

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций
Кафедра «Медицинская физика»

Диссертация допущена к защите
зав.кафедрой «МФ»
_____ И.Б. Безпрозванный

«__» _____ 2017 г.

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
МАГИСТРА

Тема: *ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ В РЕГУЛЯЦИИ
КАЛЬЦИЕВОЙ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ NMDA РЕЦЕПТОРОВ*

Направление: 16.04.01 Техническая физика

Магистерская программа: *16.04.01_16 Физико-химическая биология и
биотехнология*

Работа выполнена на базе _____
название лаборатории и организации

Выполнил студент гр. 63401/13: _____ Погужельская Е.Э.
подпись

Руководители: _____ профессор каф. МФ, д.ф-м.н., доцент, Власова О.Л.
подпись

_____ зав.лаб. ИЭФБ РАН, д.б.н., Антонов С.М.
подпись

Санкт-Петербург

2017

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	3
ABSTRACT	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Подтипы NMDA рецепторов	9
Десенситизация NMDA рецепторов	10
Na ⁺ /Ca ²⁺ обменник	11
Формы Na ⁺ /Ca ²⁺ обменников	11
Стехиометрия Na ⁺ /Ca ²⁺ обменников	12
Эксперименты с литием и KBR.....	13
Липидные плотки	16
Липидные плотки нейронов.....	17
NMDAR и липидные плотки	18
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	21
Выращивание первичной культуры нейронов.....	21
Подготовка крыс	21
Подготовка стекол для выращивания первичной культуры.....	21
Приготовление первичной культуры	21
Регистрация токов методом локальной фиксации потенциала	23
Ca ²⁺ -имаджинг	24
РЕЗУЛЬТАТЫ	25
Влияние ингибирования NCX литием на токи NMDAR.	25
Влияние ингибирования NCX на токи вход кальция в нейроны через NMDAR	27
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	29
Выводы	33
Список литературы.....	34

РЕФЕРАТ

С. 42, Рис. 4, Табл. 0, 87 источников.

NMDAR, NMDA-РЕЦЕПТОР, НАТРИЙ-КАЛЬЦИЕВЫЙ ОБМЕННИК, Na⁺/Ca²⁺ ОБМЕННИК, ДЕСЕНСИТИЗАЦИЯ, ЛИПИДНЫЕ ПЛОТИКИ, ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ, МЕМБРАННЫЕ ДОМЕНЫ, ХОЛЕСТЕРИН, МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИН, ЛИТИЙ, KB-R7943, КАЛЬЦИЕВЫЙ СИГНАЛИНГ

Активация различных типов NMDA рецепторов (NMDAR) может иметь разнонаправленное действие, как нейропротекторное, так и нейротоксическое. Одним из путей влияния на функции NMDA рецепторов является модулирование их кальций-зависимой десенситизации. Ранее нами было показано, что натрий-кальциевый обменник (NCX) способен уменьшать десенситизацию NMDAR. NCX эффективно выводит из клетки вошедший через канал NMDAR кальций, не давая ему вступить в комплекс с кальмодулином и связаться с рецептором, деактивируя его. Если заблокировать NCX литием или селективным ингибитором KB-R7943, то десенситизация NMDAR усиливается. Столь быстрое взаимодействие предполагает близкое расположение участников. Было предположено, что вместе их удерживают липидные плотики. Разрушение плотиков метил-β-циклодекстрином и соответственно разобщение NMDAR и NCX давало такой же эффект на кальцевые ответы нейронов, как и блокирование NCX литием. При измерении токов NMDAR разобщение NCX и NMDAR и блокада NCX одинаково усиливали десенситизацию NMDAR. Таким образом, функции NMDAR могут управляться изменениями в колокализации рецептора с обменником.

ABSTRACT

P. 42, Fig. 4, Tabl. 0, 87 sources.

NMDAR, NMDA-RECEPTOR, SODIUM-CALCIUM EXCHANGER, Na⁺ / Ca²⁺ + EXCHANGER, DESENSITIZATION, LIPID RAFTS, MEMBRANE MICRODOMAIN, CHOLESTEROL, METHYL- β -CYCLODEXTRINE, LITHIUM, KB-R7943, CALCIUM SIGNALING

An activation of different types of NMDA receptors (NMDARs) can cause differently directed action: neuroprotective or neurotoxic. One of the ways to change NMDARs functions is to modulate their calcium-dependent desensitization. Previously we have demonstrated that the sodium-calcium exchanger (NCX) can reduce NMDARs desensitization. NCX effectively removes calcium that enters the cell via the channel of NMDAR. This prevents calcium from interacting with calmodulin and thus blocks calmodulin binding to receptor and its deactivation. Blocking NCX with lithium or selective inhibitor KB-R7943 increases NMDARs desensitization. This fast interaction assumes close localization of participants inside lipid rafts. Breaking of lipid rafts with methyl- β -cyclodextrin uncouples NMDAR and NCX, which produced the same effect as NCX block by lithium, as it can be seen by neuronal calcium responses. NMDAR and NCX uncoupling or NCX block also produced similar effects on whole-cell transmembrane currents, showing increased NMDARs desensitization. Thus NMDAR functions can be modulated by colocalization of the receptor with the exchanger.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

KB-R7943 - 2-[2-[4-(4-нитробензилокси)фенил]этил]изотио мочевины

NCX - калий независимый натрий-кальциевый обменник

NMDA - N-метил-D-аспарат

NMDAR - рецепторы, связывающие N-метил-D-аспарат

Глу - глутаминовая кислота

M β CD – метил- β -циклодекстрин

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы глутамата NMDA-типа играют принципиальную роль в онтогенезе ЦНС и постнатальном функционировании мозга позвоночных, так как обеспечивают возбуждающую синаптическую передачу и синаптическую пластичность, что определяет их ключевое значение в процессах формирования памяти и реализации когнитивных функций мозга. Нарушения функций NMDA рецепторов в результате их гиперактивации вызывают эксайтотоксический стресс, приводящий к гибели нейронов путем некроза и апоптоза. Эти процессы вовлечены в патогенез многих социально значимых психических и нейродегенеративных заболеваний (инсульт, мигрень, шизофрения, гипергомоцистеинемия, эпилепсия, болезнь Альцгеймера и др.). В зависимости от отдела мозга и функционального состояния нейронов, в них экспрессируется NMDA рецепторы различного субъединичного состава, имеющие функциональные и фармакологические особенности. Активация различных типов NMDA рецепторов может иметь разнонаправленное действие, как нейропротекторное, так и нейротоксическое. Несмотря на общее понимание значения NMDA рецепторов для патогенеза психических и нейродегенеративных заболеваний, роль NMDA рецепторов определенных субъединичных составов, различающихся по кинетике активации и десенситизации, проводимости и фармакологическим характеристикам, остается плохо изученной. Кроме того, неизвестны механизмы внутриклеточной регуляции десенситизации NMDA рецепторов.

Существующие в настоящее время фармакологические подходы к лечению инсульта, эпилепсии, мигрени, шизофрении и других нервных патологий, связанных с нарушениями функций NMDA рецепторов, подразумевают использование фармакологических препаратов, подавляющих активность всех типов NMDA рецепторов. В медицинской практике используются блокаторы каналов NMDA рецепторов такие как, мемантин, амантадин и кетамин. Поскольку про- или антиапоптотический эффект активации NMDA рецепторов

зависит от их локализации на нейроне и от субъединичного состава, ингибирование проводимости каналов всех рецепторов сопровождается побочными эффектами, сопряженными с нарушением когнитивной функции. Такая стратегия терапии абсолютно не учитывает возможность подавления активности NMDA рецепторов путем воздействия на механизмы избирательной регуляции их десенситизации или внутриклеточных сигнальных каскадов. Поиск новых способов фармакологического воздействия, подавляющих только нейротоксический эффект от гиперактивации NMDA рецепторов, но не нормальную синаптическую передачу, может стать основой для создания нового класса лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных расстройств.

Одним из путей влияния на функции NMDA рецепторов является модулирование их кальций-зависимой десенситизации. Частичная деактивация NMDA рецепторов, входящих через них кальцием определяется взаимодействием N-терминального домена рецептора с примембранным кальций-связывающим белком кальмодулином. Удаление кальция из примембранной области ионными транспортными механизмами должно существенно менять кальций-зависимую десенситизацию NMDA рецепторов. Ранее мною совместно с коллегами было проведено изучение влияния ингибитора натрий-кальциевого обменника (NCX) веществом KB-R7943 на параметры десенситизации NMDA рецепторов [1]. Нами было показано, что накопление внутриклеточного кальция вблизи внутриклеточного домена NMDA рецептора ограничивается его удалением посредством NCX. В свою очередь, ингибирование NCX препятствует удалению из клетки кальция, входящего через NMDA рецепторы, что значительно усиливает кальций-зависимую десенситизацию последних.

Полученные данные о функциональной связи NMDA рецепторов и NCX наводят на мысль об их тесной пространственной локализации, в частности в липидных плотиках.

Целью данного исследования была экспериментальная проверка этого предположения.

Задачи:

Построить концентрационную кривую ингибирования токов NMDA рецепторов ионами лития в контроле и при разрушении липидных плотиков метил-бета циклодекстрином.

Исследовать NMDA-индуцированный вход кальция при воздействии антагонистов натрий-кальциевого обменника лития и KB-R7943 до и после обработки клеток метил-бета-циклодекстрином.

Подтипы NMDA рецепторов

Ионотропные рецепторы глутамата представляют собой лиганд-активируемые ионные каналы. К этой группе относятся рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR), рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), каинатные рецепторы и рецепторы L-2-амино-4-фосфорномасляной кислоты (L-AP4). Как видно из названия данной группы белков, общим лигандом для них является глутаминовая кислота (Глу).

Среди этих рецепторов наибольшей проницаемостью для ионов кальция обладают NMDAR [2,3]. Они являются трансмембранными интегральными белками. Все они состоят из четырёх субъединиц (каждая из которых содержит в себе более 900 аминокислотных остатков). Субъединицы вместе формируют в центре рецептора ионную пору, состоят они из четырёх полуавтономных доменов: внеклеточный аминоконцевой домен, лиганд-связывающий домен, который также находится в межклеточном пространстве, трансмембранный домен, составленный из трех трансмембранных областей (M1, M3 и M4) и внутримембранной петли (p-loop) или региона M2, формирующего селективный фильтр, а также внутриклеточный концевой домен, содержащий карбоксильные группы. Для сборки функционирующего NMDAR необходимы две GluN1 субъединицы в сочетании с двумя GluN2 субъединицами, или же комплекс из GluN3 и GluN2 субъединиц [4,5]. В некоторых типах нейронов наблюдаются тригетеромерные рецепторы: GluN1/GluN2A/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2C, GluN1/GluN2B/GluN2D, GluN1/GluN2A/GluN2D [6].

Субъединичный состав NMDAR в разных отделах ЦНС сильно варьирует, а также претерпевает сильные изменения на протяжении всего цикла раннего постнатального развития. Ввиду того, что GluN1 обязательно присутствует во всех типах NMDAR, изменения касаются в основном экспрессии GluN2. Лучшей иллюстрацией этого процесса является переход от GluN1/GluN2B состава рецепторов, преобладающего в первые недели постнатального развития в коре больших полушарий, гиппокампе к GluN1/GluN2A-содержащим рецепторам [7].

Характерной особенностью NMDAR является то, что для активации, то есть для открытия канала, им необходимо связаться не только с самим агонистом, но

также ещё и с ко-агонистом [8,9]. Как правило, в качестве агониста выступает Глу, он взаимодействует с GluN2 субъединицами NMDAR. GluN1 субъединицы содержат сайт связывания глицина. Также с GluN1 субъединицами могут взаимодействовать D-серин, D-аланин и другие эндогенные и синтетические соединения [8–14]. С GluN2 могут связываться NMDA, L,D-аспартат, L-гомоцистеин и др. [15]. Кроме того, для NMDAR характерна относительно медленная кальций-зависимая деактивация [6,16]; высокая проницаемость для ионов Ca^{2+} [2,3]; и сильная степень потенциал-зависимой блокады канала физиологическими концентрациями ионов Mg^{2+} , присутствующего во внеклеточной среде [17].

Ток ионов Ca^{2+} через NMDAR имеет важное значение для многих видов синаптической пластичности, играет важную роль в механизмах обучения и памяти [18]. С другой стороны, дисфункция NMDAR может стать причиной нейродегенеративных заболеваний, шизофрении, депрессии, хронической и невропатической боли, а также потери нейронов после ишемии или инсульта [19,20].

Десенситизация NMDA рецепторов

Все рецепторы глутамата подвержены десенситизации. Десенситизация – это уменьшение ответа на стимул, при его постоянном воздействии на рецептор. Быстрее всего этот процесс происходит в АМПА и каинатных рецепторах. За время порядка 20 мс амплитуда токов может падать почти на 90%. Однако в NMDAR этот процесс происходит медленнее и с меньшей амплитудой уменьшения токов, а в GluN2C- и GluN2D- содержащих рецепторах он практически отсутствует.

Десенситизация NMDAR относительно хорошо изучена и включает в себя следующие механизмы: глицин-зависимая десенситизация [21,22]; Ca^{2+} -зависимая инактивация; [23,24]; Zn^{2+} -зависимая десенситизация, и глицин/ Ca^{2+} -независимая десенситизация [25–27].

В настоящей работе будет рассмотрена кальций-зависимая десенситизация (также известная как Ca^{2+} -зависимая инактивация). В упрощенной модели

активация NMDA-рецепторов ко-агонистами приводит к притоку ионов Ca^{2+} через канал внутрь клетки. Связывание Ca^{2+} с близлежащим кальмодулином позволяет кальмодулину связаться непосредственно с рецептором либо через сайты с низким сродством, либо с высоким сродством на COOH -конце субъединицы NR1, регионом, который, как известно, является существенным для инактивации.. Связывание комплекса кальмодулин-кальций с C1-доменом NMDAR приводит к инактивации канала NMDA-рецептора [28]. Активированный кальцием кальмодулин вытесняет α -актинин2 из сайтов связывания NMDA-рецептора. Предполагается, что именно диссоциация NMDA-рецептора от цитоскелета вызывает конформационные изменения рецептора, уменьшающие его вероятность открытия [29]. NR2 субъединица рецептора также участвует в процессе кальций-зависимой десенситизации [24]. Её внутриклеточная петля M2-3 модулирует зависимость от кальция инактивацию, взаимодействуя с C-концом NR1.

Na⁺/Ca²⁺ обменник

Формы Na⁺/Ca²⁺ обменников

В плазматической мембране клеток ЦНС присутствует два семейства $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников: K^+ -зависимые (NCX) и K^+ -независимые (NCKX). Они играют важную роль в Ca^{2+} гомеостазе. NCX и NCKX обменники осуществляют свою функцию, а именно, удаление кальция из клетки, за счёт электрохимического градиента Na^+ (для K^+ -независимых обменников) или Na^+ и K^+ (для K^+ -зависимых). Данный градиент поддерживается благодаря работе Na^+ , K^+ - АТФазы [30].

Семейство NCX включает в себя NCX1, NCX2, и NCX3 изоформы обменников, в то время как в семейство NCKX входят NCKX1, NCKX2, NCKX3, NCKX4, NCKX5, и NCKX6 подтипы. Альтернативный сплайсинг NCX1 и NCX3, NCKX1, и NCKX2 обеспечивает дополнительный уровень гетерогенности этих белков [31].

NCX и NCKX изоформы экспрессируются в различных областях головного мозга [32,33]. Их экспрессия изменяется в процессе развития [34]. NCKX изоформы преимущественно экспрессируются в нейронах [35], однако, NCKX1, в отличие от других NCKX обменников, обильно экспрессируется только в сетчатке [36]. Что касается отдельных нейронов, NCX1 [37] и NCKX2 [38] изоформы в большей степени представлены в нервных окончаниях.

Стехиометрия $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников

Хотя и существует устоявшееся мнение относительно стехиометрии NCKX: $4 \text{Na}^+ / (1 \text{Ca}^{2+} + 1 \text{K}^+)$ [39], в отношении стехиометрии семейства NCX всё ещё ведётся дискуссия. Так, некоторое время назад считалось, что соотношение составляет $3 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$ (3:1) [40], однако позже был предложен другой вариант: $4 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$ (4:1) [41,42]. Последние данные показывают, что 3:1 является доминирующим режимом работы обменников, но дополнительные режимы возможны, что объясняет имеющиеся несоответствия [43]. NCX и NCKX могут создавать разность потенциалов на мембране благодаря тому, что общий заряд всего переносимого ими Na^+ превышает общий заряд переносимого Ca^{2+} .

Будут ли NCX и NCKX откачивать Ca^{2+} наружу или же закачивать его обратно внутрь клетки (реверсивный режим) определяется разницей между потенциалом на мембране и их равновесным потенциалом. Если мембранный потенциал ниже, как при нормальных физиологических условиях, то NCX и NCKX обменники будут работать в прямом режиме, удаляя Ca^{2+} из клетки. При падении градиента Na^+ и потенциала мембраны NCX и NCKX начнут переходят в реверсивный режим закачивая кальций в клетку.

Активация ионотропных рецепторов глутамата приводит к значительному повышению уровня Na^+ в цитозоле [44–46]. Это может приводить к снижению эффективности работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников. Чтобы определить, способствует ли при реверсивном режиме работы NCX или NCKX приток кальция в клетку эксайтотоксичности, необходимо ингибировать реверсивный режим работы данных обменников. *In vitro* ингибирование возможно путём замены ионов Na^+ на ионы Li^+ или Cs^+ , что в значительной степени уменьшит количество ионов

кальция, переносимого обменниками [40,47]. В то время как Li^+ ингибирует экструзию Ca^{2+} из нейронов через NCX, он не влияет на токи, опосредованные NMDAR [48]. В подтверждении этого, NMDAR-опосредованные токи вонклеточных растворах, содержащих либо равные концентрации ионов Na^+ , либо Li^+ не различались по амплитуде [1]. В условиях подавления активности Na^+ , K^+ -АТФазы убаином, замена Na^+ на Li^+ или Cs^+ даёт значительное уменьшение NMDA-индуцированной эксайтотоксичности [49]. Также возможен подход, в котором обратный режим работы NCX ингибируется веществом KB-R7943 (2-[2-[4-(4-нитробензилокси)фенил]этил]изотио мочевины) - селективный ингибитор NCX, а активность NCKX подавляется удалением из среды иона K^+ . KBR способен ингибировать как прямой, так и обратный режимы активности NCX. Например, его IC_{50} для NCX составляет 1,9 и 3 мМ для обратного и прямого режимов действия соответственно [50]. При таком подходе появляется возможность сравнить вклад NCX и NCKX типов обменников в процессы патологического повышения концентрации Ca^{2+} в нейроне. Было показано, что в культуре гранулярных клеток мозжечка оба типа обменников вносят примерно равный вклад в эти процессы [51], а вот в переднем мозге значительно более важную роль играют NCX обменники [52].

Тем не менее, значение натрий-кальциевых обменников в поддержании кальциевого гомеостаза нервных отростков (дендритов, аксонов), а также в местной регуляции кальций-зависимой десенситизации NMDAR практически не изучена.

Эксперименты с литием и KBR

Литий широко используется в психиатрической практике для профилактики и лечения маниакально-депрессивных расстройств, регулируя глутаматергическую нейротрансмиссию, в частности опосредованную NMDAR [53]. Точный механизм действия лития на NMDAR не был известен, но предполагалось, что введение лития в организм оказывает влияние на фосфорилирование NMDAR, и тем самым на его функцию. Тем не менее, нейротоксичность, приписываемая солям лития в терапевтических дозах, также

имела место, и проявлялась в виде кратковременных или длительных неврологических нарушений у пациентов. В 2013 году группа учёных из Болгарии показала, что и при остром, и при хроническом воздействии литиему крыс наблюдались нейродегенеративные изменения головного мозга, выраженные в образовании большого количества очагов губчатой ткани [54].

На основании ранее полученных нами данных [1], было выдвинуто предположение о том, что ингибирование NCX способствует кальций-зависимой инактивации NMDAR. При нормальном режиме работы NCX (рис. 1 А), Ca^{2+} , вошедший в клетку через канал рецептора, не успевает накапливаться в большом количестве в примембранном пространстве клетки - NCX эффективно удаляет вошедший кальций из клетки. Кальциевая десенситизация NMDAR в этом случае проявляется в уменьшении амплитуды равновесного тока до половины пикового значения, при совместной аппликации NMDA и глицина. Если внеклеточный кальций отсутствует, то он не входит через канал рецептора, а следовательно не накапливается в цитоплазме и не вызывает инактивацию рецептора (Рис. 1 Б). В этом случае блокирование NCX при помощи Li^+ (рис. 1 Г) или KB-R7943 (рис. 1 Е) не изменяет ситуацию. В присутствии внеклеточного Ca^{2+} если ингибировать $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник литием (рис. 1 В) или KB-R7943 (рис. 1 Е), то входящий извне кальций накапливается в примембранной зоне и инактивирует NMDAR, связываясь с его внутриклеточным сайтом. При этом регистрируемый при аппликации NMDA ток выявляет почти полную десенситизацию NMDAR.

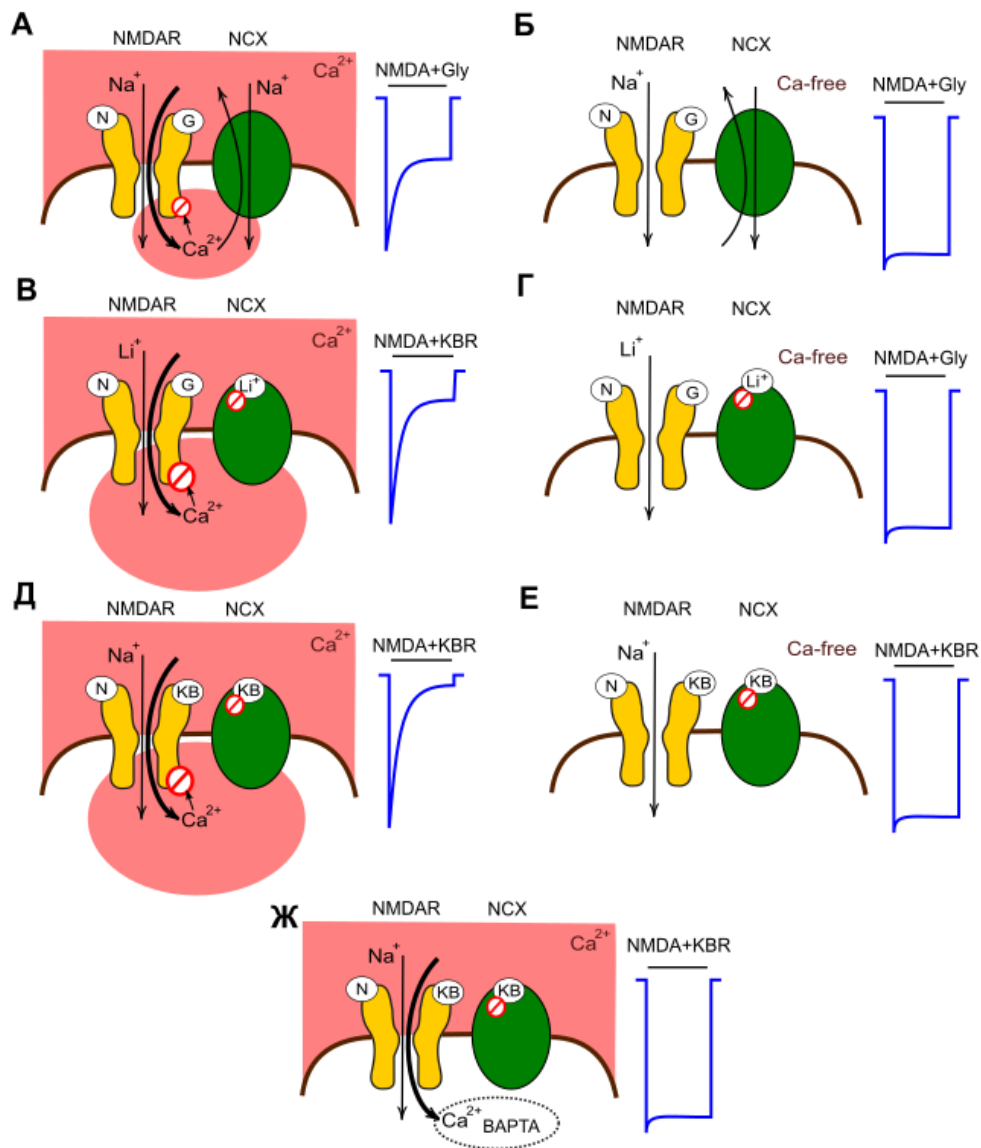


Рис. 1. Предполагаемый механизм функционального взаимодействия NMDAR и NCX. N – NMDA, G – глицин, KB – ингибитор NCX вещество KB-R7943. А-Ж слева – схематически представлены варианты взаимодействия NCX и NMDAR, справа – условно обозначены формы ответов NMDAR в данных ситуациях.

При использовании лития степень десенситизации NMDAR несколько меньше, что, скорее всего, это связано с тем, что Li^+ , хоть плохо, но всё же транспортируется NCX, а следовательно кальций из клетки частично удаляется. В случае же связывания внутриклеточного кальция хелатором (Рис. 1 Ж) кальций входящий в цитоплазму через NMDAR будет преимущественно связываться хелатором, а не с внутриклеточным доменом NMDAR или с NCX. В этом случае даже во внеклеточном растворе с кальцием KBR хоть и блокирует

NCX, но не вызывает ингибирования токов NMDAR, поскольку весь входящий кальций связывается хелатором.

Для столь быстрого взаимодействия NMDAR и NCX должны находиться в мембране клетки на небольшом расстоянии друг от друга. Что же их удерживает вместе?

Липидные плотки

Вскоре после открытия жидкостно-мозаичной модели биологических мембран ряд исследований продемонстрировал, что совокупные и кооперативные свойства сложных липидных смесей, включая те, которые составляют биологические мембраны, являются движущей силой для создания латерального порядка и локальной организации внутри клеточных мембран [55–57]. Липиды в сложных липидных смесях имеют ограниченную растворимость, что приводит к разделению флюидно-флюидной фазы. Структура гидрофобного остатка является основным определяющим фактором различий в температуре плавления цепей, что, в свою очередь, приводит к разделению фаз в смесях липидов, а это приводит к пространственному разделению доменов с различной текучестью [58–60]. Взаимодействия между конкретными липидами (например, холестерином, относительно насыщенными липидами и гликозилированными липидами) в плоскости мембраны приводят к формированию функционально важных, относительно упорядоченных мембранных областей, которые могут привлекать в эти скопления другие липиды и белки [61,62]. В 2006 году на Главном симпозиуме по липидным плоткам и клеточным функциям липидные плотки (или рафты) были определены как гетерогенные, динамичные, насыщенные холестерином и сфинголипидами мембранные нанодомены (100–200 нм), которые при кластеризации благодаря белково-белковым и белок-липидным взаимодействиям могут образовывать микродомены (>300 нм) [63]. Причём под динамичностью понимается как способность плотиков латерально перемещаться в пределах липидного слоя, так непостоянство их состава: непрерывно происходит процесс присоединения одних липидов и белков, и

отсоединения других. Плотики присутствуют как во внутреннем, так и во внешнем слоях асимметричной клеточной мембраны и предположительно могут быть связаны между собой [64,65], образуя функциональные платформы для регуляции клеточных процессов [66].

Липидные плотики нейронов

Мозг - это орган, имеющий самое высокое содержание липидов в организме человека [67–69]. Нейронные клетки высокообогатены сфинголипидами, особенно гликосфинголипидами, которые обычно являются очень незначительными компонентами клеток вне нервной системы. Липиды играют существенную роль в нормальном развитии и функционировании нервной системы. Нейроны и серое вещество мозга высокообогатены ганглиозидами (содержащие сиаловую кислоту гликосфинголипиды [70]) и характеризуются очень высокой степенью сложности и гетерогенностью ганглиозидных участков молекул [71]. Также клетки мозга богаты холестерином [72,73] и демонстрируют высокий уровень поглощения незаменимых жирных [74]. Гомеостаз липидов головного мозга жестко регулируется в течение всей жизни организма: начиная с развития нервной системы и заканчивая процессами старения.

Локализация мембранно-ассоциированных белков в плотной мембранной среде с высокой степенью поперечного порядка, например, в липидных плотиках, имеет важные прямые последствия для трехмерной структуры белка, включая индукцию конформационных изменений в полипептидной цепи, что может влиять на функциональную активность (например, каталитическую активность связанного с мембраной фермента или сродство лиганда к транспортеру или рецептору мембраны). Помимо этого, ограничение боковой подвижности, обусловленное ассоциацией с мембранным доменом, характеризующимся пониженной текучестью по отношению к самому мембранному бислою, может значительно влиять на взаимодействия мембранного белка. Удержание конкретного белка в липидном плотике может препятствовать его взаимодействию с другими белками, которые

преимущественно локализованы в областях жидкой мембраны или в другом липидном домене. Таким образом липидные плотки ингибируют образование сигнальных комплексов на уровне плазматической мембраны и последующие сигнальные каскады. И наоборот, совместная локализация различных белков в одном и том же липидном домене способствует их взаимодействию между собой. К тому же накопление белка в богатой липидами области мембраны, характеризующейся высокой степенью латерального порядка, может значительно повысить вероятность установления функционально значимых белок-липидных взаимодействий. Таким образом, липидные плотки служат сигнальными платформами для многих событий в развитии и поддержании нейрональных функций и взаимодействий между нейронами и глиальными клетками.

NMDAR и липидные плотки

Известно, что NMDAR ассоциированы с липидными плотками, причём субъединичная композиция ассоциированных с липидными плотками NMDAR изменяется в процессе развития [75,76]. Также есть данные о том, что эксайтотоксичность нейронов зависит от уровня холестерина в мембране клеток [77,78]. При экстракции холестерина из мембран «плотки» разрушаются. По данным Abulrob 2005 только те циклодекстрины, которые понижают уровень холестерина, перераспределяли субъединицу NR2B NMDA-рецептора из Triton X-100 нерастворимых мембранных доменов до растворимых фракций. Также они проявляли нейропротекторные свойства. Ponce и коллеги показали, что применение ингибиторов синтеза холестерина симвастатина, который ингибирует первую стадию синтеза холестерина, или AY9944, который ингибирует последнюю стадию синтеза холестерина, защищало нейроны от NMDA-индуцированной гибели на 70% и 54%, соответственно. Обработка этими соединениями снижала уровень холестерина в мембранах нейронов на 35 и 13% соответственно. Симвастатин и AY9944 уменьшали ассоциацию субъединицы NR1 NMDA-рецепторов с липидными плотками на 42% и 21% соответственно,

но не изменяли суммарную экспрессию NR1. Добавление холестерина уменьшало нейропротективный эффект симвастатина и AY9944 и частично возвращало ассоциацию NMDAR1 с липидными плотиками.

При исследовании воздействия снотворного пентобарбитала на мембранные плотики нейронов, чьими основными мишенями считаются NMDAR и ГАМК-рецепторы, было показано сокращение общего белка, связанного с плотиками, с более высоким снижением NMDAR по сравнению с рецептором ГАМК. Вполне вероятно, что липидные плотики могут быть медиаторами при анестезиологическом действии данного препарата [79].

При обработке нейронов агентами, приводящими к снижению уровня холестерина, было показано уменьшение количества кальция, входящего в клетки в ответ на аппликацию агонистов NMDAR [80,81], и понижение уровня токов NMDAR [82–84]. Однако манипуляции с холестерином не влияют на амплитуду ответов AMPA и каинатного рецепторов. На гранулярных клетках мозжечка крыс Koginek и соавторы показали, что снижение ответов NMDAR при истощении уровня холестерина является результатом уменьшения вероятности открытия ионного канала, тогда как увеличение десенситизации рецептора является результатом увеличения константы скорости входа в десенситизированное состояние. При этом количество NMDAR в мембране, аффинность агониста, проводимость канала рецептора и время нахождения в открытом состоянии не изменялись в клетках, обедненных холестерином.

Стоит отметить, что у Abulrob и соавторов применение нейропротекторных циклодекстринов, в том числе M β CD, имело минимальное влияние на опосредованное NMDA-рецепторами увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺, а также на снижение токов NMDAR. Однако эти данные противоречат результатам остальных групп, проводивших подобные исследования. Возможно имеют место ошибки в постановке экспериментов. Например, в случае с воздействием на токи NMDAR – слишком короткое время обработки клеток циклодекстринами, по сравнению с другими исследованиями.

В 2014 году группа исследователей, которая занимается изучением колокализации и взаимодействия белков, имеющих отношение к кальциевому

гомеостазу и окислительно-восстановительным реакциям в мембране нейронов, используя явление передачи энергии флуорофоров посредством фёстеровского резонанса (FRET) показала, что NMDAr и NCX расположены в одних и тех же липидных плотиках, на расстоянии не более 100 ангстрем друг от друга [81,85].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание первичной культуры нейронов

Подготовка крыс

Для выделения пренатальной культуры нейронов необходимы животные с датированным сроком беременности. Для этого использовали метод вагинальных мазков. Из группы крыс линии Вистар отбирались самки на стадии проэструса – раннего эструса и вечером этого же дня подсаживались к самцам. На следующий день брали анализ микроскопического содержимого вагинальных мазков на наличие сперматозоидов. День, когда удавалось обнаружить сперматозоиды в мазке, считался первым днем беременности животного.

Подготовка стекол для выращивания первичной культуры

Для очистки от загрязнений стёкла диаметром 7 мм и толщиной 0.16 мм (Zeiss) выдерживали 10 мин в ацетоне, затем дважды промывали этиловым спиртом. Далее все действия производили в ламинарном шкафу. Стёкла пинцетом, пронося над огнём, раскладывали в чашки Петри диаметром 35 мм по 5-6 штук в каждую. Раскапывали поли-D-лизин (0,2 мг/мл) по 20-40 мл на каждое стекло. Чашки со стёклами, залитыми поли-D-лизином, выдерживали при комнатной температуре 1 час (или при +4° в течении ночи). Затем поли-D-лизин убирали со стёкол при помощи пипетки или отсоса. Промывали стёкла в чашках стерильной водой 3 раза по 2 мл на каждую чашку. После того, как остатки поли-D-лизина были отмыты, чашки помещались на просушку и стерилизацию в ламинар под ультрафиолет на 20 минут. Подготовленные стёкла можно хранить при +4° в закрытой ёмкости в течении двух недель.

Приготовление первичной культуры

Крыс линии Вистар на 16-17 день беременности усыпляли с помощью ингаляции CO₂. Газ подавался в специальный пластиковый бокс, где находилось животное. Смерть констатировалась по прекращению сердцебиения. После остановки сердца клетки мозга продолжают жить ещё некоторое время, поэтому

очень важно максимально быстро выделить их и поместить в питательную среду.

После констатации смерти, из крысы извлекались эмбрионы, очищались от оболочек и помещались в чашку Петри, наполненную раствором Хенкса и стоящую на льду. Для лучшей выживаемости нейронов, все этапы выделения клеток должны производиться при 0°. Далее производилась декапитация эмбрионов с последующим выделением головного мозга. Головной мозг тщательно очищался от оболочек. Полушария отделяли от мозжечка, а затем разделяли между собой. Кору каждого из полушарий использовали для дальнейшего приготовления культуры [86].

Полученные фрагменты коры больших полушарий головного мозга крысы подвергали ферментативной обработке трипсином (0,04 мг/мл;Sigma-Aldrich, США) при температуре 37° в течении 30 минут. Затем, в целях остановки дальнейшей трипсинизации и формирования конгломератов клеток, к ним добавлялся ингибитор трипсина 300 мкл (0,4 мг/мл;Sigma-Aldrich, США), 30 мл ДНКазы (0,4 мг/мл;Sigma-Aldrich, США) и 300 мкл сыворотки. Клетки ресуспендировались пипеткой 1мл. Полученная суспензия клеток центрифугировалась 5 мин при скорости 1500 об/мин на центрифуге (B3.11, Jouan, Франция). Надосадочная жидкость удалялась. К клеткам добавлялся свежий раствор Хенкса, и они снова подвергались центрифугированию при тех же параметрах с целью отмывки применявшихся ранее препаратов и полной остановки ферментативных процессов.

После повторного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости, клетки пипетировались в 4 мл ростовой среды. 50мкл полученной клеточной суспензии смешивались с трепановым синим (0,4 %, Биолот, Россия) 1:1 для проведения подсчёта плотности посадки клеток в камере Фукса-Розенталя. Рассчитанный необходимый объём суспензии клеток рассеивался на стёкла.

Все манипуляции с растворами, живыми тканями и клетками производились в ламинарном шкафу.

Культура нейронов выращивалась в среде Neurobasal (Gibco) с добавкой (Gibco) B-27 при 37°, 5% CO₂ и влажности 100% в инкубаторе Binder C-150. Каждые 2-3 дня среда в чашках Петри заменялась на новую.

Работа с культурами начиналась с 9-10 дня после посадки, так как именно к этому сроку клетки успевают сформировать развитую нейрональную сеть.

Регистрация токов методом локальной фиксации потенциала

Регистрацию интегральных ионотропных токов NMDAR проводили патч-кламп методом в конфигурации "целая клетка" [87]. Кальциевый внеклеточный перфузионный раствор был приготовлен без ионов Mg⁺, чтобы избежать блокирования ими каналов NMDAR. Он имел следующий состав: 140 мМ NaCl, 2.8 мМ KCl, 1.0 мМ CaCl₂ и 10 мМ HEPES. В экспериментах с использованием лития NaCl пропорционально заменяли LiCl. Раствор для заполнения электрода (внутриклеточный) имел следующий состав: 120 мМ CsF, 10 мМ CsCl, 10 мМ EGTA и 10 мМ HEPES. Работа осуществлялась при комнатной температуре 20–23°C растворов и pH 7.4. Патч-пипетки для регистрации токов из боросиликатного стекла с внешним диаметром 1,5 мм и внутренним филаментом (#BF150-86-10, SutterInstrumentsCompany, США) были вытянуты на пулере (SutterP-1000, USA).

Для регистрации токов был использован усилитель MultiClamp 700Bc системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClampv10.2 (MolecularDevices, США). Частота дискретизации составляла 20000 изм/с с предварительной аналоговой фильтрацией (эквивалент фильтра Бесселя 8 порядка) с частотой среза 200 Гц для удаления высокочастотных шумов. Управление позиционированием микроэлектрода выполняли при помощи микроманипулятора MP-85 (SutterInstrumentsCompany, США) под визуальным контролем. Визуальный контроль осуществлялся при помощи инвертированного микроскопа NikonDiaphotTMD (Nikon, Япония). Для аппликации веществ использовали систему быстрой перфузии.

Использованные концентрации апплицируемых веществ: NMDA (100 мкМ), глицин (10 мкМ), KB-R7943 (10 мкМ).

Измерение величины токов, вызванных агонистами, выполняли в программе Clampfit 10.2, входящей в пакет pClamp.

Ca²⁺-имаджинг

Регистрацию изменения уровня кальция в клетках проводили с использованием красителя Fluo-3 AM. Загрузку красителя в клетки производили в течении 45 минут путём инкубирования клеток в 2мкМ Fluo-3 AM, затем 15 минут клетки отмывали во внеклеточном растворе. Уровень флуоресценции измеряли с помощью конфокального микроскопа SP5 MP фирмы Leica Microsystems, Германия. Аппликации веществ также производили с помощью быстрой локальной перфузии. Внеклеточный раствор имел такой же состав, что и в экспериментах с пэтч-клампом, кроме количества CaCl₂, здесь было взято 2.0 мМ.

Измерение интенсивности флуоресценции производили в программе LAS AF (Leica Microsystems, Германия). Для каждого стекла с клетками результаты усреднялись, приведённое в статистике n – число стёкол.

Поскольку результаты измерений имели нормальное распределение, то сравнение групп измерений выполняли при помощи парного критерия Стьюдента. Данные считались достоверно различающимися при уровне доверительной вероятности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было показано, что ингибирование натрий-кальциевого обменника литием снижает амплитуду вызванных токов NMDAR. Поскольку литий широко применяется в клинической практике, требовалось оценить какая его концентрация является достаточной для падения токов NMDAR. Для решения этой задачи нами было решено построить концентрационную кривую ингибирования токов NMDA рецепторов ионами лития.

Влияние ингибирования NCX литием на токи NMDAR.

Кривая была построена на основании шести концентрационных точек: 0 мМ, 21 мМ, 42 мМ, 70 мМ, 112 мМ и 140 мМ LiCl. Токи вызывали аппликацией ко-агонистов NMDA рецепторов – NMDA и глицина. Ввиду того, что литий ингибирует не только NCX, но и ряд других электрогенных Na-зависимых транспортеров, непосредственно перед каждой аппликацией ко-агонистов в сочетании с n-м количеством ионов лития на клетки апплицировался внеклеточный раствор с соответствующим количеством лития для контроля. Измерения токов производились относительно данного контроля, чтобы исключить вклад в токи NMDAR побочных эффектов лития на другие электрогенные каналы и транспортеры. В целом, с увеличением количества лития, десенситизация нейронов усиливалась (Рис.2А). При полной замене натрия на литий во внеклеточном растворе падение токов составило 3/4 от начальной амплитуды: с $440,4 \pm 71,9$ (n=10) пА в безлитиевом растворе до $111,4 \pm 29,1$ пА (n=10). Для того чтобы доказать, что данный эффект обусловлен именно тем, что NCX находится рядом с NMDAR и оказывает на него влияние, была построена точно такая же кривая, но на клетках, которые предварительно были обработаны M β CD с целью разрушения в них липидных плотиков. При отсутствии лития во внеклеточном растворе разобщение NCX и NMDAR в 4 раза снижает равновесные токи NMDAR, с $440,4 \pm 71,9$ пА до $136,8 \pm 32,8$ соответственно (t-тест, $p < 0.01$, n=10).

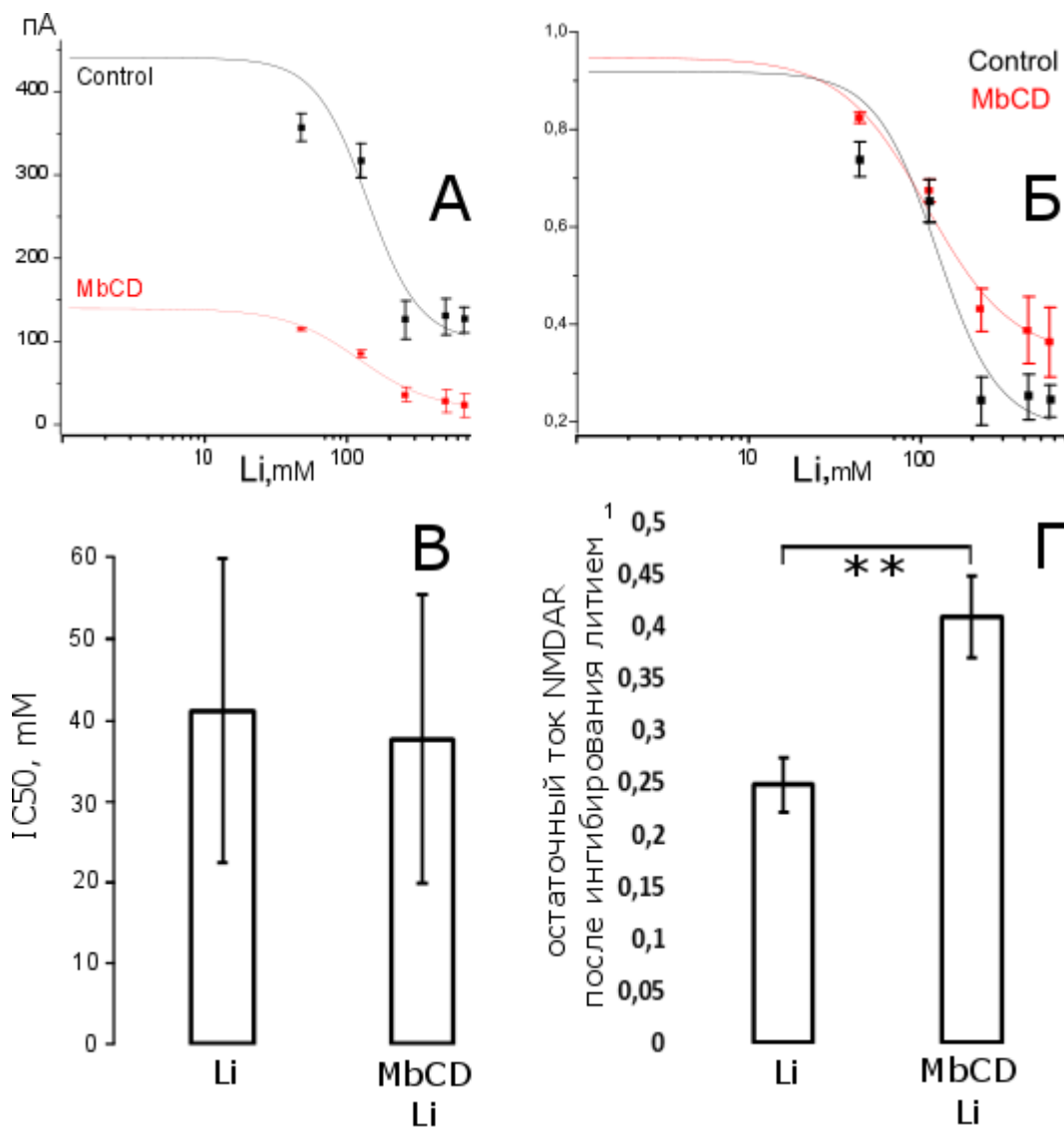


Рис.2. Зависимость вызванных токов NMDAR от степени замены внеклеточных ионов Na^+ на Li^+ . Средние абсолютные величины токов NMDAR (А). Те же концентрационные кривые, нормированные по максимальному ответу (Б). Концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для лития в контроле и в присутствии М β СD, достоверных различий нет (В). Уровень максимального ингибирования токов NMDAR литием в контроле и на фоне М β СD. ** - $p < 0,01$.

Интересно заметить, что использование лития для ингибирования NCX и М β СD для разрушения липидных плотиков одинаково усиливают десенситизацию NMDAR, приводя к падению равновесных токов NMDAR с $440,4 \pm 71,9$ пА до $111,4 \pm 29,1$ пА и $136,8 \pm 32,8$ соответственно. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для лития в контроле и в присутствии М β СD достоверно не отличаются и составили $46,4 \pm 21,2$ и $42,3 \pm 20,0$ соответственно. Если нормировать полученные токи на амплитуды

максимальных ответов, то становится заметно, что в присутствии MβCD максимальное ингибирование тока литием достоверно меньше, чем в контроле: 0.23 ± 0.03 и 0.41 ± 0.04 соответственно (t-тест, $p < 0.05$, $n = 10$). Получается, что пространственное разобщение NCX и NMDAR и ингибирование NCX оказывают примерно одинаковый эффект на кальций-зависимую десенситизацию NMDAR. Вероятнее всего при разобщении обменник не может достаточно эффективно откачивать кальций, вошедший через канал NMDAR, т.к. не находится достаточно близко к нему, в результате чего кальций успевает десенситизировать NMDAR.

Влияние ингибирования NCX на токи вход кальция в нейроны через NMDAR

Усиление десенситизации NMDAR при ингибировании NCX должно отражаться на опосредованном NMDAR входе Ca^{2+} в клетку. Это предположение было проверено путем прямой регистрации концентрации внутриклеточного Ca^{2+} с использованием Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя.

Вызываемые 100 мкМ NMDA + 10 мкМ глицина кальциевые ответы нейронов сравнивали до и после экстракции холестерина из мембран при помощи MβCD. Сравнивали также Ca^{2+} ответы в норме и при ингибировании NCX литием (Рис. 3). Наличие лития снижало амплитуду кальциевых ответов клеток на половину: $0,52 \pm 0,02$ от начального значения (t-тест, $p < 0,001, n = 3$). После обработки клеток MβCD ответы на аппликацию ко-агонистов снижались также на половину значения: $0,50 \pm 0,07$ от начальной амплитуды (t-тест, $p < 0,01, n = 3$). Сама по себе аппликация лития вызывала некоторый ответ, который мы вычитали из амплитуды ответов вызываемых NMDA. Таким образом, мы показали, что ингибирование NCX и разобщение NMDAR и NCX приводят к одинаковому результату. А тот факт, что аппликация лития на клетки с уже разрушенными плотиками даёт дополнительное уменьшение кальциевых ответов, говорит о том, что по отдельности и ингибирование NCX, и разобщение не дают полного эффекта.

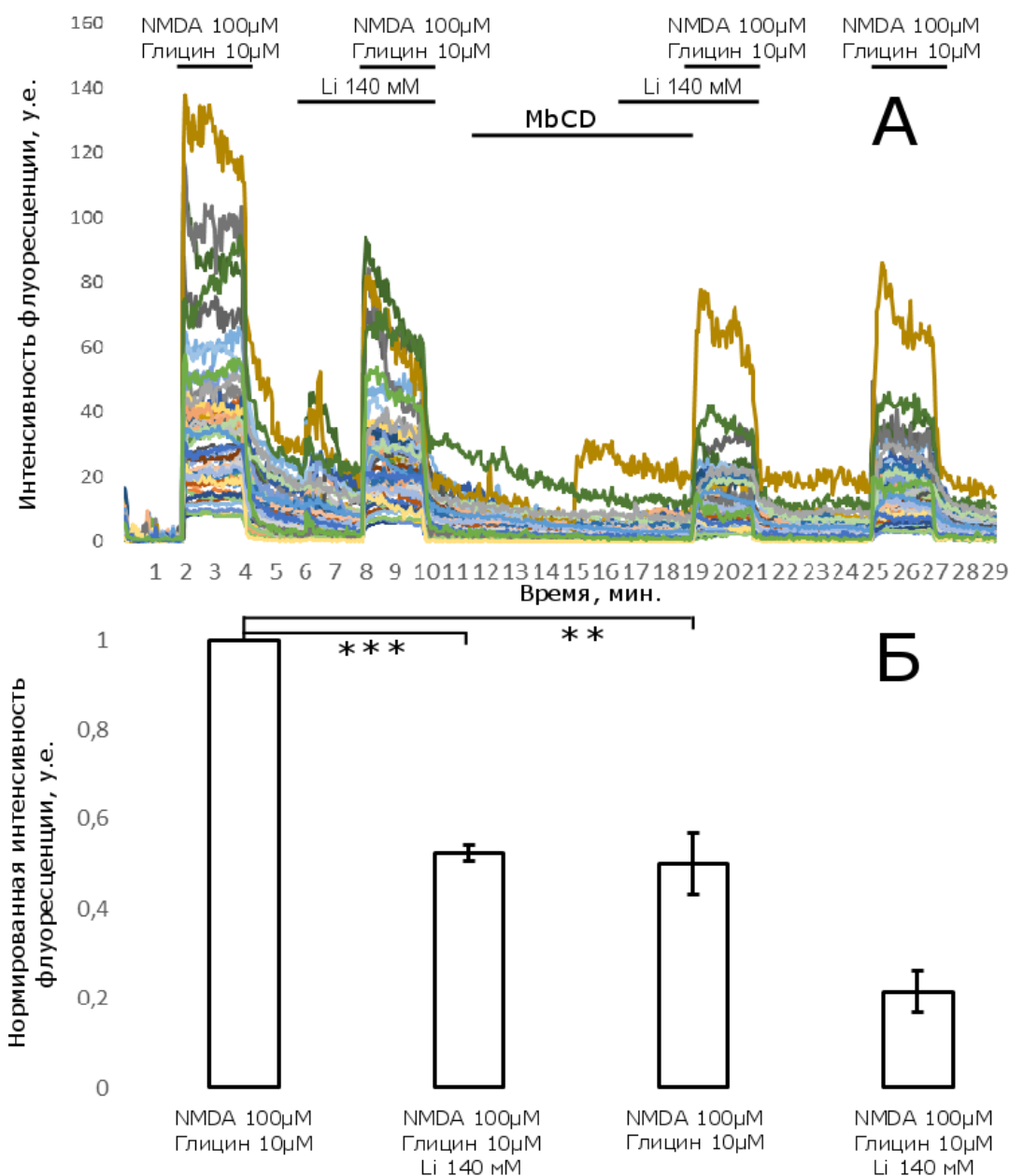


Рис. 3. Влияние экстракции холестерина и ингибирования NCX литием на внутриклеточные Ca^{2+} ответы, вызванные 2 мин действием 100 мкМ NMDA + 10 мкМ глицина. А - пример Ca^{2+} ответов нейронов на NMDA в одном эксперименте (приведено 40 нейронов). Б – средние значения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , нормированные к максимальному ответу (условные единицы интенсивности свечения Fluo-3). ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Для ингибирования NCX был также использован специфический ингибитор KB-R7943 (KBR). Использование KBR в качестве ингибитора NCX так же вызывало уменьшение амплитуды кальциевых ответов, в среднем до $0,59 \pm 0,05$ от контрольного значения (t-тест, $p < 0,001$, $n=5$) (Рис. 4). Разобшение же NMDAR и NCX в данном случае снизило ответы до $0,32 \pm 0,04$.

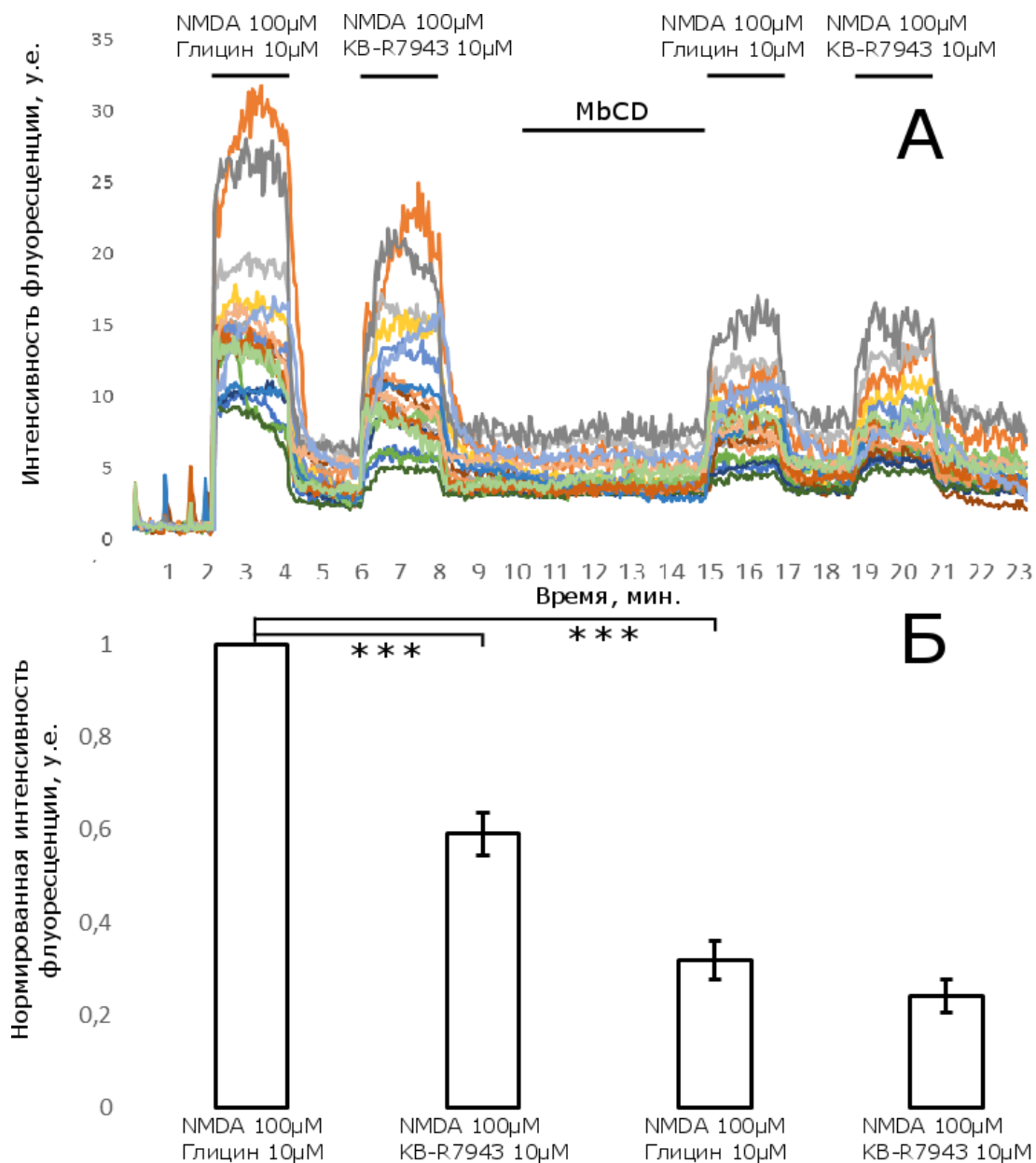


Рис. 4. Влияние экстракции холестерина и ингибирования NCX при помощи KB-R7943 (10 мкМ) на внутриклеточные Ca²⁺ ответы, вызванные 2 мин действием 100 мкМ NMDA + 10 мкМ глицина. А - пример Ca²⁺ ответов нейронов на NMDA в одном эксперименте (приведено 40 нейронов). Б – средние значения концентрации внутриклеточного Ca²⁺, нормированные к максимальному ответу (условные единицы интенсивности свечения Fluo-3). *** - p<0,001.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее мы с коллегами показали [1], что ингибитор прямого и обратного режимов работы NCX KBR является ко-агонистом NMDA рецептора, несмотря на то, что долгое время его считали ингибитором токов NMDAR. Усиление KBR десенситизации NMDAR принимали за эффект прямого ингибирования NMDAR. Было показано, что данное ингибирование имеет кальций-зависимый

характер, и не проявляется в отсутствии кальция во внеклеточном растворе, а также в присутствии кальциевого хелатора ВАРТА внутри клетки. Таким образом, КВР модулирует токи NMDAR не непосредственно, а через ингибирование NCX и усиление кальций-зависимой десенситизации NMDAR.

Тогда было принято решение измерить степень десенситизации NMDAR при использовании другого ингибитора NCX, в качестве которого были выбраны ионы лития. В результате было показано, что при ингибировании функции NCX литием также наблюдалась усиление десенситизации токов NMDAR.

Как литий, так и КВР обладают побочными эффектами, не связанными с ингибированием NCX. Литий подавляет все виды натрий-зависимого транспорта ионов, в частности NCX, но не вызывает их полного ингибирования. КВР является преимущественно ингибирует вход кальция через NCX (reverse mode), а для ингибирования нормальной работы NCX (forward mode) требуется повышение его концентрации до 10 мкМ, что приводит к проявлению его дополнительных эффектов как агониста глицинового сайта NMDAR и ингибитора работы митохондрий. Таким образом оба использованных ингибитора NCX имеют побочные эффекты, но эти эффекты различны.

Сходство эффектов принципиально различных ингибиторов NCX, на десенситизацию NMDAR позволяет говорить, что проявление их побочных эффектов в наших экспериментах было незначительно.

Тем не менее, оставался вопрос о том, насколько локальным является такое взаимодействие NCX и NMDAR. Существующие публикации [81,85] говорят, что в нейронах в липидных плотиках наблюдается колокализация Ca^{2+} -проинцаемых ионных каналов (NMDAR, AMPAR, потенциал чувствительных кальциевых каналов L-типа) и Ca^{2+} -транспортеров (NCX, Са-помпы). Учитывая небольшой размер плотиков (20-300 нм) вероятно формирование локальных внутриклеточных кальциевых доменов с локальным градиентом ионов Na^+ и Ca^{2+} . Именно локальная концентрация внутриклеточного Ca^{2+} в таких микродоменах будет определять степень Ca^{2+} -зависимой десенситизации NMDAR. Соответственно, разрушение мембранных холестериновых плотиков, приводящее к пространственному разобщению ионных каналов и транспортеров

должно существенно менять параметры Ca^{2+} -зависимой десенситизации NMDAR и влиять на общий вход Ca^{2+} в нейронов при активации NMDAR.

Пространственное разобщение NCX и NMDAR при разрушении липидных плотиков и ингибирование NCX литием или KBR оказывают примерно одинаковый эффект на кальций-зависимую десенситизацию NMDAR. Вероятнее всего при разобщении обменник не может достаточно эффективно удалять из клетки кальций, вошедший через канал NMDAR, т.к. находится за пределами локального кальциевого домена, в результате чего кальций успевает вызвать кальмодулин зависимую десенситизацию NMDAR.

В опытах по построению концентрационной кривой ингибирования токов NMDA рецепторов ионами лития мы ожидали, что возможно изменение концентрации полумаксимального ингибирования, однако достоверных различий получить не удалось. Вероятно это связано с тем, что IC_{50} ингибирования литием самого NCX не изменяется при разобщении NCX и NMDAR. Зато было получено достоверное отличие максимальной степени ингибирования токов литием: после разрушения мембранных плотиков литий даёт меньшую амплитуду десенситизации. Вероятнее всего в условиях разобщения NCX и NMDAR локальная концентрация свободного Ca^{2+} вблизи внутриклеточного домена NMDAR несколько возрастает, соответственно рецептор оказывается частично десенситизирован. В этих условиях дополнительное ингибирование NCX литием или KBR будет лишь незначительно усиливать десенситизацию NMDAR.

В экспериментах с кальциевым имаджингом мы могли получать данные только об общей концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в соме нейрона. Аппаратное пространственное разрешение и чувствительность конфокального микроскопа, использованного нами для наблюдения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} не позволяет видеть локальные Ca^{2+} микродомены. В кальциевых микродоменах кальциевый сигнал распространяется на расстояния всего лишь порядка 100 нм [81,85]. Поэтому в данном случае мы видим сигналы повышения кальция диффузно, по всей клетке. Это повышение зависит от активации NMDAR и их степени десенситизации. Кальций, не успевший

связаться с примембранным с кальмодулином и т.о. повлиять на десенситизацию NMDAR, а также не выведенный обменниками из клетки, диффундирует глубже и повышает общий уровень внутриклеточного кальция, который мы и наблюдали в экспериментах. То, на сколько в итоге десенситизируется NMDAR, т.е. каков будет равновесный ток ионов через него, а значит и общий приток кальция, зависит от работы NCX, расположенного рядом с ним. NCX как бы создаёт локальную примембранную область с пониженным уровнем кальция, защищая NMDAR от десенситизации. Достаточно заблокировать NCX или отодвинуть его от NMDAR чтобы значительно усилить десенситизацию NMDAR. Это механизм защиты клетки от кальциевой перегрузки, а также возможность модуляции токов NMDAR сторонними кальциевыми сигнальными путями. Кроме того, полученные данные говорят, что функции NMDAR могут управляться изменениями в колокализации рецептора с обменником, что говорит о новом ранее неизвестном механизме влияния на работу NMDAR.

Выводы

- 1) Построение концентрационных кривых ингибирования токов NMDA рецепторов ионами лития в контроле и при разрушении липидных плотиков метил-бета-циклодекстрином показало, что при разрушении липидных плотиков IC_{50} лития не изменяется, однако максимальный уровень ингибирования токов в контроле оказался больше.
- 2) Исследование NMDA-индуцированного входа кальция при воздействии антагонистов натрий-кальциевого обменника лития и KB-R7943 до и после обработки клеток метил-бета-циклодекстрином показало, что поочерёдное использование лития и метил-бета-циклодекстрина одинаково вызывает усиление десенситизации NMDAR.
- 3) Функции NMDAR могут управляться изменениями в колокализации NMDA-рецептора с натрий-кальциевым обменником.

Список литературы

1. Sibarov D.A. et al. 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.* 2015. Vol. 355, № 3. P. 484–495.
2. Burnashev N. et al. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. // *J. Physiol.* 1995. Vol. 485 (Pt 2, № 1995. P. 403–418.
3. Schneggenburger R. Simultaneous measurement of Ca²⁺ influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels // *Biophys. J.* Elsevier, 1996. Vol. 70, № 5. P. 2165–2174.
4. Monyer H. et al. Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes // *Science* (80-.). 1992. Vol. 256, № 5060. P. 1217–1221.
5. Ulbrich M.H., Isacoff E.Y. Rules of engagement for NMDA receptor subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 37. P. 14163–14168.
6. Lester R.A.J. et al. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents // *Nature.* 1990. Vol. 346, № 6284. P. 565–567.
7. van Zundert B., Yoshii A., Constantine-Paton M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal // *Trends Neurosci.* 2004. Vol. 27, № 7. P. 428–437.
8. Johnson J.W., Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons // *Nature.* 1987. Vol. 325, № 6104. P. 529–531.
9. Kleckner N.W., Dingledine R. Requirement for Glycine in Activation of NMDA-Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes // *Source Sci. New Ser. Annu. Rev. Biochem. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. J. Biol. Chem. Physiol. J. Biol. Chem. Biochim. Biophys. Acta FEBS Lett. J. Gen. Physiol. J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 241, № 6694. P. 835–837.

10. Chen P.E. et al. Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes // J. Physiol. 2008. Vol. 586, № 1. P. 227–245.
11. Dravid S.M. et al. Structural Determinants of D-Cycloserine Efficacy at the NR1/NR2C NMDA Receptors // J. Neurosci. 2010. Vol. 30, № 7. P. 2741–2754.
12. Lerma J., Zukint R.S., Bennett M.V.L. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses // Neurobiology. 1990. Vol. 87, № March. P. 2354–2358.
13. Furukawa H. et al. Subunit arrangement and function in NMDA receptors // Nature. 2005. Vol. 438, № 7065. P. 185–192.
14. Yao Y. et al. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors // EMBO J. 2008. Vol. 27, № 15. P. 2158–2170.
15. Erreger K. et al. Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-Containing N-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptors // Mol. Pharmacol. 2007. Vol. 72, № 4. P. 907–920.
16. Forsythe I.D., Westbrook G.L. Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. // J. Physiol. 1988. Vol. 396. P. 515–533.
17. Ascher B.Y.P., Nowak L. THE ROLE OF DIVALENT CATIONS IN THE N-METHYL-D-ASPARTATE RESPONSES OF MOUSE CENTRAL NEURONES IN CULTURE. 1988. Vol. 399. P. 247–266.
18. Hardingham G.E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders // Nat. Rev. Neurosci. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 11, № 10. P. 682–696.
19. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2010. Vol. 460, № 2. P. 525–542.
20. Zhou Q., Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases // Neuropharmacology. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 74. P. 69–75.

21. Mayer M.L., Vyklický L., Clements J. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. // *Nature*. 1989. Vol. 338, № 6214. P. 425–427.
22. Nahum-Levy R. et al. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. // *Biophys. J. Elsevier*, 2001. Vol. 80, № May. P. 2152–2166.
23. Legendre P., Rosenmund C., Westbrook G.L. Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium // *J. Neurosci*. 1993. Vol. 13, № 2. P. 674–684.
24. Vissel B. et al. Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. // *Mol. Pharmacol*. 2002. Vol. 61, № 3. P. 595–605.
25. Chen N. et al. Site within N-Methyl-D-aspartate Receptor Pore Modulates Channel Gating // *Mol. Pharmacol*. 2004. Vol. 65, № 1. P. 157–164.
26. Hu B., Zheng F. Molecular Determinants of Glycine-Independent Desensitization of NR1 / NR2A Receptors. 2005. Vol. 313, № 2. P. 563–569.
27. Sessoms-Sikes S. et al. CaMKII?? enhances the desensitization of NR2B-containing NMDA receptors by an autophosphorylation-dependent mechanism // *Mol. Cell. Neurosci*. 2005. Vol. 29, № 1. P. 139–147.
28. Zhang S. et al. Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. // *Neuron*. 1998. Vol. 21, № 2. P. 443–453.
29. Zito K., Scheuss V. NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. In: *Encyclopedia of Neuroscience* // Elsevier. 2009. P. 276–283.
30. Philipson, K.D. and Nicoll D.A. Sodium-Calcium Exchange: A Molecular Perspective // *Annu. Rev. Physiol*. 2000. Vol. 62. P. 111–133.
31. M. E. A. R., A. L. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Membranes and Transport*. Springer, 2007.

32. Yu L., Colvin R.A. Regional differences in expression of transcripts for Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms in rat brain // *Mol. Brain Res.* 1997. Vol. 50, № 1–2. P. 285–292.
33. Papa M. et al. Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions // *J. Comp. Neurol.* 2003. Vol. 461, № 1. P. 31–48.
34. Li X.F. L.J. Differential expression of Na/Ca exchanger and Na/Ca + K exchanger transcripts in rat brain // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002. Vol. 976. P. 64–66.
35. Kiedrowski L. et al. Preferential expression of plasmalemmal K-dependent Na⁺ / Ca²⁺ exchangers in neurons versus astrocytes. 2002. Vol. 13, № 12. P. 10–13.
36. Poon S. et al. Alternatively spliced isoforms of the rat eye sodium/calcium+potassium exchanger NCKX1 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. Vol. 278, № 4. P. 60.
37. Juhaszova M. et al. Location of calcium transporters at presynaptic terminals // *Eur. J. Neurosci.* 2000. Vol. 12, № 3. P. 839–846.
38. Kim M.-H. et al. Distribution of K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the rat supraoptic magnocellular neuron is polarized to axon terminals. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23, № 37. P. 11673–11680.
39. Szerencsei R.T., Prinsen C.F.M., Schnetkamp P.P.M. Stoichiometry of the retinal cone Na/Ca-K exchanger heterologously expressed in insect cells: Comparison with the bovine heart Na/Ca exchanger // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40, № 20. P. 6009–6015.
40. Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium calcium exchange: Its physiological implications // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79, № 3. P. 763–854.
41. Fujioka Y., Komeda M., Matsuoka S. Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. // *J. Physiol.* 2000. Vol. 523 Pt 2. P. 339–351.

42. Dong H., Dunn J., Lytton J. Stoichiometry of the Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger NCX1.1 measured in transfected HEK cells. // *Biophys. J.* Elsevier, 2002. Vol. 82, № 4. P. 1943–1952.
43. Kang T.M., Hilgemann D.W. Multiple transport modes of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. // *Nature*. 2004. Vol. 427, № 6974. P. 544–548.
44. Kiedrowski L. et al. Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient // *Neuron*. 1994. Vol. 12, № 2. P. 295–300.
45. L. K., J.T. W., E. C. Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate // *Molec. Pharmacol.* 1994. Vol. 45. P. 1050–1054.
46. Pinelis V.G. et al. Changes in cytosolic sodium caused by a toxic glutamate treatment of cultured hippocampal neurons // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994. Vol. 32. P. 475–482.
47. Török T.L. Electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchange of nerve and muscle cells // *Prog. Neurobiol.* 2007. Vol. 82, № 6. P. 287–347.
48. Karkanas N.B., Papke R.L. Subtype-specific effects of lithium on glutamate receptor function. // *J. Neurophysiol.* 1999. Vol. 81, № 4. P. 1506–1512.
49. Czyz A., Baranauskas G., Kiedrowski L. Instrumental role of Na^+ in NMDA excitotoxicity in glucose-deprived and depolarized cerebellar granule cells // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 81, № 2. P. 379–389.
50. Abramochkin D. V., Alekseeva E.I., Vornanen M. Inhibition of the cardiac inward rectifier potassium currents by KB-R7943 // *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 158, № 3. P. 181–186.
51. Czyz A., Kiedrowski L. Inhibition of plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor 7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-one (CGP-37157) in cerebellar granule cells // *Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol. 66, № 12. P. 2409–2411.

52. L K. High activity of plasmalemmal K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺-exchangers in hippocampal CA1 neurons // *Neuroreport*. 2004. Vol. 15. P. 2113–2116.
53. Fountoulakis K.N. The Possible Involvement of NMDA Glutamate Receptor in the Etiopathogenesis of Bipolar Disorder // *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18, № 12. P. 1605–1608.
54. Dimitrova M. et al. Neurodegenerative Changes in Rat Produced by Lithium Treatment // *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*. 2013. Vol. 76, № 4–5. P. 304–310.
55. Lee A.G. et al. Clusters in Lipid Bilayers and the Interpretation of Thermal Effects in Biological Membranes // *Biochemistry*. 1974. Vol. 13, № 18. P. 3699–3705.
56. Wunderlich F. et al. Thermotropic lipid clustering in tetrahymena membranes. // *Biochemistry*. 1975. Vol. 14, № 17. P. 3730–3735.
57. Wunderlich F., Ronai A. ADAPTIVE LOWERING OF THE LIPID CLUSTERING TEMPERATURE WITHIN TETRAHYMENA MEMBRANES. 1975. Vol. 55, № 1. P. 237–241.
58. Goñi F.M. et al. Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. Elsevier B.V., 2008. Vol. 1781, № 11–12. P. 665–684.
59. Westerlund B., Slotte J.P. How the molecular features of glycosphingolipids affect domain formation in fluid membranes // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier B.V., 2009. Vol. 1788, № 1. P. 194–201.
60. Elson E.L. et al. Phase Separation in Biological Membranes: Integration of Theory and Experiment // *Annu. Rev. Biophys.* 2010. Vol. 39, № 1. P. 207–226.
61. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. // *Nature*. 1997. Vol. 387, № 6633. P. 569–572.
62. Simons K., Vaz W.L.C. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. Vol. 33, № 1. P. 269–295.

63. Pike L.J. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function // *J. Lipid Res.* 2006. Vol. 47, № 7. P. 1597–1598.
64. Kiessling V., Wan C., Tamm L.K. Domain coupling in asymmetric lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier B.V., 2009. Vol. 1788, № 1. P. 64–71.
65. Raghupathy R. et al. Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins // *Cell.* Elsevier Inc., 2015. Vol. 161, № 3. P. 581–594.
66. Lingwood D., Simons K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle // *Science* (80-.). 2010. Vol. 327, № 5961. P. 46–50.
67. Sastry P.S. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism // *Prog. Lipid Res.* 1985. Vol. 24, № 2. P. 69–176.
68. Brien J.S.O., Sampson E.L. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. 1965. Vol. 6, № 9. P. 537–544.
69. Folch-Pi J. The Composition of Nervous Membranes // *Prog. Brain Res.* 1968. Vol. 29, № C. P. 1–17.
70. Prinetti A. et al. Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 16. P. 11658–11665.
71. Svennerholm L. et al. Membrane Lipids of Adult Human Brain: Lipid Composition of Frontal and Temporal Lobe in Subjects of Age 20 to 100 Years // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 63, № 5. P. 1802–1811.
72. Saher G., Quintes S., Nave K.-A. Cholesterol: A Novel Regulatory Role in Myelin Formation // *Neurosci.* 2011. Vol. 17, № 1. P. 79–93.
73. Pfrieger F.W., Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes // *Prog. Lipid Res.* Elsevier Ltd, 2011. Vol. 50, № 4. P. 357–371.
74. Cetin I., Alvino G., Cardellicchio M. Fatty Acids and Neurodevelopment. 2008. № 4. P. 955–975.

75. Shintaro Besshoh, Sheng Chen, Ian R. Brown and J.W.G. Developmental Changes in the Association of NMDA Receptors With Lipid Rafts // *J. Neurosci. Res.* 2007. Vol. 85, № 11. P. 2352–2359.
76. Delint-Ramirez I. et al. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93 // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 24. P. 8162–8170.
77. Abulrob A. et al. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: A role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution // *J. Neurochem.* 2005. Vol. 92, № 6. P. 1477–1486.
78. Ponce J. et al. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: A cholesterol-mediated effect in neuroprotection // *Stroke.* 2008. Vol. 39, № 4. P. 1269–1275.
79. Sierra-Valdez F.J., Ruiz-Suarez J.C., Delint-Ramirez I. Pentobarbital modifies the lipid raft-protein interaction: A first clue about the anesthesia mechanism on NMDA and GABAA receptors // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2016. Vol. 1858, № 11. P. 2603–2610.
80. Frank C. et al. Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 566, № 1–3. P. 25–29.
81. Marques-da-Silva D., Gutierrez-Merino C. Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling // *Cell Calcium.* Elsevier Ltd, 2014. Vol. 56, № 2. P. 108–123.
82. Wollmuth L.P. Is cholesterol good or bad for your brain? - NMDARs have a say. // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593, № 10. P. 2251–2252.
83. Korinek M. et al. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors // *J. Physiol.* 2015. Vol. 0. P. n/a-n/a.

84. Sun M.Y. et al. Endogenous 24S-hydroxycholesterol modulates NMDAR-mediated function in hippocampal slices // *J Neurophysiol.* 2016. P. jn 00890 2015.
85. Marques-da-Silva D., Gutierrez-Merino C. L-type voltage-operated calcium channels, N-methyl-d-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase form a calcium/redox nano-transducer within lipid rafts // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Inc., 2012. Vol. 420, № 2. P. 257–262.
86. Antonov S.M., Johnson J.W. Voltage-dependent interaction of open-channel blocking molecules with gating of NMDA receptors in rat cortical neurons. // *J. Physiol.* 1996. Vol. 493 (Pt 2, № 1996. P. 425–445.
87. Hamill O.P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 1981. Vol. 391, № 2. P. 85–100.