

УДК 612.822

А.В. СИДОРОВ

**РЕГУЛЯЦИЯ И МОДУЛЯЦИЯ НЕЙРОННЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ
КОЛЕБАНИЯХ УРОВНЯ pH ИНТЕРСТИЦИЯ**

Literature data on pH regulation in neurons, membrane conductance and neuronal functions modulation during interstitial pH shifts are analyzed. Particular reference addressed to the physiological role of acid sensing ion channels (ASIC).

Протон (H⁺) можно охарактеризовать как наименьший среди известных физиологически активных ионов. Необходимость поддержания постоянства концентрации протонов в среде (pH) является неременным условием нормального функционирования белковых ансамблей, отдельных клеток и т. п. При этом особую значимость приобретает способность к ре-

гуляции уровня рН в нервной ткани, принимая во внимание примат нервной системы в координации работы целостного организма.

Использование рН-чувствительных электродов показало, что кислотно-основное равновесие межклеточной жидкости в нервной ткани мозга лишь незначительно смещено в кислую сторону по сравнению с рН крови: 7,3 против 7,4 единиц соответственно [1]. Тем не менее известно, что ряд патологических состояний, таких как воспаление и ишемия, ассоциируются с выраженным тканевым ацидозом, когда отмечается падение рН более чем на 2 единицы [2]. Более того, колебания рН интерстиция могут быть вызваны простым изменением исходной нейронной активности. В частности, синхронная активация работы скоплений нейронов приводит к начальному защелачиванию межклеточной среды, которое быстро сменяется ацидозом, длящимся несколько минут. Подобный паттерн колебаний рН был впервые описан в коре больших полушарий [3] и мозжечке [4], а затем и в остальных отделах мозга, хотя и не является абсолютно универсальным [5].

Поддержание постоянства рН цитоплазмы нейронов. Скорость протекания большинства биохимических реакций, катализируемых ферментными белками, находится в зависимости от рН. Следовательно, поддержание постоянства рН внутри клетки (pH_i), от чего напрямую зависит само ее существование, является важнейшей задачей организма. Тот факт, что рН цитоплазмы большинства клеток смещено примерно на 1 единицу в щелочную сторону от расчетного, обусловленного пассивной диффузией H^+ (возможно, H_3O^+ или OH^-) через мембрану, является еще одним свидетельством наличия мощного механизма поддержания кислотно-основного гомеостаза на уровне клетки [6]. В большинстве нейронов pH_i зависит от активности многочисленных мембранных обменников и транспортеров. Среди них ведущим является Na^+/H^+ -обменник, обнаруженный в клетках практически всех исследованных участков нервной ткани позвоночных – гиппокампе, церебральном кортексе, мозжечке, продолговатом и спинном мозге, симпатических нейронах, клетках сетчатки [5], клетках глии [7]. Его работа препятствует развитию внутриклеточного ацидоза и демонстрирует сильную зависимость от наружной концентрации натрия. Потенциальная энергия натриевого градиента обеспечивает также поступление в клетку бикарбоната аниона (HCO_3^-) посредством активации Na^+ -зависимого HCO_3^-/Cl^- -обменника и Na^+/HCO_3^- -котранспортера, успешно противодействуя закислению цитоплазмы. Данный механизм описан в большинстве исследованных нейронов, за исключением культивируемых клеток Пуркинье крыс и нейронов ряда ядер продолговатого мозга [8, 9]. Очевидно, что деполяризация клеток, приводящая к уменьшению трансмембранного натриевого градиента, сопровождается закислением внутриклеточного содержимого. Протонные помпы, ответственные за выкачивание избыточных H^+ из цитоплазмы и широко распространенные среди растительных клеток, в нервной ткани встречаются крайне редко: они отмечены в свежеизолированных нейронах гиппокампа крыс и мышей [10, 11], а также астроцитах [12]. Помимо систем, препятствующих развитию внутриклеточного ацидоза, существуют механизмы, работа которых приводит к закислению цитоплазмы. В частности, к ним относится HCO_3^-/Cl^- -обменник, обеспечивающий пассивное перемещение бикарбоната из клетки за счет энергии хлорного градиента [13]. Специфический механизм, приводящий к ацидозу внутриклеточного содержимого, описан в мембране нейронов моллюска: активность АТФ-зависимой Ca^{2+} помпы [14] приводит к удалению из клетки ионов кальция, избыток которых внутри нейрона формируется при интенсивной спайковой активности в обмен на поступление протонов.

Работа рассмотренных обменников и транспортеров может приводить к созданию небольших участков (микродоменов) с измененным рН как внутри клетки, так и за ее пределами. В частности, активная работа АТФ-зависимой Ca^{2+} помпы может приводить к созданию микродоменов интерстиция со щелочным рН при деполяризации нервных клеток [15]. В клетках глии (олигодендроцитах) существуют участки цитоплазмы с разным уровнем рН – щелочным в области перикариона и кислым в отдаленных дендритах [16]. Эти различия обусловлены неодинаковой плотностью мембрантранспортных белков в соответствующих участках клетки (плотность Na^+/H^+ -обменника выше в мембранных областях перикариона и проксимальных дендритов, а Na^+/HCO_3^- -котранспортера – в дистальных дендритах).

Важная роль в создании микроучастков с измененным рН принадлежит и различным формам фермента, катализирующего обратимую гидратацию CO_2 до угольной кислоты –

карбоангидразы, распад которой на H^+ и HCO_3^- происходит по физиологическим меркам практически мгновенно [17]. Известно о существовании у млекопитающих десятка различных изоформ карбоангидразы, локализованных в цитоплазме, митохондриях, прикрепленных к мембране, находящихся в свободном состоянии в межклеточной жидкости [5, 6, 17]. Естественно, что даже незначительные колебания ее активности могут привести к созданию мощных протонных потоков и градиентов.

Отдельно остановимся на потенциалуправляемых протонных каналах. Впервые потенциалзависимые, выходящие H^+ -токи были обнаружены в начале 1980-х гг. в телах нейронов моллюсков (*Helix*, *Lymnaea*, *Planorbis*). Они уменьшаются при увеличении pH, и снижении pH интерстиция и опосредуются ионными каналами, специально предназначенными для транспорта протонов через мембрану [18]. Их проницаемость возрастает при деполяризации мембраны, рассмотренные каналы характеризуются высокой селективностью к протону, малой проводимостью, сильной температурной и строгой pH-зависимостью [19]. Существует по меньшей мере четыре изоформы управляемых напряжением протонных каналов [20, 21]. Традиционно считается, что они обеспечивают поддержание постоянства pH цитозоля за счет оттока из клетки избыточных протонов. За пределами нервной системы управляемые напряжением протонные каналы широко представлены в клетках иммунной системы [19], обеспечивая в том числе нормальную работу NADPH-оксидазы, ответственную за постоянную продукцию супероксид аниона (O_2^-) фагоцитами [22, 23], а также остеокластов, выводящих наружу H^+ и необходимых для резорбции костной ткани и последующих пластических перестроек кости [24], эпителиальных клеток [25] и др. Все протонные каналы переносят H^+ посредством цепного механизма образования водородных связей между молекулами воды, заполняющими пору канала: протон как бы «перескакивает» от одной молекулы воды к другой, передвигаясь таким образом через мембрану [19].

Специфическая мембранная проницаемость при сдвигах pH интерстиция. Первое указание на наличие в мембране нервных клеток специфических кислотных сенсоров относится к 1980 г. [26]. В последующем они получили название кислоточувствительных ионных каналов (*acid sensing ionic channels*, ASIC). Данная группа белковых молекул представляет наиболее просто организованные лигандуправляемые каналы и относится к семейству эпителиальных Na^+ -каналов/дегенеринов. Белки этого семейства найдены у представителей млекопитающих, круглых червей, насекомых, моллюсков [27]. Известно четыре гена, кодирующих образование кислоточувствительных ионных каналов – ASIC 1–4, из которых первые три существуют в нескольких вариантах сплайсинга [28]. В ходе онтогенеза, начиная с 12-го дня развития, экспрессия ASIC у крыс остается на постоянном уровне, что свидетельствует о раннем возникновении и стабильности уровня ASIC при развитии мозга [29]. Совместная экспрессия субъединиц различных ASIC в ооцитах *Xenopus* приводит к образованию белковых гетеромультимерных ансамблей с новыми свойствами, работающих как нейронные сенсоры кислот в разных диапазонах pH [30]. Высокий уровень экспрессии мРНК, кодирующей синтез ASIC, отмечен в нейронах неокортекса, гиппокампа, обонятельной луковицы, миндалина, мозжечка (ASIC 1–2) [29, 31]. В пределах нейрона ASIC экспрессируются в соме и вдоль ветвей аксонов и дендритов: те микроучастки, где pH может драматически понижаться (синаптические везикулы и синаптические мембраны), не насыщены кислоточувствительными ионными каналами [29]. В периферической нервной системе ASIC отмечены в чувствительных нейронах малого (преимущественно), среднего и большого диаметра спинно-мозговых узлов (ASIC 1–3) [32], тройничного узла [33], симпатических кардиальных афферентах (ASIC 3) [34], нейронах парасимпатических сердечных ганглиев [35], ганглиозных клетках сетчатки [36]. Транскрипты ASIC 4 не кодируют образование H^+ -управляемого ионного канала, хотя отмечена их колокализация с ASIC 1–3 во многих областях мозга, а также экспрессия в клетках внутреннего уха [37].

Все ASIC образуют канал, преимущественно обеспечивающий входящий Na^+ -ток при падении pH интерстиция. Тем не менее селективность канала невелика, он также проницаем для Ca^{2+} и K^+ , и его работа не зависит от напряжения на мембране [28, 31]. Специфическим блокатором ASIC является амилорид [38].

Нейронные функции при колебаниях pH интерстиция. Экспрессия ASIC в первичных сенсорных нейронах и активация последних при низких значениях внеклеточного pH предпо-

лагают участие в передаче ноцицептивной информации, опосредованной ацидофикацией, вызываемой травмой, воспалением, ишемией [28, 31, 39]. Помимо этого ASIC вовлечены в реализацию других сенсорных функций, включая восприятие нежного и грубого прикосновения (механорецепцию), тепла, кислого вкуса [40]. Роль ASIC в ЦНС до конца не выяснена. Известно, что нейронная активность сопровождается флуктуациями pH. В частности, массивный выброс кислотного содержимого синаптических везикул (pH~5,6) [41] способствует местной активации ASIC, что может приводить к модуляции передачи сигналов между нейронами [42]. При этом избыточные протоны могут блокировать кальциевые каналы, регулирующие выделение нейромедиатора (в частности, глутамата), образуя таким образом дополнительную локальную регуляторную петлю отрицательной обратной связи [43]. Мутантные по генам ASIC мыши характеризуются нормальным внешним видом, скоростью роста, температурой тела, фертильностью и не демонстрируют заметных нарушений в восприятии болевых ощущений [44]. Тем не менее ноль-мутанты отличаются умеренными нарушениями при пространственном обучении, мигании (ASIC 1^{-/-}), уменьшением некоторых компонент механочувствительности, в частности обусловленной смещением волос кожи (ASIC 2^{-/-}), снижением ответа на закисление и болевой тепловой стимул в С-волоках (ASIC 3^{-/-}) [44–46]. В условиях активации ASIC действие низких температур усиливает ионные токи через эти каналы, а также замедляет скорость их десенситизации, чем объясняется широко известная возможность модификации чувства вкуса и механочувствительности при изменении температуры [47]. Представители семейства ASIC 1 вовлечены в длительную потенциацию, заставляя предполагать, что кратковременные сдвиги pH в синапсах, активирующие ASIC, усиливают обучение животных [48].

Активация ряда аминокислотных рецепторов, в частности ГАМК_A и стрихнинчувствительных глициновых, сопровождается падением pH_i, обусловленным выходом бикарбоната из клетки по электрохимическому градиенту через ионную пору канала рецептора [49]. Сообщалось, что инъекции цАМФ и цГМФ (важнейших внутриклеточных регуляторов, концентрация которых может изменяться при самых разнообразных внешних воздействиях) в нейроны моллюска вызывают медленное закисление цитоплазмы [50]. В то же время действие норадреналина в свежееизолированных CA1 нейронах гиппокампа вызывает защелачивание внутриклеточного содержимого посредством активации цАМФ-зависимой протеин-киназы [51]. Закисление цитоплазмы наблюдается и при действии возбуждающих аминокислот (глутамат), что во многом объясняется входящим H⁺-током, сопряженным с обратным захватом нейромедиатора [52]. Справедливо и обратное – ионные токи, опосредуемые разнообразными рецепторными каналами, демонстрируют выраженную pH-зависимость: описана модуляция работы каинатных [53], глутаматных [54], ГАМК_A-рецепторов [55, 56]. В изолированных нейронах узловатого ганглия крыс снижение pH интерстиция усиливает, а повышение подавляет трансмембранный ток, активируемый АТФ, по-видимому, за счет протонирования определенных участков P2X рецепторов [57]. Увеличение pH_i приводит к частичной блокаде токов через управляемые циклическими нуклеотидами каналы палочек сетчатки и обонятельных рецепторов [58, 59].

Воспаление, ассоциируемое с ацидозом, приводит к экспрессии FMRFамидподобных нейропептидов, модулирующих болевые ощущения. Нейропептиды FF, SF, RFRP и FMRF сами по себе не генерируют трансмембранные токи, но усиливают протонуправляемые токи в культивируемых сенсорных нейронах, экспрессирующих ASIC [60–63]. Схожие эффекты отмечаются и при действии капсаицина, т. е. проводимость ваниллоидных рецепторов также подвержена модуляторному действию при снижении pH интерстиция [64–66]. Интересно, что в нейронах моллюсков *Helix aspersa* [67], *Helisoma trivolis* [68] и *Lymnaea stagnalis* [69] были обнаружены FMRFамидуправляемые Na⁺ каналы (FaNaC), структурно и функционально схожие с ASIC млекопитающих (FaNaCs *Lymnaea stagnalis* демонстрируют 60 % гомологии, а FaNaCs *Helix aspersa* – 23 % гомологии с ASIC), проводимость которых показывает определенную pH-зависимость. Гомологи указанных каналов у млекопитающих пока не идентифицированы [70].

* * *

Таким образом, колебания уровня pH интерстиция способны выраженно влиять на процессы возбуждения (уменьшаются при ацидозе) и торможения (усиливаются при ацидозе) в

ЦНС, хотя зависимость и не является абсолютной. Возможная разработка способов фармакологической коррекции уровня pH в нервной ткани (центральной и/или периферической нервной системе), например использование ингибиторов карбоангидразы, блокаторов и/или миметиков ASIC и протонуправляемых каналов плазмалеммы, может привести к созданию эффективных способов борьбы с нарушениями мозговых функций, сопровождаемых резким сдвигом кислотно-основного равновесия.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проекты № B02M-045, B05M-055).

1. Cragg P., Patterson L., Purves M.J. // *J. Physiol.* 1977. Vol. 272. P. 137.
2. Reeh P.W., Steen K.H. // *Prog. Brain Res.* 1996. Vol. 113. P. 143.
3. Caspers H., Speckman E.J. // *Epilepsia.* 1972. Vol. 13. P. 699.
4. Kraig R.P., Ferreira-Filho C.R., Nicholson C. // *J. Neurophysiol.* 1983. Vol. 49. P. 831.
5. Chesler M. // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. P. 1183.
6. Schwiening C.J. // *Physiol. News.* 2003. Vol. 50. P. 15.
7. Boussouf A., Gaillard S. // *J. Neurosci. Res.* 2000. Vol. 59. P. 731.
8. Gaillard S., Dupont J.L. // *J. Physiol.* 1990. Vol. 425. P. 71.
9. Ritucci N.A., Chambers-Kersh L., Dean J.B., Putnam R.W. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998. Vol. 275. P. R1152.
10. Bevensee M.O., Cummins T.R., Haddad G.G. et al. // *J. Physiol.* 1996. Vol. 494. P. 315.
11. Yao H., Ma E., Gu X.Q., Haddad G.G. // *J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 104. P. 637.
12. Pappas C.A., Ransom B.R. // *Glia.* 1993. Vol. 9. P. 280.
13. Baxter K.A., Church J. // *J. Physiol.* 1996. Vol. 493. P. 457.
14. Schwiening C.J., Kennedy H.J., Thomas R.C. // *Proc. R. Soc. Lond.* 1993. Vol. 253. P. 285.
15. Schwiening C.J., Willoughby D. // *J. Physiol.* 2002. Vol. 538. P. 371.
16. Ro H., Carson J.H. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 239. P. 37115.
17. Maren T.H. // *Physiol. Rev.* 1967. Vol. 47. P. 595.
18. Byerly L., Meech R., Moody W.Jr. // *J. Physiol.* 1984. Vol. 351. P. 199.
19. Decoursey T.E. // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. P. 475.
20. Morgan D., DeCoursey T.E. // *Front. Biosci.* 2003. Vol. 8. S1266.
21. Touret N., Grinstein S. // *J. Gen. Physiol.* 2002. Vol. 120. P. 767.
22. Morgan D., Cherny V.V. // *Front. Biosci.* 2003. Vol. 8. S1266.
23. Cherny V.V., Murphy R., Sokolov V. et al. // *J. Gen. Physiol.* 2003. Vol. 121. P. 615.
24. Mori H., Sakai H., Morihara H. et al. // *Kobe J. Med. Sci.* 2002. Vol. 48. P. 87.
25. DeCoursey T.E., Cherny V.V. // *J. Physiol.* 1995. Vol. 489. P. 299.
26. Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. // *Neurosci.* 1980. Vol. 6. P. 2325.
27. Kellenberger S., Schild L. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 735.
28. Waldmann R., Lazdunski M. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998. Vol. 8. P. 418.
29. Alvares de la Rosa D., Krueger S.R., Kolar A. et al. // *J. Physiol.* 2003. Vol. 546. P. 77.
30. Bassilana F., Champigny G., Waldmann R. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 28819.
31. Waldmann R., Champigny G., Bassilana F. et al. // *Nature.* 1997. Vol. 386. P. 173.
32. Chen C.C., England S., Akopian A.N., Wood J.N. // *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 10240.
33. Pidoplichko V.I. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1992. Vol. 11. P. 39.
34. Benson C.J., Eckert S.P., McCleskey E.W. // *Circ. Res.* 1999. Vol. 84. P. 291.
35. Kim D.K., Tateishi N., Akaike N. // *J. Neurophysiol.* 1990. Vol. 63. P. 1060.
36. Lilley S., LeTissier P., Robbins J. // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. P. 1013.
37. Akopian A.N., Chen C.C., Ding Y.N. et al. // *Neuroreport.* 2000. Vol. 11. P. 2217.
38. Canessa C.M., Horisberger J.D., Rossier B.C. // *Nature.* 1993. Vol. 361. P. 467.
39. McCleskey E.W., Gold M.S. // *Ann. Rev. Physiol.* 1999. Vol. 61. P. 835.
40. DeSimone J.A., Lyall V., Heck G.L., Feldman G.M. // *Respir. Physiol.* 2001. Vol. 129. P. 231.
41. Miesenbock G., De Angelis D.A., Rothman J.E. // *Nature.* 1998. Vol. 394. P. 192.
42. Waldmann R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001. Vol. 502. P. 293.
43. DeVries S.H. // *Neuron.* 2001. Vol. 32. P. 1107.
44. Price M.P., Lewin C.R., McIlwarth S.L. et al. // *Nature.* 2000. Vol. 407. P. 1007.
45. Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C. et al. // *Neuron.* 2002. Vol. 34. P. 463.
46. Price M.P., McIlwarth S.L., Xie J. et al. // *Ibid.* 2001. Vol. 32. P. 1071.
47. Askwith C.C., Benson C.J., Welsh M.J., Snyder P.M. // *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 6459.
48. Bianchi L., Driscoll M. // *Neuron.* 2002. Vol. 34. P. 337.
49. Kaila K., Voipio J. // *Nature.* 1987. Vol. 330. P. 163.
50. Connor J.A., Hockberger P. // *J. Physiol.* 1984. Vol. 354. P. 163.
51. Smith G.A., Brett C.L., Church J. // *Ibid.* 1998. Vol. 512. P. 487.
52. Bouvier M., Szatkowski M., Amato A., Attwell D. // *Nature.* 1992. Vol. 360. P. 471.
53. Mott D.D., Washburn M.S., Zhang S., Dingledine R.J. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. P. 1179.
54. Williams K., Dattilo M., Sabado T.N. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 305. P. 740.

55. Pasternack M., Smirnov S., Kaila K. // *Neuropharmacology*. 1996. Vol. 35. P. 1279.
56. Zhai J., Peoples R.W., Li C. // *Pflugers Arch*. 1998. Vol. 435. P. 539.
57. Li C., Peoples R.W., Weight F.F. // *J. Neurophysiol*. 1996. Vol. 76. P. 3048.
58. Picco C., Sanfilippo C., Gavazzo P., Menini A. // *J. Gen. Physiol*. 1996. Vol. 108. P. 265.
59. Gavazzo P., Picco C., Menini A. // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 1997. Vol. 264. P. 1157.
60. Askwith C.C., Cheng C., Ikuma M. et al. // *Neuron*. 2000. Vol. 26. P. 133.
61. Catarsi S., Babinski K., Seguela P. // *Neuropharmacology*. 2001. Vol. 41. P. 592.
62. Katz P. // *Curr. Opin. Neurobiol*. 1995. Vol. 5. P. 799.
63. Xie J., Price M.P., Wemmie J.A. et al. // *J. Neurophysiol*. 2003. Vol. 89. P. 2459.
64. Baumann T.K., Martenson M.E. // *J. Neurosci*. 2000. Vol. 20. P. RC80.
65. Kress M., Fetzer S., Reeh P.W., Vyklicky L. // *Neurosci. Lett*. 1996. Vol. 211. P. 5.
66. Vellani V., Mapplebeck S., Moriondo A. et al. // *J. Physiol*. 2001. Vol. 534. P. 813.
67. Cottrell G.A. // *J. Exp. Biol*. 1997. Vol. 200. P. 2377.
68. Jeziorski M.C., Green K.A., Sommerville J., Cottrell G.A. // *J. Physiol*. 2000. Vol. 526. P. 13.
69. Perry S.J., Straub V.A., Schofield M.G. et al. // *J. Neurosci*. 2001. Vol. 21. P. 5559.
70. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. // *Science*. 2001. Vol. 291. P. 1304.

Поступила в редакцию 24.04.08.

Александр Викторович Сидоров – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных.