы использовали метил-β-циклодекстрин (МβЦД), применяемый для частичного удаления холестерина из плазматической мембраны (Zidovetzki, Levitan, 2007). Через 15 мин действия 0.1 мМ МβЦД наблюдалось аналогичное снижение уровня флуоресценции CTxB (стабильности липидных плотиков) в постсинаптическом районе мембраны, как и при ингибировании α2-изоформы Na,K-АТФазы. Этот эффект сохранялся и после 15 мин отмывания нормальным физиологическим раствором с повторным окрашиванием CTxB, что свидетельствует о более устойчивом характере вызванного МβЦД разрушения липидных плотиков по сравнению с уабаином (рис. 3 Г).

Для встраивания в мембрану экзогенного холестерина мы применяли добавление в раствор комплекса МβЦД/холестерин (5 мМ) (Zidovetzki, Levitan, 2007). Добавление этого комплекса с последующим повторным окрашиванием CTxB приводило к восстановлению флуоресценции CTxB до исходного уровня (рис. 3 Г), то есть к восстановлению структуры липидных плотиков.

Таким образом, путем встраивания экзогенного холестерина можно восстановить липидные плотики, разрушенные воздействием 0.1 мМ МβЦД. В связи с этим важно отметить, что в опытах на диафрагме крысы МβЦД (0.1 мМ) устраняет локальную гиперполяризацию постсинаптической мембраны и селективно снижает электрогенную активность α2-изоформы Na,K-АТФазы по всей сарколемме, причем эффект наиболее выражен в постсинаптическом районе мембраны (рис. 3 Д).

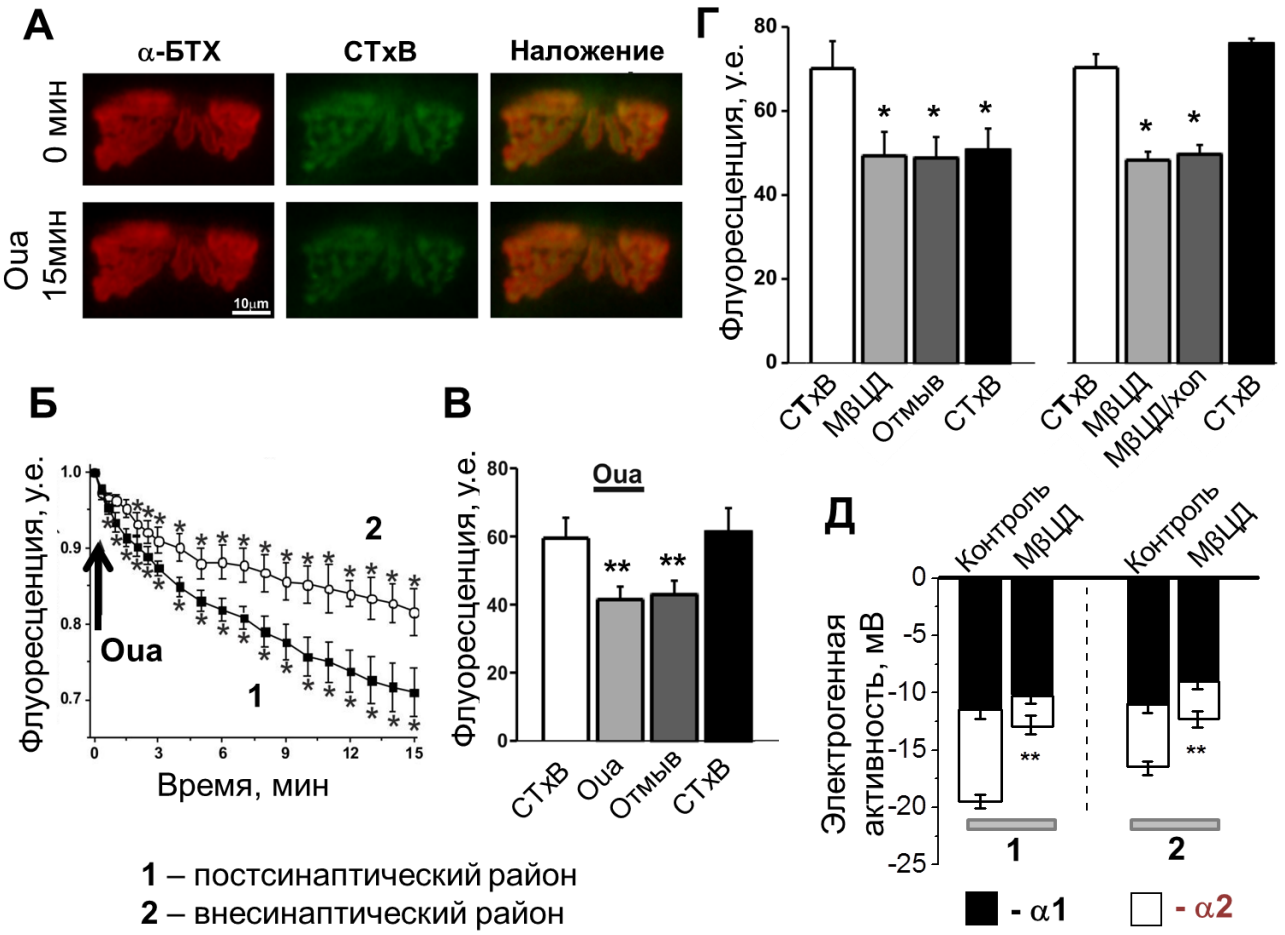

Рис. 3. Опыты с ингибированием α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином (1 мкМ) и применением MβЦД (0.1 мМ) для снижения уровня мембранного холестерина. А – Распределение никотиновых холинорецепторов, меченых α-BTX (красный канал), и липидных плотиков, определяемое по флуоресценции CTxB (зеленый канал), в концевых пластинках камбаловидной мышцы крысы. Верхний ряд – до добавления в раствор уабаина (0 мин); нижний ряд – через 15 мин действия уабаина. Масштаб: 10 мкм. **Б** – Динамика флуоресценции CTxB в течение 15 мин действия уабаина (начало действия отмечено стрелкой) по отношению к начальному уровню, принятому за 1.0. **В** и **Г** – Усредненные флуоресценции CTxB в постсинаптическом районе мембраны через 15 мин действия уабаина (В) или MβЦД (Г), через 15 мин отмывания нормальным физиологическим раствором и после повторного окрашивания CTxB. На Г справа – отмывание физиологическим раствором с добавлением комплекса MβЦД/холестерин. **Д** – Электрогенная активность α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы в постсинаптическом (1) и внесинаптическом (2) районах мембраны диафрагмы крысы при действии MβЦД. *$p < 0.05$ и **$p < 0.01$ по сравнению с соответствующим контролем.

В опытах с постоянным присутствием 1 мкМ уабаина само по себе добавление комплекса MβЦД/холестерин не влияло на уровень флуоресценции CTxB в постсинаптическом районе мембраны. Однако после повторного окрашивания CTxB наблюдалось полное восстановление флуоресценции CTxB

до исходного уровня (рис. 4 А, Б). Аналогичное, хотя и менее выраженное, восстановление наблюдалось и во внесинаптическом районе мембраны. Эти факты свидетельствуют о возможности путем встраивания экзогенного холестерина восстанавливать липидные плотики, разрушенные блокированием α2-изоформы Na,K-АТФазы даже в присутствии уабаина.

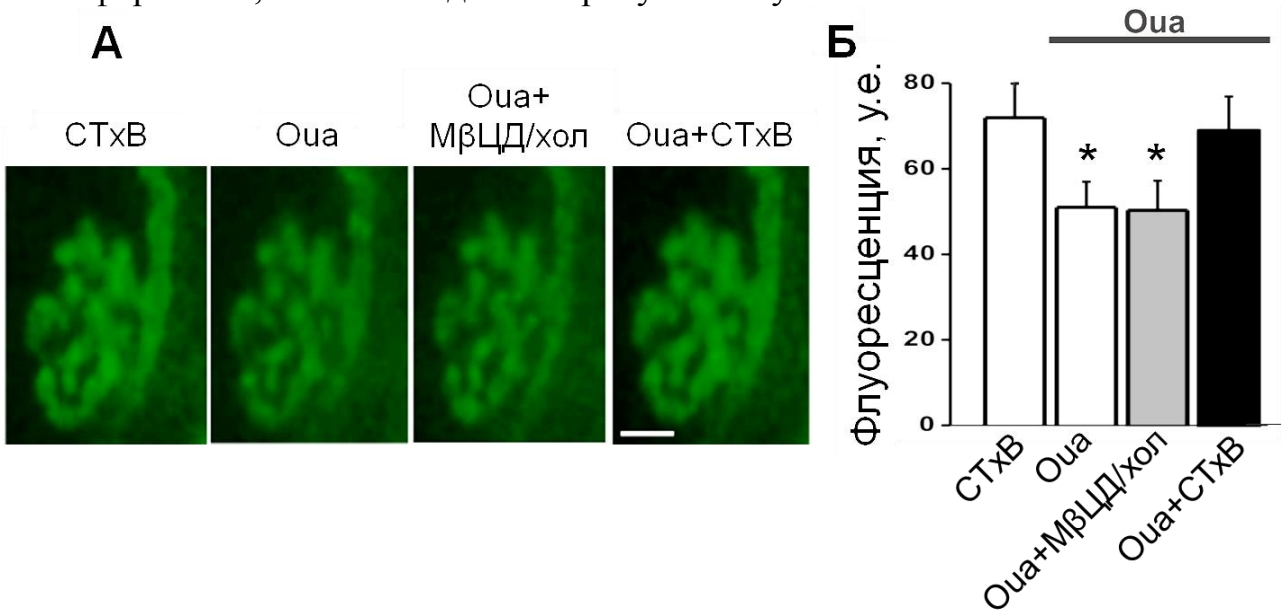

Рис. 4. Восстановление липидных плотиков в постсинаптическом районе мембраны камбаловидной мышцы крысы при блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином (1 мкМ) с помощью комплекса МβЦД/холестерин. А – Примеры окрашивания липидных плотиков, определяемого по флуоресценции CTxB (зеленый канал). Масштаб: 10 мкм. **Б** – усредненная флуоресценция CTxB. На А и Б показаны изображения и флуоресценция после начального окрашивания CTxB (CTxB), через 15 мин действия уабаина (Oua); через 15 мин после добавления 5 мМ комплекса МβЦД/холестерин (Oua+МβЦД/хол) и после повторного окрашивания CTxB (Oua+CTxB). *p < 0.05 по сравнению с исходным уровнем CTxB флуоресценции.

Хронические эффекты никотина в скелетной мышце

Данные о функциональной связи между нХР и α2-изоформой Na,K-АТФазой, реализуемой через десенситизированное состояние нХР, предполагают возможность долговременной модуляции Na,K-АТФазы в скелетной мышце циркулирующими в наномолярном диапазоне концентраций холинергическими лигандами. Таким лигандом может являться никотин, концентрация которого в крови у курильщиков табака составляет порядка сотен наномолей, сходные концентрации используются и в опытах с исследованием хронического действия никотина (Lester, Dani, 1995; Benowitz et al., 1997; Dani, De Biasi, 2001; Dani, 2015). В условиях хронически действующей низкой концентрации никотина переход части нХР в состояние десенситизации (Wang,

Sun, 2005; Dani, 2015) может действовать как модулирующий сигнал для Na,K-АТФазы.

В наших опытах хроническое введение никотина крысам путем подкожных инъекций в течение 2 – 3 недель вызывало снижение электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы и деполяризацию мембраны волокон диафрагмальной мышцы. Сходная деполяризация наблюдалась в камбаловидной мышце крысы при кратковременном (3 суток) локальном подведении к мышце никотина с помощью силиконовых имплантатов. Введение крысам никотина с питьевой водой в течение 21 – 31 суток также вызывало деполяризацию мембраны и изоформ-специфические изменения электрогенной активности Na,K-АТФазы в диафрагмальной мышце, причем наибольшую изменчивость демонстрировала α2-изоформа.

Изоформ-специфическое влияние двигательной разгрузки на Na,K-АТФазу

Хорошо известно, что самые разнообразные формы усиления двигательной активности характеризуются ростом общего количества Na,K-АТФазы в сарколемме скелетных мышечных волокон; длительное снижение двигательной активности вызывает противоположный эффект (Clausen, 2008; 2013). Изоформ-специфичность этих изменений, в особенности в условиях двигательной дисфункции, остается мало изученной и в основном касается нарушений хронического характера при травмах (Boon et al., 2012; Perry et al., 2015) и возрастных изменениях (McKenna et al., 2012; Wyckelsma, McKenna, 2016). Функционирование Na,K-АТФазы на самых начальных этапах двигательной разгрузки не исследовано, хотя представляет особый интерес с точки зрения поиска ключевых сигнальных событий, запускающих атрофическую программу. Для изучения этого вопроса нами был применен метод антиортостатического вывешивания задних конечностей крысы, широко используемый в качестве лабораторной модели гравитационной и двигательной разгрузки (Morey-Holton et al., 2005). Опыты проводили на камбаловидной мышце крысы в период от 6 ч до 3 суток (72 ч) разгрузки, то есть в период, предшествующий выраженным изменениям атрофического характера.

Уже через 6 ч вывешивания наблюдалась деполяризация постсинаптического и внесинаптического районов сарколеммы до одинакового уровня около –70 мВ и исчезновение локальной гиперполяризации мембраны концевой пластинки. Далее, в течение 72 ч вывешивания мембрана внесинаптического района сарколеммы оставалась деполяризованной, и наблюдалось снижение ее возбудимости. Однако в постсинаптическом районе

величина МПП уже через 12 ч вывешивания восстанавливалась до контрольного значения и оставалась такой на более поздних сроках разгрузки. Локальная гиперполяризация мембраны концевой пластинки также восстанавливалась (рис. 5 А, Б).

Проведенный анализ показал, что наблюдаемые изменения (и снижение и восстановление) МПП обоих районов сарколеммы обусловлены соответствующими изменениями электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы при постоянной активности α1-изоформы (рис. 5 В, Г).

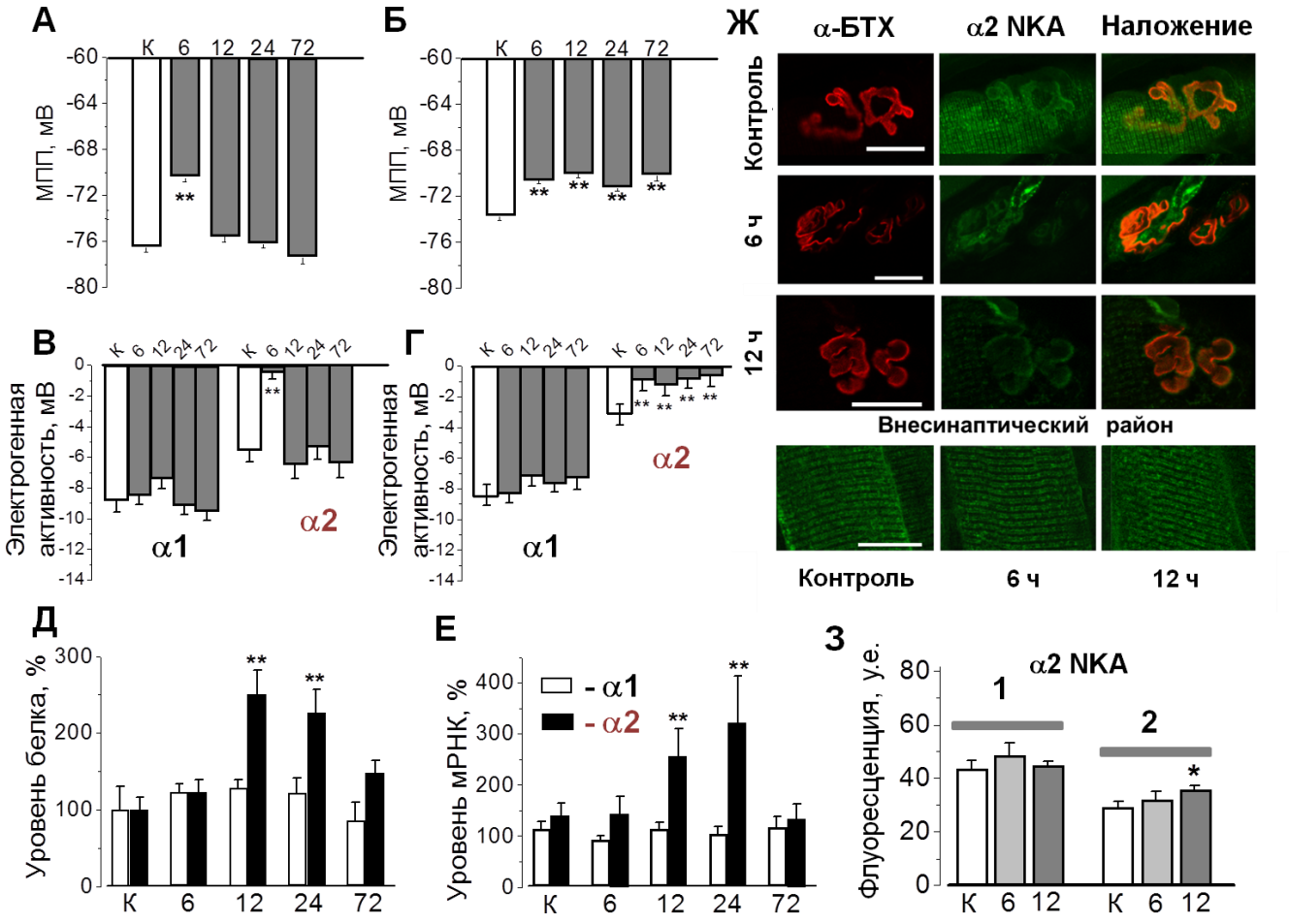

Рис. 5. Изоформ-специфическое влияние двигательной разгрузки в течение 6 ч – 72 ч на Na,K-АТФазу в камбаловидной мышце крысы. А – Изменение величины МПП в постсинаптическом и **Б** – внесинаптическом районах сарколеммы. **В** – Изменение электрогенной активности α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы в постсинаптическом и **Г** – внесинаптическом районах сарколеммы. **Д** – Количество белка и **Е** – уровень мРНК α1- и α2-изоформ в общем гомогенате мышц. **Ж** – Локализация α2-изоформы в сарколемме. Красный канал – распределение никотиновых холинорецепторов, меченых α-BTx; зеленый канал – локализация α2-изоформы (α2 NKA), меченой 1 мкМ Bodipy ouabain;

оранжевый цвет – наложение сигналов. Верхний ряд – контрольная мышца; средний и нижний ряды – после 6 ч и 12 ч разгрузки соответственно. Внизу – локализация α2-изоформы во внесинаптической мембране в виде упорядоченных рядов в соответствии с ее распределением в поперечных трубочках (Williams et al., 2001; Heiny et al., 2010). Масштаб: 25 мкм. **З** – Усредненная флуоресценция от α2-изоформы в постсинаптическом (1) и внесинаптическом (2) районах сарколеммы. К – контроль; цифры под осью X обозначают время разгрузки в ч. *$p < 0.05$ и **$p < 0.01$ по сравнению с соответствующим контролем.

В период от 12 до 24 ч разгрузки наблюдалось увеличение количества белка и экспрессии мРНК α2-изоформы в общем гомогенате мышц. Через 72 ч разгрузки эти параметры начинали возвращаться к контрольному уровню; количество белка и экспрессия мРНК α1-изоформы Na,K-АТФазы в течение всего исследованного периода не изменялись (рис. 5 Д, Е).

Сравнение результатов, полученных на камбаловидной и диафрагмальной мышцах одних и тех же крыс показало, что во внесинаптическом районе функционирование α2-изоформы напрямую зависит от двигательной активности: снижается в неактивной камбаловидной мышце и не изменяется в постоянно сокращающейся диафрагме. В постсинаптическом районе, помимо этого, по-видимому, действуют какие-то дополнительные факторы разгрузки, влияющие на электрогенную активность α2-изоформы в обеих мышцах независимо от двигательной активности.

Роль собственно двигательной активности была проверена нами в следующих опытах. После 6 ч разгрузки изолированную камбаловидную мышцу стимулировали в течение 5 мин (нервная стимуляция, 2 имп/с), что должно повышать электрогенную активность Na,K-АТФазы (Hicks, McComas, 1989). Сразу после такой стимуляции наблюдалось восстановление МПП обоих районов сарколеммы до уровня, близкого к контрольному; этот эффект отсутствовал при блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином (100 нМ и 1 мкМ), что подтверждают важность двигательной активности для поддержания функционирования именно α2-изоформы.

Причиной снижения электрогенной активности α2-изоформы могло бы быть нарушение ее локализации в сарколемме, например, за счет изменений в механизме ее транслокации – обмена между плазматической мембраной и внутриклеточным пулом Na,K-АТФазы (Benziane, Chibalin, 2008). Однако наши опыты показали, что количественно α2-изоформа Na,K-АТФазы и ее ко-локализация с нХР сохраняются через 6 – 12 ч вывешивания; сохраняется

локализация α2-изоформы и во внесинаптической мембране (при небольшом росте через 12 ч разгрузки) (рис. 5 Ж, З).

Наши опыты показали также, что подавление активности α*2*-изоформы при функциональной разгрузке нельзя объяснить повышенным уровнем эндогенных дигиталисоподобных ингибиторов Na,K-АТФазы или изменением уровня неквантовой секреции АХ. Даже в состоянии подавленной активности после разгрузки α2-изоформа сохраняет способность повышать свою функциональную активность, что дополнительно подтверждает ее наличие в сарколемме. Эти данные позволяют предположить избирательный механизм подавления функциональной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы уже в первые часы функциональной разгрузки камбаловидной мышцы.

Аналогичные опыты с вывешиванием были проведены на камбаловидной мышце монгольской песчанки, характеризующейся повышенной устойчивостью к условиям аридной зоны обитания и исследуемой в последнее время в условиях реального космического полета (Липец и др., 2009). И в этих опытах нами была обнаружена деполяризация мышечных волокон, обусловленная, как и у крысы, снижением электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы. Важное отличие заключается в существенной задержке в развитии этих нарушений электрогенеза у песчанки, проявляющихся только через 12 суток вывешивания (Кравцова и др., 2010). Это наблюдение соответствует данным, по которым развитие атрофических процессов в камбаловидной мышце монгольской песчанки после космического полета оказались менее глубокими, чем у крыс (Липец и др., 2009).

Липидная и структурная перестройка концевой пластинки при двигательной разгрузке

Липидная перестройка. Как было отмечено выше, опыты с применением в качестве маркера липидных плотиков субъединицы В холерного токсина, снабженной флуоресцентной меткой (CTxB), показали, что в контрольных камбаловидных мышцах крысы оба сигнала от меченого α-BTX (красный канал, нХР) и CTxB (зеленый канал, липидные плотики) локализованы в области концевой пластинки и совпадают при наложении. Такая локализация сохранялась после 6 ч антиортостатического вывешивания (рис. 6 А). Однако даже такая кратковременная разгрузка вызывала дестабилизацию липидных плотиков (снижение флуоресценции CTxB) в области концевой пластинки, а также во внесинаптической мембране, где нарушения были выражены слабее (рис. 6 Б). Нарушение липидных плотиков было подтверждено и при использовании для визуализации распределения различных липидных фаз

плазматической мембраны флуоресцентных стеролов – 22-NBD-холестерина и дигидроэргостерола (рис. 6 В и Г).

Кроме того, нами был проведен анализ изменений липидных плотиков в разгруженной камбаловидной мышце по сравнению с сокращающейся диафрагмой тех же крыс. В диафрагмальной мышце наблюдались сходные изменения, что свидетельствует о возможном влиянии на стабильность липидных плотиков системных (циркулирующих) факторов, характерных для данной модели разгрузки. Однако наблюдаемые нарушения были выражены значительно сильнее в камбаловидной мышце, что свидетельствует о важной роли мышечной разгрузки как таковой. Об этом же свидетельствуют и данные д-ра А.М. Петрова, по которым при продлении разгрузки до 12 ч восстановление липидных плотиков не наблюдается. Однако даже кратковременная двигательная нагрузка, вызванная стимуляцией двигательного нерва, приводит к их частичному восстановлению (Petrov et al., 2017).

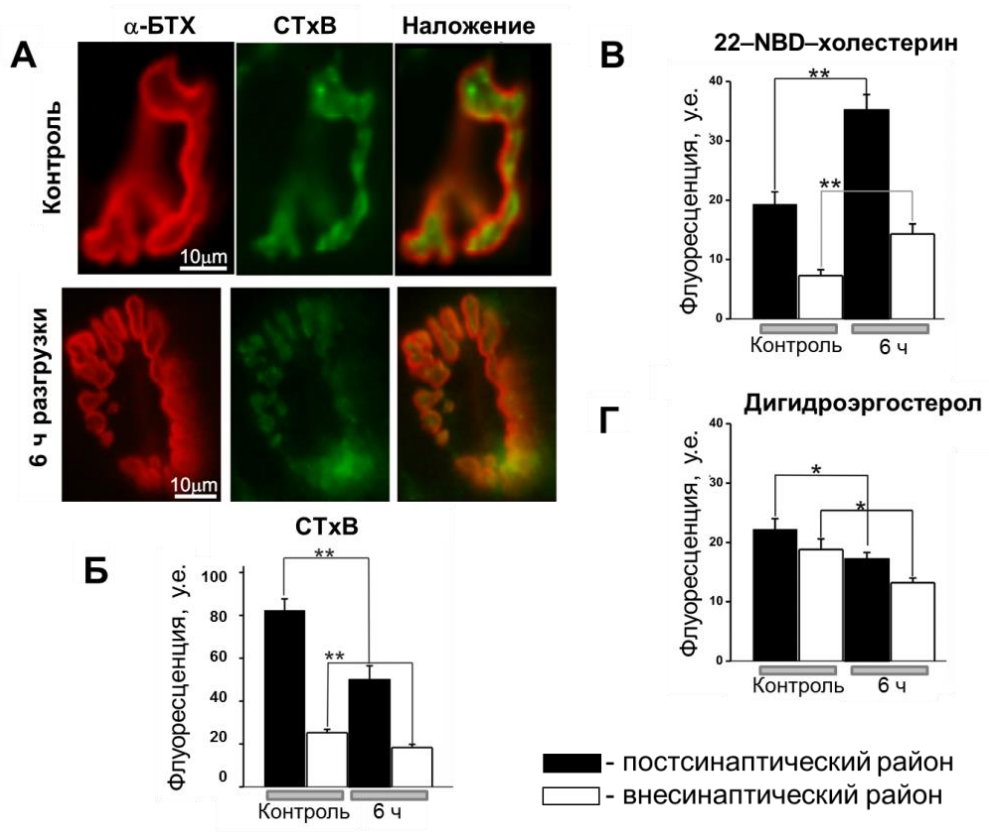

Рис. 6. Влияние двигательной разгрузки на распределение липидных плотиков в камбаловидной мышце крысы. А – Распределение никотиновых холинорецепторов, меченых α-BTX (красный канал), и локализация липидных плотиков, определяемая по флуоресценции CTxB (зеленый канал), в концевых пластинках контрольной мышцы (верхний ряд) и после 6 ч разгрузки (нижний ряд). Оранжевый цвет – наложение сигналов. Масштаб: 10 мкм. **Б, В** и **Г** –

усредненные флуоресценции соответственно CTxB, 22-NBD-холестерина и дигидроэргостерола в контрольных мышцах и после 6 ч разгрузки. Темные и светлые столбцы – соответственно, постсинаптический и внесинаптический районы сарколеммы. *$p < 0.05$ и **$p < 0.01$ по сравнению с соответствующим контролем.

Последующие опыты были проведены с целью выявления роли мембранного холестерина в наблюдаемых нарушениях липидной фазы мембраны. Для селективного блокирования α2-изоформы Na,K-АТФазы применяли уабаин в концентрации 1 мкМ (Krivoi et al., 2003; Heiny et al., 2010). Как отмечено выше, в контрольных камбаловидных мышцах крысы уже через 15 мин действия уабаина наблюдалось снижение уровня флуоресценции CTxB, что свидетельствует о дестабилизации липидных плотиков (рис. 3 Б). Однако после 6 ч разгрузки, когда α2-изоформа практически полностью подавлена, уабаин никак не влиял на стабильность плотиков в постсинаптическом районе мембраны (рис. 7 А и Б). Далее присутствие уабаина сохранялось в течение всего эксперимента. Для встраивания в мембрану экзогенного холестерина мы применяли добавление в раствор 5 мМ комплекса МβЦД/холестерин с повторным окрашиванием CTxB, после чего наблюдалось полное восстановление флуоресценции CTxB (липидных плотиков) до исходного уровня, несмотря на присутствие уабаина (рис. 7 В и Г). Аналогичное восстановление наблюдалось и во внесинаптическом районе сарколеммы. Полученные данные свидетельствуют о возможности путем встраивания экзогенного холестерина восстанавливать липидные плотики, разрушенные ингибированием α2-изоформы Na,K-АТФазы и двигательной разгрузкой. Эти данные показывают также, что эффекты уабаина и двигательной разгрузки в отношении липидных плотиков обусловлены снижением уровня именно мембранного холестерина.

В части опытов мы применяли кратковременное (15 мин) воздействие 1 мкМ уабаина с последующим отмыванием нормальным физиологическим раствором. В отличие от контрольных мышц, где вызванное уабаином нарушение липидных плотиков было полностью обратимым при отмывании даже без применения комплекса МβЦД/холестерин (рис. 3 В), после 6 ч разгрузки восстановления липидных плотиков при отмывании не наблюдалось (рис. 7 Д). Таким образом, эффекты уабаина и двигательной разгрузки не аддитивны и, хотя имеют общий механизм реализации через угнетение активности α2-изоформы Na,K-АТФазы, проявляются по-разному.

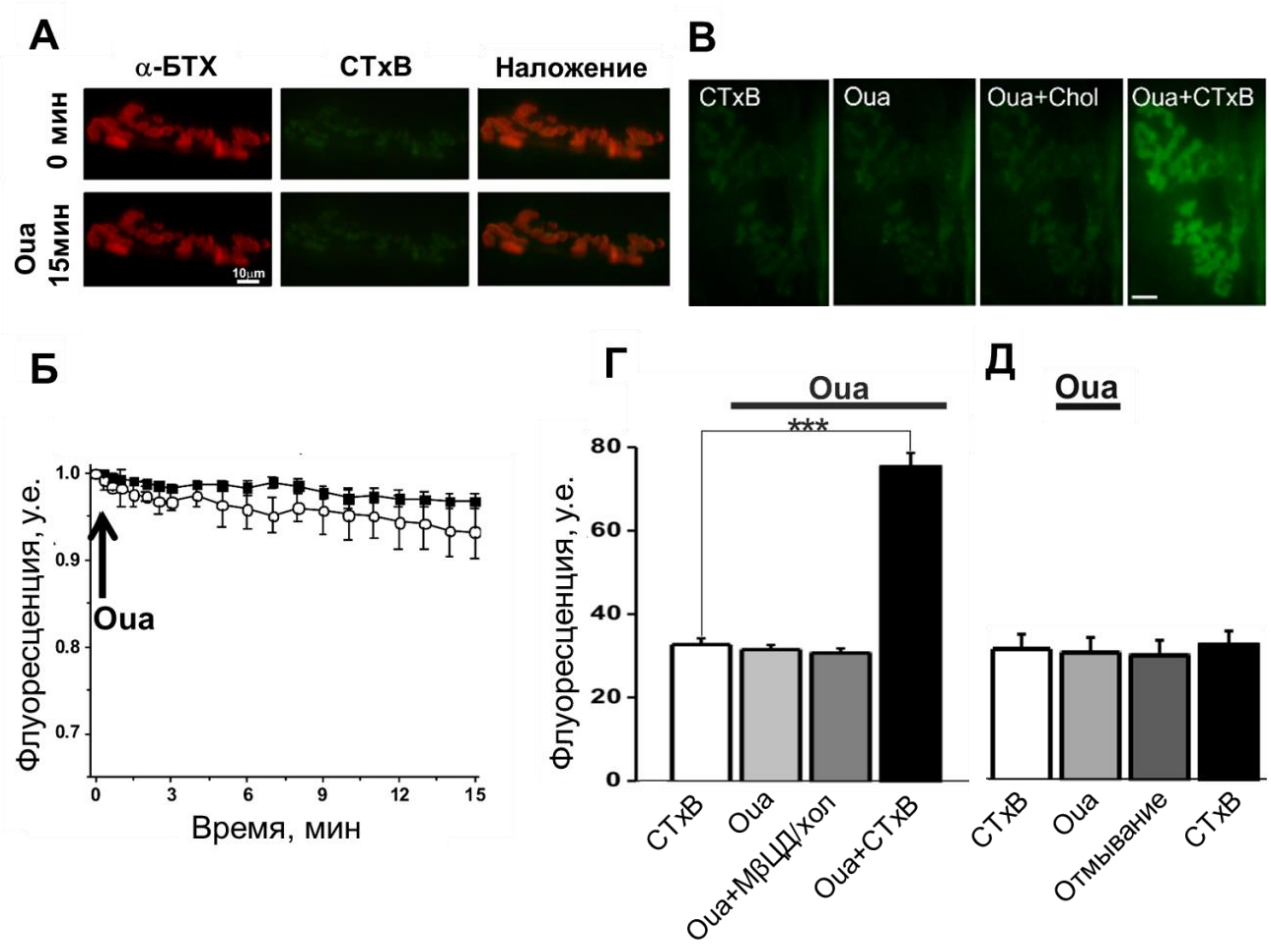

Рис. 7. Применение комплекса MβЦД/холестерин для восстановления липидных плотиков в постсинаптическом районе сарколеммы камбаловидной мышцы крысы после 6 ч разгрузки и блокирования α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином (1 мкМ). А – Распределение никотиновых холинорецепторов, меченых α-BTX (красный канал), и липидных плотиков, определяемое по флуоресценции CTxB (зеленый канал), в концевых пластинках мышцы после 6 ч разгрузки. Верхний ряд – до добавления в раствор уабаина (0 мин); нижний ряд – через 15 мин действия уабаина. Масштаб: 10 мкм. **Б** – Динамика флуоресценции CTxB в течение 15 мин действия уабаина; светлые и темные символы – внесинаптический и постсинаптический районы мембраны, соответственно. Момент добавления уабаина отмечен вертикальной стрелкой. Изменения показаны по отношению к начальному уровню флуоресценции, принятому за 1.0. **В** – Примеры окрашивания липидных плотиков, определяемого по флуоресценции CTxB (зеленый канал), после 6 ч разгрузки. Масштаб: 10 мкм. **Г** – усредненная флуоресценция CTxB. На В и Г показаны изображения и флуоресценция после начального окрашивания CTxB (CTxB, светлые столбцы), через 15 мин после добавления уабаина (Oua, светло-серые столбцы); через 15 мин после добавления 5 мМ комплекса MβЦД/холестерин (Oua+MβЦД/хол, темно-серые столбцы) и после повторного окрашивания CTxB (Oua+CTxB, темные столбцы). *** $p < 0.001$ по сравнению с соответствующим исходным уровнем CTxB флуоресценции. **Д** – Усредненная

флуоресценция после начального окрашивания CTxB (светлые столбцы), через 15 мин после добавления уабаина (светло-серые столбцы); через 15 мин после отмывания нормальным физиологическим раствором (темно-серые столбцы) и после повторного окрашивания CTxB (темные столбцы).

Структурная перестройка. Ультраструктура нервно-мышечного соединения и концевой пластинки существенно зависят от двигательной активности. Снижение двигательной активности сопровождается многочисленными нарушениями структуры концевой пластинки, включая изменение ее площади и усиление фрагментации в распределении нХР. Подобные нарушения наблюдаются после денервации и продолжительной функциональной разгрузки, при возрастных изменениях, при миодистрофии и других формах мышечной патологии. Молекулярные механизмы, лежащие в основе такой пластичности нервно-мышечного соединения и концевой пластинки, во многом остаются неясными (Wilson, Deschenes, 2005; Nishimune et al., 2014; Gonzalez-Freire et al., 2014; Rudolf et al., 2014; Tintignac et al., 2015; Rogers, Nishimune, 2017). Особый интерес представляет изучение начальных этапов двигательной дисфункции, которые могут играть роль триггеров в отношении последующих сигнальных событий. В связи с этим важно, что даже кратковременное снижение двигательной активности m. soleus крысы нарушает функционирование α2-изоформы Na,K-АТФазы, а также распределение холестерина и структура липидных плотиков, которые играют важную роль в кластеризации нХР и стабилизации концевой пластинки (Zhu et al., 2006; Brannigan et al., 2010).

В этой части работы была проведена детализация структурных изменений концевых пластинок камбаловидной мышцы крыс в условиях кратковременной функциональной разгрузки (вывешивание). Оценку распределения нХР проводили с помощью меченого α-BTX (красный канал) (рис. 8 А-В). Анализ фрагментации в распределении нХР показал, что в контрольных мышцах среднее количество фрагментов в одной концевой пластинке составило 3.0 ± 0.1. Через 6 и 12 ч разгрузки степень фрагментации концевых пластинок не изменялась, что подтверждается постоянством соответствующих кумулятивных кривых (рис. 8 Г). Однако наблюдался сдвиг кумулятивных кривых распределения площадей отдельных фрагментов в область меньших значений (рис. 8 Д). Распределение площадей отдельных фрагментов в контроле, аппроксимированное 3-мя нормальными распределениями, свидетельствовало о преобладании относительно крупных фрагментов со средней площадью 145 ± 10 мкм^2. Через 6 и 12 ч разгрузки в распределениях площадей уже преобладали относительно мелкие фрагменты. Наблюдался также сдвиг пика распределения

площадей крупных фрагментов в область меньших значений (рис. 8 Е-З). Соответственно, общая площадь каждой концевой пластинки, определяемая как сумма площадей всех ее фрагментов, через 6 и 12 ч разгрузки достоверно снижалась (рис. 8 И). Это снижение сопровождалось увеличением относительной флуоресценции нХР на единицу площади (рис. 8 К), что может отражать рост плотности распределения нХР в концевой пластинке и адаптацию к разгрузке. В результате интегральная флуоресценция нХР по всей концевой пластинке, которая была снижена через 6 ч разгрузки, уже через 12 ч разгрузки не отличалась от контроля (рис. 8 Л).

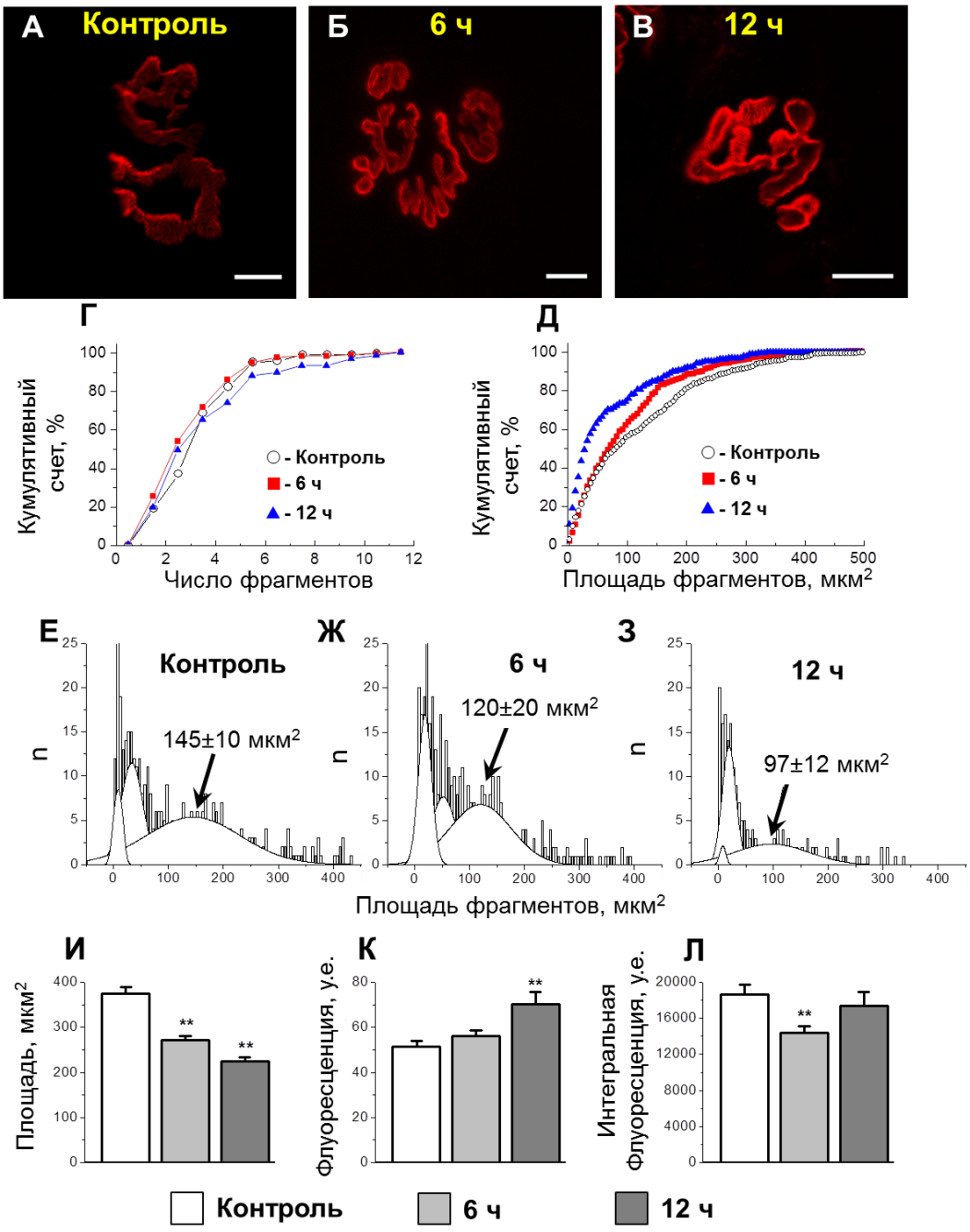

Рис. 8. Структурная перестройка концевых пластинок камбаловидной мышцы крысы при двигательной разгрузке. А-В – Примеры изображений

распределения нХР, меченых α-БТХ (красный канал), в концевых пластинках контрольной крысы (**А**), и крыс через 6 ч (**Б**) и 12 ч (**В**) разгрузки. Масштаб: 10 мкм. **Г** и **Д** – Кумулятивные кривые, отражающие распределение концевых пластинок по количеству содержащихся в них фрагментов (**Г**) и распределение площадей отдельных фрагментов (**Д**): светлые кружки – контроль; красные квадраты – 6 ч и синие треугольники – 12 ч разгрузки. **Е-З** – Гистограммы распределений площадей отдельных фрагментов концевых пластинок в контроле (**Е**), через 6 ч (**Ж**) и через 12 ч (**З**) разгрузки. **И-Л** – Изменения площади и интенсивности флуоресценции нХР в мышцах контрольных крыс и крыс через 6 ч и 12 ч разгрузки. **И** – общая площадь концевых пластинок; **К** – интенсивность флуоресценции нХР на единицу площади; **Л** – интенсивность флуоресценции, соответствующая общей площади концевых пластинок. **$p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Кардиотонические стероиды и сократительная функция

Внеклеточные участки α-субъединицы Na,K-АТФазы формируют специфический рецептор для дигиталисоподобных сердечных гликозидов (кардиотонических стероидов, КТС), широко применяемых в клинике сердечно-сосудистых заболеваний. КТС растительного и животного происхождения (уабаин, дигоксин, маринобуфагенин и др.) являются специфическими ингибиторами Na,K-АТФазы и имеют сходную стероидную структуру. Из различных тканей и биологических жидкостей животных и человека выделены эндогенные аналоги уабаина, маринобуфагенина и других КТС (Blaustein, 1993; Doris, Bagrov, 1998; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007; Bagrov et al., 2009; Lingrel, 2010). Концентрация эндогенных уабаина и маринобуфагенина в плазме крови и цереброспинальной жидкости в норме находится в наномолярном диапазоне концентраций, но возрастает при ряде физиологических и патофизиологических состояний.

Предполагается, что основную роль в усилении сокращения гладкой и сердечной мышц при действии уабаина и его эндогенного аналога играет α2-изоформа Na,K-АТФазы за счет ее специфической кластеризации с Na^+,Ca^{2+}-обменником, SERCA, рианодиновыми и IP_3 рецепторами в местах тесного прилегания плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму (Blaustein et al., 2016). Положительное инотропное действие КТС показано и в скелетной мышце (Yamamoto et al., 1981; He et al., 2001), однако его механизм и изоформ-специфичность не были исследованы.

В наших опытах мы использовали уабаин (Sigma) и маринобуфагенин природного происхождения (из паротидных желез *Bufo marinus*, любезно предоставлен д-ром А.Я. Багровым). Установлено, что уабаин и

маринобуфагенин усиливают одиночные сокращения изолированной диафрагмы крысы соответственно с EC_{50} = 1.2 ± 0.3 нМ и EC_{50} = 0.3 ± 0.1 нМ (рис. 9 А), причем эффективный диапазон концентраций соответствует уровню циркулирующих эндогенных аналогов этих ингибиторов Na,K-АТФазы (см. Dobretsov, Stimers, 2005).

Ранее было показано, что АХ в наномолярном диапазоне концентраций вызывает не *деполяризацию*, а *гиперполяризацию* мышечных волокон за счет увеличения электрогенного вклада α2-изоформы Na,K-АТФазы. Таким образом, зависимость величины гиперполяризующего эффекта АХ от концентрации вещества может служить удобным электрофизиологическим тестом на его способность блокировать α2-изоформу Na,K-АТФазы (Krivoi et al., 2003). Наши опыты показали, что уабаин и маринобуфагенин блокируют вызываемую АХ (100 нМ) гиперполяризацию с IC_{50} = 4.9 ± 2.7 нМ и IC_{50} = 2.2 ± 0.7 нМ, соответственно (рис. 9 Б). Эти константы соответствуют диапазону концентраций уабаина и маринобуфагенина, усиливающих мышечные сокращения (рис. 9 А), что подтверждает участие α2-изоформы Na,K-АТФазы в реализации этого эффекта.

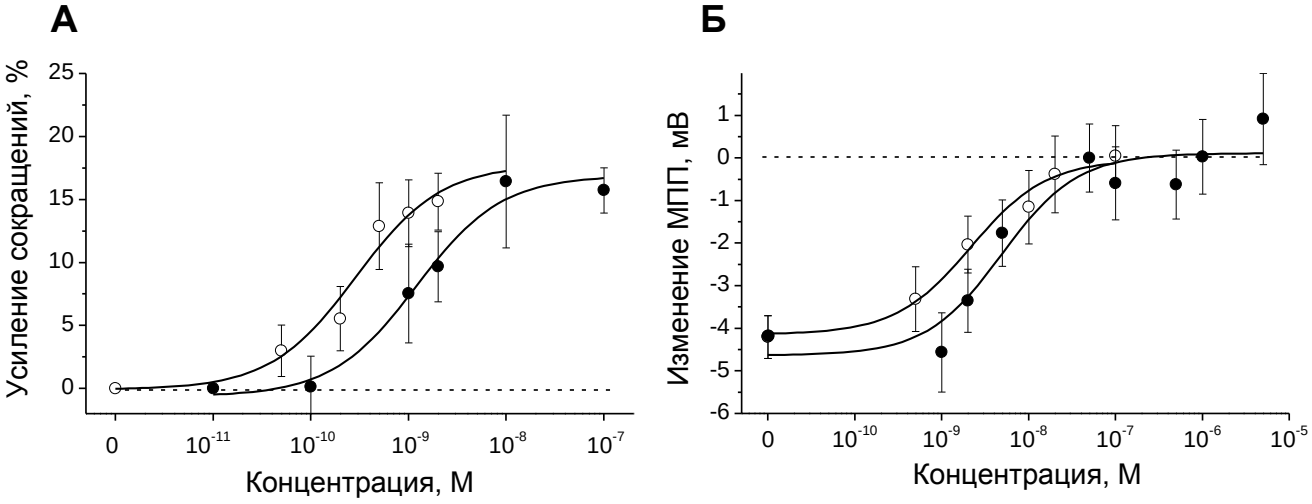

Рис. 9. Эффекты уабаина (темные кружки) и маринобуфагенина (светлые кружки) в изолированной диафрагме крысы. А – Зависимость увеличения силы одиночных мышечных сокращений (в % к контролю) от концентрации уабаина или маринобуфагенина (1 ч действия). **Б** – Зависимость доза-ответ для гиперполяризующего эффекта АХ (100 нМ) от концентрации уабаина или маринобуфагенина (1 ч преинкубации). Вызываемое АХ изменение МПП в негативную сторону соответствует гиперполяризации. Аппроксимирующие кривые рассчитаны по уравнению Хилла.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе нашей работы был исследован ряд принципиально важных и нерешенных до настоящего времени вопросов.

Полученные нами данные позволяют сформулировать гипотезу о существовании функционального молекулярного комплекса нХР/α2Na,K-АТФаза, в котором принципиальным для осуществления взаимодействия этих белков является конформационный переход нХР в состояние десенситизации. Результатом этого взаимодействия является локальная гиперполяризация мембраны концевой пластинки, вызываемая наномолярными концентрациями негидролизованного АХ, которую можно рассматривается как физиологический механизм, препятствующий инактивации Na^+ каналов и поддерживающий гарантийный фактор нервно-мышечной передачи. Таким образом, получены свидетельства новой роли нХР как модулятора Na,K-АТФазы, не связанной с функцией нХР как лиганд-управляемого ионного канала. Важно, что подобная функциональная реципрокная связь с Na,K-АТФазой показана и для нХР нейронального типа у насекомых (Bao et al., 2015). Таким образом, предлагаемый принцип регуляции за счет функциональной связи нХР с Na,K-АТФазой может действовать и в ЦНС, где важнейшей функцией нХР является модуляция эффективности синаптических связей.

Данные о функциональной связи между нХР и α2-изоформой Na,K-АТФазой предполагают возможность модуляции Na,K-АТФазы в скелетной мышце циркулирующими холинергическими лигандами. Известно, что концентрация никотина, циркулирующего в крови при курении табака, составляет порядка 100 нМ (Lester, Dani, 1995; Benowitz et al., 1997). Скелетная мускулатура, содержащая большой пул нХР, является потенциальной мишенью циркулирующего никотина, однако лишь в немногих работах изучается влияние курения табака и хронической никотинизации на скелетные мышцы (Larsson, Orlander, 1984; Larsson et al., 1988; Nakatani et al., 2003; Price et al., 2003). Наши данные о функциональной связи между нХР и α2-изоформой Na,K-АТФазы предполагают, что в условиях хронически действующей низкой концентрации никотина переход части нХР в состояние десенситизации может действовать как модулирующий сигнал, вызывающий компенсаторную реакцию в виде изменения экспрессии и активности Na,K-АТФазы. Наши опыты с моделированием условий циркуляции никотина в крови крыс (как при курении табака у человека), показывают специфичность изменений уровня и функционирования Na,K-АТФазы в отношении её α2-изоформы. Отметим, что

специфическое снижение активности и экспрессии α2-изоформы в условиях хронического введения никотина с помощью осмотических мини-помп было обнаружено также в сосудах гемато-энцефалического барьера и в мозге крысы (Wang et al., 1994).

Отметим, что применение в клинике антихолинэстеразных препаратов (используемых как стимуляторы памяти, при лечении ряда нейродегенеративных расстройств, миастении и др.) сопровождается повышением уровня циркулирующего негидролизованного эндогенного АХ. Поэтому описанные выше исследования важны не только для выявления новых механизмов никотиновой интоксикации, но и для более глубокого понимания механизмов побочных эффектов применяемых антихолинэстеразных препаратов, а также при отравлении такими веществами.

На функционирование мембранных белков существенное влияние оказывает липидное окружение (Levitan et al., 2014), что может быть важным фактором организации комплекса нХР/α2Na,K-АТФаза. При исследовании возможности функционального взаимодействия между α2-изоформой Na,K-АТФазы и холестерином нами было установлено, что дестабилизация липид-упорядоченной фазы сарколеммы, наблюдаемая при действии МβЦД, или при селективном блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы 1 мкМ уабаином, имеет сходный характер. Дестабилизация в обоих случаях обратима при встраивании в плазматическую мембрану экзогенного холестерина, то есть обусловлена снижением уровня мембранного холестерина. С другой стороны, частичное удаление мембранного холестерина с помощью МβЦД специфически снижает электрогенную активность α2-изоформы Na,K-АТФазы. Наблюдаемые эффекты МβЦД и уабаина наиболее выражены в постсинаптической области сарколеммы и сопровождаются устранением локальной гиперполяризации этого района мембраны. Полученные результаты позволяют предположить, что в скелетной мышце крысы существует реципрокное взаимодействие между α2-изоформой Na,K-АТФазы и холестерином. Это взаимодействие может служить физиологическим механизмом поддержания мышечного электрогенеза и наиболее функционально значимо в области концевой пластинки (Кравцова и др., 2014; Petrov et al., 2017).

При изучении ранних этапов двигательной разгрузки нами установлен адаптационный характер изменений экспрессии мРНК и количества α1- и α2-изоформ Na,K-АТФазы в камбаловидной мышце крысы, начиная от 6 ч и до 72 ч антиортостатического вывешивания. Эти изменения затрагивают только α2-изоформу Na,K-АТФазы, снижение электрогенной активности которой

приводит к деполяризации и снижению возбудимости мембраны. Функционирование α2-изоформы по-разному изменяется в разных районах сарколеммы: во внесинаптическом районе электрогенная активность α2-изоформы преимущественно зависит от двигательной активности и устойчиво снижена в течение всего исследованного периода разгрузки. Анализ, проведенный нашим партнером по этой части работы д-ром А.В. Чибалиным (Karolinska Institutet, Sweden), показал, что это подавление может быть объяснено увеличением количества фосфолеммана (белок FXYD1, регуляторная субъединица Na,K-АТФазы) и усилением его ассоциации с α2-субъединицей Na,K-АТФазы, что должно тормозить каталитическую активность фермента. Однако даже при кратковременной нервной стимуляции происходит восстановление электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы, причем по всей сарколемме. Кроме этого, постсинаптический пул α2-изоформы (но не внесинаптический пул) отличается способностью к восстановлению активности одновременно с усилением экспрессии мРНК и количества этой изоформы (Kravtsova et al., 2016).

Нами показано, что двигательная разгрузка сопровождается также структурными нарушениями концевой пластинки камбаловидной мышцы крысы. Кратковременная (6 ч) разгрузка и блокирование α2-изоформы Na,K-АТФазы 1 мкМ уабаина вызывают сходные нарушения липид-упорядоченной фазы сарколеммы, причем дестабилизация в обоих случаях наиболее выражена в постсинаптическом районе мембраны. Эти нарушения полностью обратимы по всей сарколемме при встраивании в мембрану экзогенного холестерина. Полученные данные свидетельствуют, что и при двигательной разгрузке, и при блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином, нарушения липидных плотиков обусловлены потерей мембранного холестерина. Дестабилизирующие эффекты уабаина и двигательной разгрузки в отношении липидных плотиков не аддитивны и имеют общий механизм реализации через угнетение активности α2-изоформы Na,K-АТФазы, однако эффекты различаются по способности плотиков к восстановлению своей структуры. Механизмы наблюдаемых эффектов остаются неясными и, возможно, реализуются при участии церамидов и сфингомиелиназы (Брындина и др., 2014; Bryndina et al., 2018).

Кратковременная двигательная разгрузка вызывает не только функциональные нарушения α2-изоформы Na,K-АТФазы, снижение уровня холестерина и дестабилизацию липидной фазы мембраны, но также изменение распределения нХР и структуры концевой пластинки. Перечисленные функциональные нарушения относятся к наиболее ранним событиям,

предшествующим мышечной атрофии, вызванной двигательной дисфункцией, что необходимо учитывать при поиске ключевых сигнальных событий, запускающих атрофическую программу.

Механизмы наблюдаемых нами при двигательной разгрузке структурно-функциональных нарушений пока не установлены. Однако мы полагаем, что в качестве основного в наблюдаемых нами эффектах фактора можно рассматривать АМФ-активируемую протеинкиназу (AMPK), как предложено некоторыми авторами (Vilchinskaya et al., 2017). AMPK является важнейшим фактором регулирования метаболизма скелетных мышц, процессов транскрипции, аутофагии и многих других, включая механизмы поддержания структурно-функциональной организации нервно-мышечного соединения (Nishimune et al., 2014; Carnio et al., 2014; Cervero et al., 2016). В частности, АМРК рассматривают в качестве фармакологической мишени при терапии миодистрофии Дюшенна (Ljubicic, Jasmin, 2013). AMPK также влияет на липидный метаболизм и, в скелетной мышце, помимо прочего, участвует в регуляции уровня мембранного холестерина (Ambery et al., 2017). Кроме того, АМРК обладает способностью влиять на Na,K-АТФазу (Benziane et al., 2012). По ряду данных, применение AICAR, агониста АМРК, в профилактическом варианте препятствует структурным нарушениям концевой пластинки и развитию симптомов мышечной атрофии (Cervero et al., 2016; Vilchinskaya et al., 2017).

АМРК является метаболическим сенсором, который активируется в условиях сократительной деятельности, когда возрастает потребление энергии клеткой и увеличивается внутриклеточное соотношение АМФ/АТФ, при снижении двигательной активности должен наблюдаться противоположный эффект. Анализ, проведенный д-ром А. В. Чибалиным, показал, что уровень фосфорилирования AMPK в камбаловидной мышце крысы вдвое снижен через 6 – 12 час разгрузки, что соответствует другим данным, полученным через 1 сутки разгрузки (Vilchinskaya et al., 2017). Кроме того, наблюдается усиление аутофагии, AMPK-зависимого фактора, являющегося известным регулятором структуры нервно-мышечного соединения (Carnio et al., 2014). Проверка возможной роли АМРК в наблюдаемых нами при двигательной разгрузке структурно-функциональных нарушениях требует специального анализа.

Наконец, нами показано, что уабаин и маринобуфагенин способны усиливать сокращения изолированной диафрагмы крысы. Экспериментально подтверждено, что этот эффект реализуется за счет α2-изоформы Na,K-АТФазы. Механизм положительного инотропного действия уабаина и маринобуфагенина в скелетной мышце остается неизвестным. Однако можно предположить его сходство с механизмом, реализуемым в гладкой и сердечной

мышцах за счет специфической кластеризации α2-изоформы Na,K-АТФазы с Na^+,Ca^{2+}-обменником, SERCA, рианодиновыми и IP_3 рецепторами в местах тесного прилегания плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму (Blaustein et al., 2016). В скелетной мышце аналогом такой ультраструктуры можно считать триадное соединение между Т-тубулами и концевыми цистернами саркоплазматического ретикулума, где локализованы дигидропиридиновые и рианодиновые рецепторы, Na^+,Ca^{2+}-обменник, SERCA (Sacchetto et al., 1996; Berchtold et al., 2000; Fill, Copello, 2002; Altamirano et al., 2014), а также значительный пул α2-изоформы Na,K-АТФазы (Williams et al., 2001; Cougnon et al., 2002; DiFranco et al., 2015).

Важно, что уабаин и маринобуфагенин оказались эффективными в субнаномолярных концентрациях, соответствующих уровню их циркулирующих эндогенных аналогов, что свидетельствует о возможности участия α2-изоформы Na,K-АТФазы в регуляции сократительной функции скелетной мышцы эндогенными кардиотоническими стероидами. Эти наши наблюдения подтверждаются другими данными, полученными на скелетной мышце генетически модифицированных мышей с уабаин-резистентной α2-изоформой Na,K-АТФазы с применением Digibind (антител, связывающих циркулирующие КТС) (Radzyukevich et al., 2009). В процитированной работе показано, что α2-изоформа может регулироваться эндогенными КТС, а физиологическая роль такой регуляции может заключаться в динамической адаптации скелетной мышцы к физической нагрузке.

ВЫВОДЫ

1) Особенностью распределения α2-изоформы Na,K-АТФазы является локализация одного из её пулов в области концевой пластинки скелетной мышцы крысы и мыши. Этот пул α2-изоформы за счет функционального взаимодействия с никотиновыми холинорецепторами участвует в механизме поддержания постсинаптического электрогенеза.

2) Хроническое введение никотина, моделирующее уровень циркулирующего никотина при курении табака, вызывает изоформ-специфические изменения электрогенной активности Na,K-АТФазы в скелетных мышцах крысы, причем наибольшую изменчивость демонстрирует α2-изоформа Na,K-АТФазы.

3) Удаление части мембранного холестерина сопровождается снижением электрогенной активности α2-изоформы Na,K-АТФазы и нарушением липид-упорядоченной фазы сарколеммы в скелетной мышце крысы. Аналогичный

эффект наблюдается при блокировании α2-изоформы Na,K-АТФазы уабаином. Эти нарушения наиболее выражены в постсинаптическом районе сарколеммы и полностью обратимы при встраивании в мембрану экзогенного холестерина, то есть в обоих случаях дестабилизация липидных плотиков обусловлена потерей мембранного холестерина. Полученные данные свидетельствуют о существовании реципрокного функционального взаимодействия между α2-изоформой Na,K-АТФазы и мембранным холестерином.

4) Изменение экспрессии мРНК и количества Na,K-АТФазы, а также ее электрогенной активности, наблюдаемые в камбаловидной мышце крысы в период от 6 ч до 72 ч двигательной разгрузки, носят адаптационный и изоформ-специфический характер и затрагивают только α2-изоформу Na,K-АТФазы. Снижение электрогенной активности α2-изоформы во внесинаптическом районе приводит к устойчивой деполяризации и снижению возбудимости мембраны. На постсинаптический пул α2-изоформы, помимо двигательной активности, действуют дополнительные факторы, способствующие восстановлению ее функционирования. Снижение электрогенной активности обоих пулов α2-изоформы не связано с нарушением ее локализации в сарколемме и является обратимым при стимуляции моторного нерва, что свидетельствует о важности двигательной активности для поддержания функционирования этой изоформы Na,K-АТФазы.

5) Кратковременное (6 ч) снижение двигательной активности камбаловидной мышцы крысы сопровождается нарушением липидной структуры сарколеммы, которое обусловлено потерей части мембранного холестерина. При этом функциональные нарушения α2-изоформы Na,K-АТФазы и дестабилизация мембранного холестерина сопровождаются снижением общей площади концевых пластинок, а также компенсаторным увеличением плотности распределения никотиновых холинорецепторов без изменения степени фрагментации их распределения.

6) Специфические ингибиторы Na,K-АТФазы уабаин и маринобуфагенин усиливают сокращения диафрагмы крысы, действуя через α2-изоформу Na,K-АТФазы. Данные лиганды эффективны в субнаномолярных концентрациях, соответствующих уровню их циркулирующих эндогенных аналогов, что подтверждает возможность участия α2-изоформы Na,K-АТФазы в регуляции сократительной функции скелетной мышцы эндогенными кардиотоническими стероидами.

7) В скелетной мышце α1-изоформа Na,K-АТФазы является функционально стабильной. Адаптационная пластичность α2-изоформы Na,K-АТФазы определяется особенностями локализации и регуляции ее различных

пулов, функциональными взаимодействиями с никотиновыми холинорецепторами и холестерином, специфической зависимостью от двигательной активности, а также участием в регуляции мышечного сокращения. Функциональные нарушения α2-изоформы Na,K-АТФазы относятся к наиболее ранним событиям, предшествующим мышечной атрофии, вызванной двигательной дисфункцией.

Основные публикации по теме диссертации

в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Petrov A.M., **Kravtsova V.V.**, Matchkov V.V., Vasiliev A.N., Zefirov A.L., Chibalin A.V., Heiny J.A., Krivoi I.I. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse // Am. J. Physiol. – Cell Physiol. 2017. Vol. 312, № 5. P. 627–637.
2. **Kravtsova V.V**., Petrov A.M., Matchkov V.V., Bouzinova E.V., Vasiliev A.N., Benziane B., Zefirov A.L., Chibalin A.V., Heiny J.A., Krivoi I.I. Distinct α2 Na,K-ATPase membrane pools are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse // J. Gen. Physiol. 2016. Vol. 147. P. 175–188.
3. **Kravtsova V.V**., Matchkov V.V., Bouzinova E.V., Vasiliev A.N., Razgovorova I.A., Heiny J.A., Krivoi I.I. Isoform-specific Na,K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle // Biomed. Res. Int. 2015. 720172.
4. **Кравцова В.В**., Петров А.М., Васильев А.Н., Зефиров А.Л., Кривой И.И. Роль холестерина в поддержании электрогенеза концевых пластинок диафрагмы крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158, № 9. С. 275–278.
5. Тимонина Н.А., **Кравцова В.В**., Михайлова Е.В., Соколова А.В., Михайлов В.М., Кривой И.И. Электрогенез концевых пластинок диафрагмы мышей MDX: эффект клеточной терапии // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2015. Сер. 3. Вып. 3. С. 66–74.
6. Васильев А.Н., **Кравцова В.В.**, Кривой И.И. Хроническое действие никотина на электрогенную активность Na^+,K^+-АТФазы и сократительные характеристики диафрагмы крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2011. Т. 97, № 11. С. 1204–1214.
7. Chibalin A.V., Heiny J.A., Benziane B., Prokofiev A.V., Vasiliev A.N., **Kravtsova V.V**., Krivoi I.I. Chronic nicotine exposure modifies skeletal muscle Na,K-ATPase activity through its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor and phospholemman // PLoS ONE. 2012. Vol.7, № 3. e33719.

8. Mikhailov V.M., Sokolova A.V., **Kravtsova V.V**., Zenin V.V., Kaminskaya E.V., Timonina N.A., Krivoi I.I. Non-myeloablative bone marrow stem cell transplantation for mdx mice myodystrophy therapy // J. Cell Sci. Ther. 2012. Vol. 3. P.122.
9. **Кравцова В.В**., Михайлов В.М., Соколова А.В., Михайлова Е.В., Тимонина Н.А., Никольский Е.Е., Кривой И.И. Восстановление электрогенеза скелетной мышцы после клеточной терапии миодистрофии у мышей mdx // Доклады Академии наук. 2011. Т. 441, № 2. С. 272–274.
10. Глашев М.М., Разговорова И.А., Михайлова Е.В., **Кравцова В.В**., Кривой И.И. Электрофизиологические и сократительные характеристики m. soleus крысы и монгольской песчанки при функциональной разгрузке // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2011. Сер. 3. Вып. 4. С. 73–83.
11. Heiny J.A., **Kravtsova V.V.**, Mandel F., Radzyukevich T.L., Benziane B., Prokofiev A.V., Pedersen S.E., Chibalin A.V., Krivoi I.I. The nicotinic acetylcholine receptor and the Na,K-ATPase α2 isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, № 37. P. 28614–28626.
12. **Кравцова В.В**., Шенкман Б.С., Михайлов В.М., Никольский Е.Е., Кривой И.И. Влияние функциональной разгрузки и дефицита дистрофина на локальную гиперполяризацию постсинаптической мембраны скелетного мышечного волокна // Биофизика. 2010. Т. 55, № 5. С. 834–841.
13. **Кравцова В.В**., Огнева И.В., Алтаева Э.Г., Разговорова И.А., Тяпкина О.В., Никольский Е.Е., Шенкман Б.С., Кривой И.И. Электрогенная активность Na,K-АТФазы и содержание ионов кальция в волокнах m. soleus крысы и монгольской песчанки при моделировании гравитационной разгрузки // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2010. Т. 44, № 2. С. 35–44.
14. Прокофьев А.В., Разговорова И.А., **Кравцова В.В**., Кривой И.И. Исследование хронического действия никотина на m. soleus крысы при помощи силиконовых имплантатов // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2010. Сер. 3. Вып. 1. С. 72–79.
15. Пономарева Е.В., **Кравцова В.В**., Качаева Е.В., Алтаева Э.Г., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Кривой И.И., Шенкман Б.С. Сократительные свойства изолированной m. soleus и ее скинированных волокон на ранних этапах гравитационной разгрузки: факты и гипотезы // Биофизика. 2008. Т. 53, № 6. С. 1087–1094.
16. Кривой И.И., **Кравцова В.В**., Алтаева Э.Г., Кубасов И.В., Прокофьев А.В., Драбкина Т.М., Никольский Е.Е., Шенкман Б.С. Снижение электрогенного вклада Na-K-АТФазы и мембранного потенциала покоя как возможный механизм накопления ионов кальция в волокнах m. soleus крысы при

кратковременной гравитационной разгрузке // Биофизика. 2008. Т. 53, № 6. С. 1051–1057.

17. **Кравцова В.В.,** Драбкина Т.М., Прокофьев А.В., Кубасов И.В., Васильев А.Н., Кривой И.И. Действие никотина на электрогенный вклад изоформ Na,K-АТФазы и сократительные характеристики скелетной мышцы крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 10. С. 1181–1190.
18. Krivoi I.I., **Kravtsova V.V**., Drabkina T.M., Prokofiev A.V., Nikolsky E.E., Shenkman B.S. Decrease of Na,K-ATPase electrogenic contribution and resting membrane potential of rat soleus after 3 days of hind limb unloading // J. Gravit. Physiol. 2008. Vol.15, № 1. P. 87–88.
19. Krivoi I.I., Drabkina T.M., **Kravtsova V.V**., Vasiliev A.N., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Mandel F. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na^+,K^+-ATPase // Pflugers. Archiv – Eur. J. Physiol. 2006. Vol. 452, № 6. P. 756–765.
20. Кривой И.И., Драбкина Т.М., **Кравцова В.В**., Васильев А.Н., Ващинкина Е.В., Прокофьев А.В., Кубасов И.В. Роль α2-изоформы Na^+,K^+-АТФазы в положительном инотропном эффекте уабаина и маринобуфагенина в диафрагме крысы // Биофизика. 2006. Т.51, № 5. С. 906–911.
21. Кривой И.И., Драбкина Т.М., Васильев А.Н., **Кравцова В.В.** О роли уабаин-чувствительной α2 изоформы Na^+,K^+-АТФазы в скелетной мышце крысы // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии. 2006. Т. 23, № 2. С. 139–147.
22. Кривой И.И., Драбкина Т.М., Васильев А.Н., **Кравцова В.В**., Мандел Ф. Анализ взаимодействия никотинового холинорецептора и Na^+,K^+-АТФазы в скелетной мышце крысы и мембранном препарате электрического органа Torpedo // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92, № 2. С. 191–203.
23. Кривой И.И., **Кравцова В.В**., Прокофьев А.В., Ващинкина Е.В., Кубасов И.В., Драбкина Т.М. Влияние маринобуфагенина на электрофизиологические и сократительные характеристики диафрагмы крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92, № 12. С. 1463–1473.
24. Драбкина Т.М., Ващинкина Е.В., Прокофьев А.В., Васильев А.Н., **Кравцова В.В**., Кривой И.И. Положительный инотропный эффект и изменения электрогенеза в диафрагме крысы при частичной и полной блокаде уабаин-чувствительной изоформы Na,K-АТФазы // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2006. Сер. 3. Вып. 2. С. 60–67.

25. Кривой И.И., Драбкина Т.М., Васильев А.Н., **Кравцова В.В**., Добрецов М.Г. Влияние блокады уабаином α2-изоформы Na,K-АТФазы на электрофизиологические и сократительные характеристики в диафрагме крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2005. Т. 91, № 5. С. 530–542.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АМРК: АМФ-зависимая/активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase)
АМФ: аденозинмонофосфат
АТФ: аденозинтрифосфат
АХ: ацетилхолин
КТС: кардиотонические стероиды
МβЦД/хол: комплекс метил-β-циклодекстрин + холестерин
МβЦД: метил-β-циклодекстрин
МПП: мембранный потенциал покоя
мРНК: матричная рибонуклеиновая кислота
нХР: никотиновый холинорецептор
α-БТХ: α-бунгаротоксин
CTxB: субъединица B холерного токсина
EC_{50}: полумаксимальная эффективная концентрация
FXYD: фенилаланин-Х-тирозин-аспартат
IC_{50}: концентрация полумаксимального ингибирования
IP_3 рецептор: внутриклеточный Ca^{2+}-канал активируемым инозитол-1,4,5-трифосфатом
NMG-Cl: N-methyl-d-glucamine chloride
Oua: уабаин
SERCA: сарко-эндоплазматический ретикулум Ca^{2+}-АТФаза (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase)