

ИЗОФОРМ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

© 2016 г. И.И. Кривой

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: iikrivoi@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.16 г.

Проведен обзор литературных данных и результатов собственных исследований в области молекулярного и функционального разнообразия Na,K-АТФазы. Этот интегральный белок поддерживает градиенты концентраций Na^+ и K^+ , обеспечивая электрогенез, возбудимость, а также ряд других транспортных механизмов клетки. Основное количество Na,K-АТФазы у позвоночных сосредоточено в скелетных мышцах, которые ко-экспрессируют $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы каталитической и транспортной α -субъединицы Na,K-АТФазы. Активность Na,K-АТФазы критически важна для поддержания сократительной функции и работоспособности скелетных мышц. Накопленные факты позволяют предположить, что основную насосную функцию осуществляет $\alpha 1$ -изоформа Na,K-АТФазы. Изоформа $\alpha 2$ выполняет дополнительные функции, которые обусловлены ее специфической мембранной локализацией, функциональными взаимодействиями с белковым и липидным окружением, а также особенностями регуляции различными факторами, включая двигательную активность.

Ключевые слова: Na,K-АТФаза, изоформы, никотиновый холинорецептор, гарантийный фактор, нервно-мышечная передача, кардиотонические стероиды, двигательная активность.

Na,K-АТФаза И ЕЕ ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ

Сократительная активность скелетной мускулатуры является исключительно важным фактором функционирования организма млекопитающих, включая человека. Масса скелетных мышц составляет около 40% от всей массы тела. В них содержится до 75% общего количества K^+ в организме, тогда как внеклеточная фракция K^+ составляет всего около 2%. Нормальная концентрация K^+ составляет около 160 мМ в мышечных клетках и 3,5–5,3 мМ в плазме крови и в межклеточной среде [1,2]. В ходе генерации потенциалов концевой пластинки и мышечных потенциалов действия при сократительной активности происходит накопление Na^+ в миоплазме и K^+ снаружи [1,3–5]. В оттекающей от работающей мышцы крови концентрация K^+ повышается до 8 мМ, в межклеточной среде до 10 мМ и более, а в наиболее узких пространствах Т-системы концентрация K^+ может достигать десятков мМ [1–3,5,6]. Поскольку K^+ является основным потенциалобразующим ионом, уменьшение калиевого градиента будет приводить к деполяризации сар-

колеммы, инактивации потенциалозависимых Na^+ ($\text{Na}_v 1.4$)-каналов, снижению возбудимости, нарушению механизма генерации потенциалов действия и функционирования системы электромеханического сопряжения [1,3,4]. Кроме того, накопление K^+ в синаптических щелях может снижать уровень вызванной квантовой секреции ацетилхолина из моторных нервных окончаний [7]. Перечисленные пресинаптические и мышечные нарушения обязательно приведут к снижению работоспособности, утомлению и даже блокированию нервно-мышечной передачи [3,5,8,9].

Среди физиологических механизмов, препятствующих нарушению градиентов Na^+ и K^+ и поддерживающих нормальную концентрацию внеклеточного K^+ в скелетной мышце [9], важнейшую роль играет Na,K-АТФаза. Эта транспортная система, открытая д-ром J. Skou [10] (Нобелевская премия по химии 1997 г.), является интегральным белком плазматической мембраны, функционирующим как Na,K-насос, и обнаружена практически во всех животных клетках. Основная функция Na,K-АТФазы заключается в поддержании трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ за счет их активного АТФ-зависимого транспорта. Эти градиенты поддерживают необходимый уровень мембранного потенциала и возбудимость клеток, важны в ре-

Сокращение: нХР – никотиновые холинорецепторы, КТС – кардиотонические стероиды.

гуляции клеточного объема и внутриклеточного рН. Обеспечиваемый Na,K-АТФазой градиент Na⁺ поддерживает также функционирование сопряженных транспортеров Ca²⁺ и H⁺, глюкозы, аминокислот, нейромедиаторов, витаминов [1,3,4,11–14].

Скелетные мышцы содержат основной пул Na,K-АТФазы, причем плотность распределения Na,K-АТФазы в сарколемме чрезвычайно велика и составляет от 1000 до 3350/мкм² в зависимости от типа мышцы [8]. Важнейшими регуляторами функционирования Na,K-АТФазы являются внутриклеточный Na⁺ и внеклеточный K⁺, концентрации которых зависят от двигательной активности. Эта быстрая, кратковременная, форма регуляции осуществляется за счет изменения каталитической активности фермента. Кроме того, активность и биосинтез Na,K-АТФазы могут регулироваться различными нейромедиаторами и гормонами: катехоламинами, инсулином, инсулиноподобным фактором роста 1, тиреоидными и кортикостероидными гормонами, а также многими другими факторами. Регуляция этими факторами может быть кратковременной и осуществляться через соответствующие рецепторы и системы внутриклеточных мессенджеров. Но регуляция может носить и долговременный характер. При этом изменяется количество молекул Na,K-АТФазы в сарколемме за счет изменений в синтезе и деградации белка [3,8], а также в результате процесса транслокации (обмена с внутриклеточным пулом Na,K-АТФазы) [15].

Транспорт ионов осуществляется Na,K-АТФазой за счет АТФ-зависимых циклических переходов между двумя основными конформационными состояниями E1 и E2, в которых селективно связываются три иона Na⁺ внутри клетки и два иона K⁺ снаружи соответственно [16,17]. Энергия одной молекулы АТФ используется на транспортировку трех ионов Na⁺ из клетки и одновременно двух ионов K⁺ в клетку, т. е. суммарно за один цикл из клетки удаляется один положительный заряд. Поэтому величина мембранного потенциала покоя (V_m) клетки определяется не только ионными градиентами. В формировании V_m участвует и прямой электрогенный эффект Na,K-насоса, который заключается в дополнительной поляризации мембраны за счет нескомпенсированности потоков Na⁺ и K⁺ через мембрану (так называемый электрогенный компонент V_m). Регистрацию этого блокируемого убаином компонента используют для оценки электрогенной активности Na,K-АТФазы, которая в скелетных мышечных волокнах весьма значительна и достигает (в за-

висимости от типа мышцы и области сарколеммы) 12–20 мВ [18–22].

В скелетной мышце в покое, если активность Na,K-АТФазы блокирована убаином или другими способами (охлаждение, бескальциевый раствор), мембрана мышечных волокон деполяризована и величина V_m составляет около –60 мВ [18–23]. По-видимому, в отсутствие электрогенного транспорта, эта величина V_m в основном определяется ионными градиентами. Активация Na,K-АТФазы, наоборот, вызывает гиперполяризацию мембраны клеток. В скелетных мышцах млекопитающих при активации Na,K-АТФазы с помощью фармакологических агентов или частотной стимуляции мышц наблюдается гиперполяризация мышечной мембраны величиной до 10 мВ [18–21,24–27].

Активация Na,K-АТФазы и увеличение электрогенного компонента V_m принципиально важны для поддержания сократительной функции и работоспособности нервно-мышечного аппарата в условиях действия различных альтернирующих факторов. Многочисленные данные показывают, что в таких условиях активация Na,K-АТФазы тетанической стимуляцией мышцы или фармакологическими агентами способствует восстановлению сократительной способности мышц [3,4,8].

Отметим, что в центральной нервной системе, где наблюдается значительное повышение внеклеточной концентрации K⁺ при нейрональной активности, ключевую роль в поддержании K⁺-баланса также играет Na,K-АТФаза [28].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ Na,K-АТФазы И ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

Na,K-АТФаза представляет собой димер, состоящий из α - и β -субъединиц, во многих тканях она также содержит третью субъединицу – один из белков семейства FX_{YD} [11,12,14,29–31]. α -Субъединица представляет собой относительно большой (~110 кДа) интегральный белок, имеющий 10 трансмембранных доменов, причем оба конца пептидной цепи обращены в цитоплазму. Эта субъединица, содержащая места связывания с Na⁺, K⁺ и АТФ, отвечает за каталитические и транспортные свойства Na,K-АТФазы. Важной особенностью α -субъединицы Na,K-АТФазы является то, что ее внеклеточные участки формируют сайт связывания (рецептор) для сердечных гликозидов, которые являются специфическими лигандами (ингибиторами) Na,K-АТФазы [14,32–35]. β -Субъединица представляет собой однократно пересекající мембрану гликопротеин (~31,5 кДа), короткий N-конец которого находится в цито-

плазме, а большой С-конец располагается с наружной стороны клеточной мембраны. Эта субъединица играет важную роль в локализации и стабилизации функционального комплекса α/β в плазматической мембране, участвует в модуляции активности Na,K-АТФазы, а также в клеточной адгезии [36].

Белки семейства FXYD (~7 кДа) также имеют один трансмембранный домен, но, в отличие от β -субъединицы, не являются компонентом, необходимым для структурно-функционального формирования Na,K-АТФазы. Субъединица FXYD участвует в модуляции аффинности Na,K-АТФазы к Na^+ , K^+ и АТФ, влияет на кинетические и транспортные свойства энзима [37,38]. Предполагается, что в мышечных клетках субъединица FXYD в нефосфорилированном состоянии тормозит каталитическую активность Na,K-АТФазы. Фосфорилирование FXYD с участием протеинкиназ А и С увеличивает аффинность внутриклеточных сайтов к Na^+ и активность Na,K-АТФазы [38,39].

Как и многие другие функциональные белки [40–43], Na,K-АТФаза экспрессируется в различных молекулярных формах. Для млекопитающих известны четыре изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$ – $\alpha 4$), три изоформы β -субъединицы и семь белков семейства FXYD; все перечисленные белки кодируются собственными генами. Изоформы α -субъединицы различаются по чувствительности к Na^+ , K^+ , АТФ, а также по другим характеристикам. Комбинации различных изоформ α - и β -субъединиц с одним из белков FXYD обеспечивают широкое молекулярное и функциональное разнообразие Na,K-АТФазы [11,12,29,31,44].

Изоформа $\alpha 1$ обнаружена во всех животных клетках. Клетки некоторых тканей экспрессируют только эту изоформу (эритроциты, почки, печень). В большинстве тканей клетки, помимо изоформы $\alpha 1$, ко-экспрессируют также одну из изоформ $\alpha 2$ – $\alpha 4$. Изоформа $\alpha 2$ обнаружена в скелетной, гладкой и сердечной мышцах, адипоцитах, а также в глиальных клетках; изоформа $\alpha 3$ преобладает в нервной ткани. Изоформа $\alpha 4$ обнаружена только в семенниках и сперме [11–13,29,31].

Как правило, $\alpha 1$ -изоформа Na,K-АТФазы относительно равномерно распределена в плазматической мембране. Характерной особенностью изоформ $\alpha 2$ – $\alpha 4$ в гладкой и сердечной мышцах, астроцитах и сперматозоидах является их локализация в особо организованных микродоменах, образованных плазматической мембраной и внутриклеточными органеллами (сар-

ко(эндо)плазматический ретикулум, митохондрии). В таких компартментах осуществляется взаимодействие этих изоформ Na,K-АТФазы с транспортными механизмами, зависящими от градиента Na^+ (Na^+ , Ca^{2+} - и Na^+ , H^+ -обменники), ионными каналами, рецепторами и другими функциональными белками [45–49]. Показано, что N-конец $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ Na,K-АТФазы имеет структурный участок, который отвечает за их способность кластеризоваться в этих микродоменах [50]. Кроме того, в формировании подобных микродоменов участвуют такие белки цитоскелета, как спектрины и анкирины [51–53].

Известно также, что мембранные белки взаимодействуют с липидным окружением, которое оказывает существенное влияние на функционирование Na,K-АТФазы. Показана локализация определенного пула Na,K-АТФазы в специализированных липидных микродоменах мембраны (липидные плотники, кавеолы). В этих микродоменах Na,K-АТФаза за счет взаимодействия с молекулярным окружением образует регуляторные мультимолекулярные комплексы и реализует новые функции, в частности сигнальную [33,47,53–56].

В скелетных мышцах грызунов экспрессируются $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [11,44,57]. Помимо этих изоформ в скелетных мышцах человека экспрессируется также $\alpha 3$ -изоформа [58–61]. Обе $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы могут быть ассоциированы с субъединицами $\beta 1$ или $\beta 2$ [62,63], а также с субъединицей FXYD1 (фосфолемман) [20,21].

Многочисленные данные свидетельствуют об изоформ-специфичности функций Na,K-АТФазы в скелетных мышцах [2,64–66]. Показано, что тиреоидные гормоны, инсулин, глюкокортикоиды, внеклеточный K^+ , холинергические лиганды, эндогенные дигиталисоподобные факторы, двигательная активность, влияют на индукцию и активность преимущественно $\alpha 2$ -изоформы скелетных мышечных волокон [2,19,22,62,67–70]. Фракция $\alpha 2$ -изоформы от общего количества Na,K-АТФазы в зависимости от типа мышечных волокон составляет от 60% до 87% [44,57,62]. Несмотря на это, базовую насосную функцию по поддержанию ионных градиентов в покое в основном выполняет $\alpha 1$ -изоформа, вклад $\alpha 2$ -изоформы в V_m скелетных мышечных волокон относительно невелик [19,20,71].

Обнаружена существенная неоднородность распределения $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы в плазматической мембране и таких мембранных компартментах, как Т-система и кавеолы.

Изоформа $\alpha 1$ равномерно распределена в поверхностной плазматической мембране, при этом ее кавеоларная фракция незначительна. Изоформа $\alpha 2$ преимущественно локализована в Т-системе и в гораздо меньшей степени в кавеолах [9,63,72]. Показано, что активность локализованной в Т-системе $\alpha 2$ -изоформы играет важную роль в поддержании работоспособности скелетной мышцы при интенсивной нагрузке, когда можно ожидать существенного повышения концентрации K^+ в узких пространствах Т-системы с ограниченной диффузией [64,65]. Предполагается, что $\alpha 1$ -изоформа, обладающая относительно более высокой аффинностью к K^+ по сравнению с изоформой $\alpha 2$, выполняет основную насосную функцию в покое и при слабой сократительной активности. Изоформа $\alpha 2$ в таких условиях малоактивна. Однако ее активность быстро повышается при интенсивной мышечной работе, сопровождающейся накоплением K^+ в Т-системе, и это критично для поддержания сократительной способности скелетной мышцы [65].

Отдельно следует отметить существование пула $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, локализованного в области концевой пластинки [20,22]. Функциональная роль этого пула будет рассмотрена в следующем разделе обзора.

Na,K-АТФаза И ГАРАНТИЙНЫЙ ФАКТОР НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ

Поддержание определенного уровня V_m мышечных волокон является обязательным условием нормального функционирования скелетной мышцы. Деполяризация мембраны ведет к инактивации Na^+ -каналов, уменьшению возбудимости, замедлению временного хода потенциалов действия и скорости их проведения, а также к нарушению функционирования системы электромеханического сопряжения [73,74]. Наиболее серьезны последствия нарушений электрогенеза для околосинаптической области сарколеммы, где происходит трансформация локального потенциала концевой пластинки в распространяющийся потенциал действия. Способность мышечного волокна к сокращению зависит от так называемого гарантийного фактора (safety factor) нервно-мышечной передачи, который определяется как отношение амплитуды потенциала концевой пластинки к порогу генерации потенциала действия [73,75]. Сокращение каждого отдельного мышечного волокна возможно, если величина гарантийного фактора превышает единицу. В разных мышцах величина гарантийного фактора составляет от двух

до пяти, но следует иметь в виду, что при ритмической утомляющей активности эта величина снижается [73].

Даже относительно небольшая по величине, но длительная по времени деполяризация мембраны концевой пластинки ведет к медленной инактивации значительной фракции локализованных там натриевых каналов. Это повышает порог генерации мышечного потенциала действия и снижает гарантийный фактор нервно-мышечной передачи, гиперполяризация мембраны оказывает противоположное действие [75]. В связи с этим особое значение приобретает тот факт, что мембрана концевой пластинки скелетных мышечных волокон млекопитающих гиперполяризована на 2–4 мВ по сравнению с внесинаптической областью сарколеммы. Эту локальную гиперполяризацию рассматривают как важный фактор структурно-функциональной организации нервно-мышечного синапса. По ряду данных причиной гиперполяризации является повышение электрогенной активности Na,K-АТФазы за счет негидролизованного ацетилхолина, постоянно присутствующего в синаптической щели в наномолярной концентрации даже при активной ацетилхолинэстеразе [25,27,76]. Предполагается, что источником этого ацетилхолина в основном является медиатор, выделяющийся из моторного нервного окончания и из мышечных волокон в некантовой форме. Это могут быть также отдельные молекулы ацетилхолина, сохранившиеся в синаптической щели после нервной активности.

Позднее было показано, что в основе гиперполяризующего действия ацетилхолина лежит функциональное взаимодействие между никотиновыми холинорецепторами (нХР) и Na,K-АТФазой. Рассматривают две модели такого взаимодействия.

Первая модель основана на том, что функциональное взаимодействие между нХР и Na,K-АТФазой опосредовано Na^+ , входящим через открытые каналы нХР. В соответствии с общепринятыми представлениями нХР осуществляют конформационные переходы между закрытым, открытым и десенситизированным состояниями, описываемые вероятностными закономерностями [77–79]. Для активации нХР и открывания ионного канала рецептора требуются микромолярные концентрации ацетилхолина. В зонах действия одиночных квантов локальная концентрация ацетилхолина на очень короткое время достигает 10^{-2} – 10^{-4} М. За счет этого ацетилхолин действует в насыщающей концентрации, что обеспечивает наибольшую эффективность его взаимодействия с нХР. Активация нХР приводит к открыванию ионного

канала рецептора и деполяризации мембраны клетки. Однако за счет функциональной связи нХР с Na,K-АТФазой холинергические агонисты способны вызывать противоположный эффект – гиперполяризацию мембраны. В частности, в нейронах после спайковой активности или после действия ацетилхолина может наблюдаться следовая гиперполяризация мембраны. В опытах на ганглионарных нейронах крысы установлено, что устойчивая (длительностью до минут) следовая гиперполяризация, наблюдаемая после действия микромолярных концентраций ацетилхолина, в основном осуществляется за счет входящих через каналы нХР ионов натрия, активирующих Na,K-АТФазу. Предполагается, что такая гиперполяризация может служить механизмом саморегуляции возбудимости мембраны и интенсивности частоты разрядов постсинаптических нейронов [80].

Вторая модель основана на предположении о том, что функциональное взаимодействие нХР и Na,K-АТФазы в скелетной мышце обусловлено прямым молекулярным взаимодействием этих белков [20,81,82]. Эта модель базируется на следующих фактах. Показано, что ионные токи через открытый канал нХР (прежде всего, входящий Na^+) не являются решающим фактором функциональной связи между нХР и Na,K-АТФазой [20,81,83]. Установлено, что ацетилхолин способен связываться с нХР в непроводящем десенситизированном состоянии, при котором аффинность рецептора к ацетилхолину повышена на два–четыре порядка и лежит в наномолярном диапазоне [84–86], сопоставимом с уровнем негидролизованного ацетилхолина в синаптической щели. С последним согласуется тот факт, что в скелетных мышечных волокнах гиперполяризующее действие способны оказывать наномолярные концентрации ацетилхолина [24,25,27] и никотина [83], причем эффект реализуется через активацию $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [20,81,83,87]. Кроме того, установлено, что фармакологические агенты, сдвигающие равновесие между конформационными состояниями покоя и десенситизации нХР, способны модулировать гиперполяризующее действие ацетилхолина [20]. Исследования на мембранных препаратах из электрического органа *Torpedo* (бесклеточная система), содержащих нХР и Na,K-АТФазу, показали, что существует реципрокное молекулярное взаимодействие между этими белками за счет конформационных изменений в ответ на специфическое связывание соответствующих лигандов [20,81]. Наконец, продемонстрирована ко-локализация нХР и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в области концевой пластинки, а также ко-иммунопреципитация

нХР, Na,K-АТФазы, фосфолеммана (белок FXYD1) и кавеолина-3, что позволяет предположить локализацию этого мультимолекулярного комплекса в кавеолах [20,21].

Полученные данные позволили сформулировать гипотезу о существовании функционального молекулярного комплекса нХР/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза, локализованного в кавеолах. Предположительно, принципиальными для осуществления взаимодействия этих белков являются десенситизированное состояние нХР и конформационное состояние E2 для Na,K-АТФазы [20,66,81,82]. Результатом этого взаимодействия является локальная гиперполяризация мембраны концевой пластинки. Эта гиперполяризация рассматривается как физиологический механизм, препятствующий инактивации Na^+ -каналов и поддерживающий гарантийный фактор нервно-мышечной передачи [20,66,82].

Важно, что подобная функциональная и молекулярная реципрокная связь с Na,K-АТФазой показана не только для нХР мышечного типа в скелетной мышце, но и для нХР нейронального типа у насекомых [88]. Таким образом, получены дополнительные свидетельства новой функциональной роли нХР как модулятора Na,K-АТФазы, не связанной с функцией нХР как лиганд-управляемого ионного канала.

Вопрос об участии (помимо FXYD1 и кавеолина-3) других факторов молекулярного окружения в организации комплекса нХР/ $\alpha 2$ Na,K-АТФаза остается открытым. В частности, пока не совсем понятна роль белков цитоскелета. Одним из таких белков является дистрофин, участвующий в организации постсинаптического скаффолда и кластеризации нХР [89,90]. Данные, полученные в опытах на мышцах mdx, характеризующихся дефицитом синтеза дистрофина, подтверждают участие этого белка в молекулярном механизме поддержания локальной гиперполяризации мембраны концевой пластинки за счет функциональной связи нХР и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [91,92]. Предположительно, в организации функциональной связи этих белков могут участвовать также спектрины и анкирины, отвечающие за специфическую локализацию Na,K-АТФазы [51,52,72,93], но этот вопрос требует специального анализа.

На функционирование мембранных белков существенное влияние оказывает липидное окружение [94]. В частности, холестерин взаимодействует с нХР, что важно для их нормального функционирования и кластеризации в концевой пластинке [95–97]. Учитывая эти данные, а также роль холестерина в компартиментализации, стабилизации и регуляции Na,K-АТФазы

[56,98–101], можно предположить участие холестерина в формировании функциональной связи нХР и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. В частности, показано, что перераспределение холестерина липидных плотиков при действии метил- β -циклодекстрина сопровождается снижением электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы и исчезновением локальной гиперполяризации мембраны концевых пластинок диафрагмы крысы [102].

Отметим, что следует также учитывать роль актинового цитоскелета, который участвует в модуляции, кластеризации и диффузии белков мембраны, а также в стабильности липидных плотиков [103–105].

Na,K-АТФаза И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ ЛИГАНДЫ

В основе действия табака лежат физиологические эффекты алкалоида никотина, который является специфическим экзогенным лигандом нХР, опосредующих в организме самые разнообразные эффекты нейромедиатора ацетилхолина. В центральной нервной системе эти рецепторы участвуют во многих физиологических и поведенческих функциях (когнитивные процессы, память и обучение, нейрональное развитие, мозговой кровоток и метаболизм, формирование никотиновой зависимости и др.) [106,107]. В скелетной мышце нХР опосредуют синаптическую передачу сигнала от двигательного нерва к мышце.

Концентрация никотина, циркулирующего в крови при курении табака, составляет порядка 100 нМ [108,109]. Изучение хронического воздействия этих низких концентраций никотина на функции нХР самых разных систем организма (центральная нервная система, периферическая нервная система, скелетная мускулатура) важно для понимания механизмов никотиновой интоксикации. Поскольку нХР регулируют нейрональную активность в структурах мозга, относящихся к системе естественного подкрепления, которая ответственна за формирование зависимости не только к никотину, но и к другим наркотикам (кокаин, амфетамин, морфин и др.) [110], основное внимание исследователей сосредоточено на роли никотина в центральной нервной системе. В частности, большое внимание уделяется проблеме десенситизации нХР, обусловленной длительным действием никотина, как важного фактора функциональных изменений в различных структурах центральной нервной системы [111].

Что касается скелетной мускулатуры, содержащей большой пул нХР, потенциальных ми-

шеней циркулирующего никотина, то лишь в немногих работах изучается влияние курения и хронической никотинизации на скелетные мышцы [112–115]. Рассмотренные выше данные о функциональной и молекулярной связи между нХР и $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы предполагают возможность модуляции Na,K-АТФазы никотином в скелетной мышце. 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.

Хроническое введение никотина крысам путем подкожных инъекций в течение двух–трех недель вызывало снижение электрогенного вклада $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы и деполяризацию мембраны волокон диафрагмальной мышцы [116]. Сходная деполяризация наблюдалась в *m. soleus* крысы при кратковременном (трое суток) локальном подведении к мышце более высоких концентраций никотина с помощью силиконовых имплантатов [117]. Введение крысам никотина с питьевой водой в течение трех–четырех недель вызывало снижение количества $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в саркомере мышечных волокон диафрагмы и деполяризацию мембраны, хотя электрогенная активность этой изоформы возрастала [21]. Отметим, что специфическое снижение активности и экспрессии $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в условиях хронического введения никотина с помощью осмотических мини-помп в течение 14 дней было обнаружено также в сосудах гемато-энцефалического барьера и в мозге крысы [118].

Механизм длительного действия никотина на Na,K-АТФазу остается неясным. Имеющиеся данные позволяют предположить, что этот механизм сложный и может реализовываться за счет активации протеинкиназы С и усиления фосфорилирования фосфолеммана (FXD1) [21]. Важно, что этот вопрос касается и других холинергических лигандов. В частности, применение в клинике антихолинэстеразных препаратов (используемых как стимуляторы памяти, при лечении ряда нейродегенеративных расстройств, миастении и др.) сопровождается повышением уровня циркулирующего негидролизованного эндогенного ацетилхолина. 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.

Интересно, что хроническое действие другого психоактивного вещества – морфина – также сопровождается деполяризацией гладкомышечных клеток и миентеральных нейронов вследствие снижения электрогенной активности Na,K-АТФазы за счет уменьшения количества нейрональной $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТФазы [119]. Механизм этого эффекта пока неясен, но появляется все больше данных о ко-локализации и возможности функциональной и молекулярной связи между Na,K-АТФазой и опиоидными рецепторами разного типа [120,121].

САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ

Внеклеточные участки α -субъединицы Na,K-АТФазы формируют специфический рецептор для дигиталисоподобных сердечных гликозидов, широко применяемых в клинике сердечно-сосудистых заболеваний. Это вещества растительного и животного происхождения, все они являются ингибиторами Na,K-АТФазы, имеют сходную стероидную структуру и в настоящее время их обычно называют кардиотоническими стероидами (КТС) [14,33,122].

Изоформы α -субъединицы Na,K-АТФазы различаются по чувствительности к специфическому ингибитору Na,K-АТФазы убаину и другим КТС. Наибольшее различие в аффинности к убаину наблюдается у изоформ α -субъединицы грызунов: константа блокирования $\alpha 1$ -изоформы составляет $\sim 50\text{--}450$ мкМ, тогда как для изоформ $\alpha 2$ и $\alpha 3$ эта константа на два–четыре порядка ниже и составляет десятки и сотни нМ [11,13,33]. Наибольшей чувствительностью (единицы нМ) обладает $\alpha 4$ -изоформа Na,K-АТФазы [11]. Однако у других млекопитающих (человек, свинья, собака, овца, кролик и др.) $\alpha 1$ -изоформа относительно чувствительна к убаину [11,13,14,33]. У человека $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформы имеют примерно одинаковую аффинность к убаину в наномолярном диапазоне концентраций [58–61]. Аффинность этих изоформ у человека к другим КТС ниже и составляет десятки и сотни нМ [60,61].

Специфический рецептор к КТС является высококонсервативным и его формируют в основном внеклеточные участки между трансмембранными доменами M1–M2, M5–M6 и M7–M8 α -субъединицы, а также некоторые аминокислоты участков M4, M6 и M10 [14,32,33,123]. Чувствительность к убаину определяют две аминокислоты в позициях 111 и 122 между трансмембранными доменами M1–M2. Замена этих аминокислот у мышей позволяют получить

животных с разным сочетанием чувствительности к убаину у $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ, что используют для изучения физиологической роли специфического сайта связывания КТС [33].

Детальное изучение структуры специфического сайта связывания КТС позволяет предположить существование двух сайтов – с высокой и низкой аффинностью к убаину [32,34,35]. В соответствии с одной из моделей оба эти сайта располагаются вдоль пути перемещения ионов Na,K-АТФазой. Ближе к внеклеточной среде находится внешний низкоаффинный сайт, глубже, ближе к внутриклеточной среде располагается сайт с высокой аффинностью к убаину [34]. Однако как происходит связывание КТС с α -субъединицей Na,K-АТФазы, во многом остается неясным.

Установлено, что основную роль в реализации положительного инотропного действия КТС в сердечной и гладкой мышцах играет $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы [124,125]. Предположительно, регуляция сократительной активности осуществляется за счет локального повышения уровня Ca^{2+} в участках кластеризации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с Na^+ , Ca^{2+} -обменником, различными Ca^{2+} -каналами и Ca^{2+} -АТФазами в местах тесного прилегания плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму (так называемая модель «PLasmERosome»). В соответствии с этой моделью ингибирование Na,K-АТФазы при связывании КТС приводит к тому, что в этих узких примембранных пространствах с ограниченной диффузией происходит накопление Na^+ и сопряженное с ним накопление Ca^{2+} в результате изменения работы Na^+ , Ca^{2+} -обменника. В регуляции локальной концентрации Ca^{2+} участвуют также потенциалозависимые и депо-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, SERCA, риадиноновый и IP_3 -рецепторы саркоплазматического ретикулума [46–48].

Положительное инотропное действие КТС показано и в скелетной мышце [57,126,127], однако его механизм остается неизвестным. Судя по некоторым данным, этот эффект, как и в сердечной мышце, обусловлен повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при участии $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [57,66]. В скелетной мышце аналогом «PLasmERosome» можно считать триадное соединение между Т-тубулами и концевыми цистернами саркоплазматического ретикулума, где ко-локализированы дигидропиридиновый рецептор, Na^+ , Ca^{2+} -обменник, Ca^{2+} -АТФаза, риадиноновые рецепторы, SERCA [128–130]. Поскольку $\alpha 2$ -изоформа присутствует в Т-системе скелетных мышечных

волокон, причем, по некоторым данным, вблизи триад [9,63,72], можно предположить участие этой изоформы в регуляции локальной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} по механизму «PLasmERosome» [66].

Тот факт, что α -субъединица Na,K-АТФазы служит специфическим рецептором для КТС, привело к появлению гипотезы о существовании эндогенных лигандов к этому рецептору. Из различных тканей и биологических жидкостей животных и человека выделены убаин, дигоксин, маринобуфагенин, телоцинобуфагенин и др. ингибиторы Na,K-АТФазы [14,33,47,123,131–133]. Эти лиганды также имеют стероидную структуру и, предположительно, синтезируются в коре надпочечников, гипоталамусе и гипофизе. По ряду данных эти соединения играют важную роль в самых различных физиологических реакциях и патофизиологических процессах. Реципрокные изменения уровня эндогенных КТС и активности Na,K-АТФазы являются общими признаками различных патологий сердечно-сосудистой системы и центральной нервной системы, наблюдаются при интенсивной физической нагрузке, адаптации в экстремальных условиях (гипоксия и др.). В настоящее время наиболее изучены эндогенные аналоги убаина и маринобуфагенина. Концентрация этих эндогенных ингибиторов Na,K-АТФазы в плазме крови и цереброспинальной жидкости в норме лежит в субнанолярном диапазоне концентраций, но в перечисленных выше условиях может резко возрастать [13,47,123,133,134].

Ряд данных подтверждает регуляторную роль эндогенных КТС в различных тканях [13,47,123,133,134], а также возможность их нейропротекторного действия [135–137]. В то же время очень мало известно о действии эндогенных КТС в скелетной мышце [2,19,127]. Показано, что убаин и маринобуфагенин увеличивают силу сокращений изолированной диафрагмы крысы в субнанолярном диапазоне [127], соответствующем уровню циркулирующих эндогенных аналогов этих ингибиторов Na,K-АТФазы. Предположительно, этот эффект реализуется за счет $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [66]. Такая возможность подтверждается данными, полученными на скелетной мышце генетически модифицированных мышцей с убаин-резистентной $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы с применением Digibind (антител, связывающих циркулирующие КТС). Показано, что $\alpha 2$ -изоформа регулируется эндогенными КТС и ее физиологическая роль может заключаться в динамической адаптации скелетной мышцы к физической нагрузке [2].

Na,K-АТФаза И ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Активность Na,K-АТФазы критически важна для поддержания электрогенеза, возбудимости и сократительной функции скелетных мышц, что необходимо для обеспечения полноценного образа жизни, включая функционирование центральной нервной системы [138]. С другой стороны, Na,K-АТФаза скелетных мышц сама регулируется двигательной активностью. Хорошо известно, что самые разнообразные формы повышения двигательной активности сопровождаются увеличением количества Na,K-АТФазы и, по ряду данных, по-разному влияют на $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы фермента [3,4,139–144]. При этом наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ [141], а также увеличение количества фосфолеммана (белок FXYD1, ассоциированный с α -субъединицей Na,K-АТФазы) в сарколемме [142,145] и уровня его фосфорилирования [144].

Наоборот, ослабление двигательной активности сопровождается уменьшением количества Na,K-АТФазы [3,4]. Поскольку длительная функциональная разгрузка (неиспользование) скелетной мышцы приводит к потере мышечной массы, ослаблению сократительной функции и в конечном счете к атрофии [146,147], вопрос о роли Na,K-АТФазы в процессах адаптации мышц к условиям разгрузки весьма актуален. По немногочисленным пока данным длительное прекращение или ослабление двигательной активности вызывает изоформ-специфические нарушения функционирования Na,K-АТФазы. У людей с повреждением спинного мозга наблюдается уменьшение количества обеих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы и снижение экспрессии FXYD1 [148]. Травма колена сопровождается специфическим снижением количества $\alpha 2$ -изоформы в мышцах конечности [149]. Отмечено снижение количества $\alpha 2$ -изоформы в скелетных мышцах пожилых людей, что связывают с их меньшей подвижностью [150].

Антиортостатическое вывешивание задних конечностей грызунов широко применяется как модель функциональной и гравитационной разгрузки, которая вызывает атрофию постуральных скелетных мышц и позволяет изучать молекулярные механизмы этих нарушений [151]. Через три–семь дней разгрузки в *m. soleus* крысы начинают интенсивно развиваться атрофические процессы, и наблюдается изменение характера экспрессии изоформ сократительных и регуляторных белков [146,152,153]. Атрофия сопровождается деполаризацией мембраны мышечных волокон [154–156], причем происходит

это за счет снижения электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [157]. Однако нарушения функционирования $\alpha 2$ -изоформы наблюдаются и на более ранних (24 ч) сроках разгрузки еще до появления признаков атрофических изменений [70].

Недавно было показано, что даже кратковременное (6–12 ч) вывешивание специфически влияет на электрогенную активность, уровень белка и экспрессию мРНК $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в *m. soleus* крысы [22]. Установлено, что угнетение активности внесинаптического пула $\alpha 2$ -изоформы обусловлено отсутствием двигательной нагрузки и даже повышение уровня белка и экспрессии мРНК, наблюдаемые после 12 ч разгрузки, не могут восстановить ее активности. Напротив, постсинаптический пул $\alpha 2$ -изоформы регулируется дополнительными (возможно, циркулирующими) факторами и способен к восстановлению активности даже в условиях разгрузки. Важно, что даже кратковременная редкая стимуляция двигательного нерва вызывает восстановление электрогенной активности обоих пулов $\alpha 2$ -изоформы. Эти данные показывают, что функционирование $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в скелетной мышце строго зависит от двигательной активности и что пост- и внесинаптический пулы фермента регулируются по-разному. Установлено, что снижение активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы не связано с изменением уровня белка и экспрессии мРНК, нарушением локализации в мембране или взаимодействием с нХР, а обусловлено подавлением именно функциональной активности этой изоформы. Предположительно, последнее объясняется увеличением количества фосфолеммана (белок FX γ YD1) и усилением его ассоциации с $\alpha 2$ -субъединицей Na,K-АТФазы [22].

Усиление экспрессии мРНК $\alpha 2$ -изоформы, сопровождающее снижение ее активности, показано и в условиях утомления скелетной мышцы. Это усиление расценивается как возможный компенсаторный механизм, направленный на поддержание мышечной функции [158]. Однако молекулярные механизмы регуляции $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в условиях двигательной разгрузки во многом остаются неясными. Помимо FX γ YD1, в такой регуляции могут участвовать и другие факторы.

В частности, не вполне ясна роль входящего Na⁺, внутриклеточная концентрация которого является важнейшим регулятором активности и экспрессии Na,K-АТФазы [8]. В нейронах активация Na,K-АТФазы, проявляющаяся в следовой гиперполяризации мембраны после

действия высоких концентраций ацетилхолина, может осуществляться за счет Na⁺, входящего через открытые каналы нХР нейронального типа [80]. В опытах на различных клетках показано, что усиление входа Na⁺ увеличивает уровень белка и экспрессию мРНК Na,K-АТФазы [139,159–161]. Блокирование входа Na⁺ вызывает противоположный эффект [161]. В скелетных мышечных клетках усиление входа Na⁺ селективно повышает количество $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [161]. Возможно, что такая адаптивная реакция направлена на предотвращение избыточного накопления Na⁺ при интенсивной сократительной активности. При снижении двигательной активности в начальный период вывешивания задних конечностей наблюдается резкое ослабление электромиограммы и нейрограммы в *m. soleus* крысы [162,163] и, значит, следует ожидать уменьшения внутриклеточной концентрации Na⁺. С одной стороны, это должно вызывать снижение активности Na,K-АТФазы. С другой стороны, при кратковременном (6–12 ч) вывешивании в *m. soleus* крысы усиливается уровень фосфорилирования FX γ YD1 [22], что может увеличивать аффинность внутриклеточных сайтов Na,K-АТФазы к Na⁺ и активировать ее работу [38,39].

Есть и другие, зависящие от двигательной активности скелетной мышцы, регуляторы Na,K-АТФазы, например АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФ-activated protein kinase, АМПК). Это метаболический сенсор, который активируется в условиях сократительной деятельности, когда возрастает потребление энергии клеткой и увеличивается внутриклеточное соотношение АМФ/АТФ. Показано, что активация АМФ-активируемой протеинкиназы при физической нагрузке стимулирует Na,K-АТФазу, и это расценивается как важный фактор, который поддерживает ионный гомеостазис и препятствует развитию утомления [164]. В последнее время появляются многочисленные новые данные об изменении при функциональной разгрузке скелетной мышцы уровня оксида азота (NO) [165], а также данные об участии NO в регуляции Na,K-АТФазы [166,167]. Роль этих регуляторов Na,K-АТФазы в условиях сниженной двигательной активности еще предстоит выяснить.

ПЕРСПЕКТИВЫ

Рассмотренные выше данные позволяют предположить, что перспективными для дальнейшего изучения изоформ-специфичности функционирования Na,K-АТФазы в скелетной мышце могут быть экспериментальные модели

нарушений двигательной активности, приводящие к развитию различных форм миопатии.

Одна из таких лабораторных моделей – мыши линии mdx. Известно, что дистрофиновый гликопротеиновый комплекс играет важную роль в поддержании структурной целостности мембраны, организации постсинаптического скаффолда и кластеризации nXP в концевой пластинке [89,90]. Основным компонентом этого комплекса является белок цитоскелета дистрофин. Мутации дистрофина и нарушение компонентов дистрофинового комплекса служат причиной развития мышечной дистрофии, одной из наиболее тяжелых форм которой является X-сцепленная мышечная дистрофия Дюшенна. Наиболее широко применяемой экспериментальной моделью данного заболевания являются мутантные мыши mdx, характеризующиеся точечной мутацией в X-хромосоме, приводящей к блокаде синтеза дистрофина [168]. Скелетные мышцы этих животных отличаются нарушением целостности сарколеммы, деструктивными изменениями нервно-мышечных соединений [89,169] нарушением ионного баланса [74] и многими другими отклонениями.

Серьезным нарушением является также деполяризация мембраны мышечных волокон мышцей mdx [74,170,171]. Эта деполяризация обусловлена, прежде всего, повреждениями сарколеммы вследствие отсутствия белка цитоскелета дистрофина. Важными также могут являться сопутствующие факторы: увеличение входа Na^+ вследствие нарушения работы потенциалозависимых натриевых каналов $\text{Na}_v1.4$ типа [172] и накопление внутриклеточного Ca^{2+} [173]. На величину V_m может также влиять снижение электрогенной активности Na,K-АТФазы. Ранние исследования свидетельствуют об увеличении активности и количества Na,K-АТФазы [174,175], однако в более поздних работах показано снижение электрогенной активности Na,K-АТФазы в скелетных мышцах мышцей mdx [74,171]. Важно, что при этом никаких признаков нарушения функционирования $\alpha 1$ -изоформы не было обнаружено [74], что косвенно свидетельствует о специфическом нарушении, связанном с $\alpha 2$ -изоформой Na,K-АТФазы. Последнее подтверждается данными о том, что в диафрагме мышцей mdx не только снижена величина V_m , но и отсутствует локальная гиперполяризация мембраны концевой пластинки, т. е. нарушена функциональная связь nXP и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы [91,92].

Другой перспективной моделью могут оказаться мыши с нарушениями функционирования белка дисферлина. Известно, что к важнейшим свойствам клетки относится механизм поддер-

жания целостности плазматической мембраны. Этот физиологический механизм является фундаментальным для поддержания функционирования скелетных мышечных клеток в течение их жизни, а его нарушение приводит к развитию различных форм миодистрофии. Так, интенсивная двигательная активность может вызвать микроповреждения целостности сарколеммы с последующим входом наружного Ca^{2+} в этих участках волокна, нарушением электромеханического сопряжения, активацией ряда Ca^{2+} -зависимых каскадов, включая Ca^{2+} -зависимый протеолиз и оксидативный стресс. Все вместе будет вызывать дальнейшее повреждение мышечного волокна, миопатию, воспаление и некроз [176–178]. По современным представлениям, процессы восстановления целостности плазматической мембраны осуществляются за счет Ca^{2+} -зависимого механизма слияния мембранно-связанных внутриклеточных везикул с сарколеммой в местах ее повреждения в ходе естественной сократительной активности. Предполагается, что ключевым белком, координирующим механизм восстановления сарколеммы, является дисферлин.

Физиологические функции дисферлина до сих пор во многом остаются неясными. Дисферлин имеет один трансмембранный домен на С-конце и семь последовательных внутриклеточных С2 доменов на N-конце, чувствительных к Ca^{2+} и фосфолипидам. Этот белок локализован в сарколемме, однако он также обнаружен во внутриклеточных везикулах и в Т-системе скелетных мышц [177,178]. Дисферлин образует молекулярный комплекс с различными белками, из которых основными являются кавеолин-3 и аннексин, и предположительно вовлечен в процессы трафика и слияния везикул. Механизм восстановления целостности плазматической мембраны является сложным Ca^{2+} -зависимым процессом, состоящим из нескольких последовательных этапов слияния внутриклеточных везикул с сарколеммой в местах ее повреждения и образования высокоорганизованного скаффолда, играющего роль мембранной «заплатки» [176,179].

У мышцей с дефицитом синтеза дисферлина наблюдается прогрессирующая мышечная дистрофия, а у человека с мутациями в гене дисферлина развиваются так называемые дисферлинопатии [176–178]. Таким образом, эта форма миопатии принципиально отличается по механизму от нарушений, вызываемых утратой связи между цитоскелетом, дистрофингликановым комплексом и белками внеклеточного матрикса при миодистрофии Дюшенна.

Данные о мышечном электрогенезе и функционировании Na,K-АТФазы при мутациях дисферлина в литературе отсутствуют. Есть лишь косвенные данные о том, что дисферлин имеет отношение к регуляции холинергической передачи в мышцах *C. elegans* и мыши, а дефекты его функционирования компенсируются ингибитором ацетилхолинэстеразы [180]. Однако известно, что дисферлин локализован в липидных рафтах и показано нарушение метаболизма липидов у мышей Vla/J с дефицитом дисферлина [181]. Все вместе (связь дисферлина с кавеоллином-3, локализация в липидных рафтах, участие в процессах трафика и слияния везикул) позволяет предположить, что дисферлин может быть вовлечен в регуляцию молекулярного комплекса $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, осуществляемую через липидное окружение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00562а), а также НИР СПбГУ № 1.38.231.2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. M. Sejersted and G. Sjogaard, *Physiol. Rev.* **80**, 1411 (2000).
2. T. L. Radzyukevich, J. B. Lingrel, and J. A. Heiny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2565 (2009).
3. T. Clausen, *Acta Physiol.* **192**, 339 (2008).
4. T. Clausen, *J. Gen. Physiol.* **142**, 327 (2013).
5. T. Clausen, *Physiol. Rep.* **3** (4), e12373 (2015).
6. F. Vyskočil, P. Hnik, H. Rehfeldt, R. Vejsada, et al., *Pflugers Arch.* **399**, 235 (1983).
7. D. P. Matyushkin, I. I. Krivoi, and T. M. Drabkina, *Gen. Physiol. Biophys.* **14** (5), 369 (1995).
8. T. Clausen, *Physiol. Rev.* **83**, 1269 (2003).
9. M. Kristensen and C. Juel, *Acta Physiol.* **198**, 105 (2010).
10. J. C. Skou, *Biochem. Biophys. Acta* **23**, 394 (1957).
11. G. Blanco and R. W. Mercer, *Am. J. Physiol.* **275**, F633 (1998).
12. A. Mobasher, J. Avila, I. Cozar-Castellano, et al., *Biosci. Reports* **20**, 51 (2000).
13. M. Dobretsov and J. R. Stimers, *Front. Biosci.* **10**, 2373 (2005).
14. T. Mijatovic, E. Van Quaquebeke, B. Delest, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1776**, 32 (2007).
15. B. Benziene and A. V. Chibalin, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E553 (2008).
16. R. L. Post, C. Hegyvary, and S. Kume, *J. Biol. Chem.* **247** (20), 6530 (1972).
17. A. Takeuchi, N. Reyes, P. Artigas, and D. C. Gadsby, *Nature* **456**, 413 (2008).
18. O. Delbono and B. A. Kotsias, *J. Appl. Physiol.* **65** (5), 1893 (1988).
19. I. I. Krivoi, A. N. Vasiliev, V. V. Kravtsova, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 639 (2003).
20. J. A. Heiny, V. V. Kravtsova, F. Mandel, et al., *J. Biol. Chem.* **285** (37), 28614 (2010).
21. A. V. Chibalin, J. A. Heiny, B. Benziene, et al., *PLoS One* **7** (3), e33719 (2012).
22. V. V. Kravtsova, A. M. Petrov, V. V. Matchkov, et al., *J. Gen. Physiol.* **147**, 175 (2016).
23. F. Vyskočil, F. De Gregorio, and A. Gorio, *Pflugers Arch.* **403**, 1 (1985).
24. H. Dlouha, J. Teisinger, and F. Vyskočil, *Pflugers Arch.* **380**, 101 (1979).
25. F. Vyskočil, E. Nikolsky, and C. Edwards, *Neurosci.* **9**, 429 (1983).
26. A. Hicks and A. J. McComas, *J. Physiol.* **414**, 337 (1989).
27. E. E. Nikolsky, H. Zemkova, V. A. Voronin, and F. Vyskočil, *J. Physiol.* **477**, 497 (1994).
28. B. R. Larsen, A. Stoica, and N. MacAulay, *Front. Physiol.* **7**, 141 (2016).
29. K. J. Sweadner, in *Neuroglia* (Oxford Univ. Press, New York, Oxford, 1995), pp. 259–272.
30. K. Geering, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, F241 (2006).
31. Z. Li and S. A. Langhans, *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 66 (2015).
32. H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius, and C. Toyoshima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13742 (2009).
33. J. B. Lingrel, *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 395 (2010).
34. W. Sandtner, B. Egwolf, F. Khalili-Araghi, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 38177 (2011).
35. M. Laursen, L. Yatime, P. Nissen, and N. U. Fedosova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 10958 (2013).
36. O. Vagin, L. A. Dada, E. Tokhtaeva, and G. Sachs, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1271 (2012).
37. H. Garty and S. J. Karlish, *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 431 (2006).
38. K. Geering, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 526 (2008).
39. D. Pavlovic, W. Fuller, and M. J. Shattock, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 83 (2013).
40. N. Le Novère, P. J. Corringer, and J. P. Changeux, *J. Neurobiol.* **53**, 447 (2002).
41. J. Massoulié, *Neurosignals* **11**, 130 (2002).
42. T. M. Drabkina and I. I. Krivoi, *Tsitologiya* **46**, 89 (2004).
43. A. G. Markov, J. R. Aschenbach, and S. Amasheh, *IUBMB Life* **67**, 29 (2015).
44. J. Orłowski and J. B. Lingrel, *J. Biol. Chem.* **263**, 10436 (1988).
45. A. L. Woo, P. F. James, and J. B. Lingrel, *J. Biol. Chem.* **275**, 20693 (2000).
46. M. P. Blaustein and V. A. Golovina, *Trends Neurosci.* **24**, 602 (2001).

47. W. Schoner and G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **7** (3), 173 (2007).
48. M. P. Blaustein, *Adv. Exp. Med. Biol.* **961**, 3 (2013).
49. M. J. Shattock, M. Ottolia, D. M. Bers, et al., *J. Physiol.* **593**, 1361 (2015).
50. H. Song, M. Y. Lee, S. P. Kinsey, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 12929 (2006).
51. L. Lencesova, A. O'Neill, W. G. Resneck, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 2885 (2004).
52. P. J. Mohler, J. Q. Davis, and V. Bennett, *PLoS Biol.* **3**, e423 (2005).
53. J. Tian and Z. Xie, *Physiology* **23**, 205 (2008).
54. G. A. Morrill, A. B. Kostellow, and A. Askari, *Steroids* **77**, 1160 (2012).
55. I. I. Krivoi, *Biofizika* **59**, 871 (2014).
56. F. Cornelius, M. Habeck, R. Kanai, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 1729 (2015).
57. S. He, D. A. Shelly, A. E. Moseley, et al., *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.* **281**, R917 (2001).
58. G. Crambert, U. Hasler, A. T. Beggah, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 1976 (2000).
59. J. Wang, J. B. Velotta, A. McDonough, and R. A. Farley, *Am. J. Physiol.* **281**, C1336 (2001).
60. A. Katz, Y. Lifshitz, E. Bab-Dinitz, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 19582 (2010).
61. M. Cherniavsky Lev, S. J. Karlsh, and H. Garty, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309**, C126 (2015).
62. A. A. McDonough, C. B. Thompson, and J. H. Youn, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, F967 (2002).
63. M. H. Cougnon, A. E. Moseley, T. L. Radzyukevich, et al., *Eur. J. Physiol.* **445**, 123 (2002).
64. T. L. Radzyukevich, J. C. Neumann, T. N. Rindler, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 1226 (2013).
65. M. DiFranco, H. Hakimjavadi, J. B. Lingrel, and J. A. Heiny, *J. Gen. Physiol.* **146**, 281 (2015).
66. I. I. Krivoi, *Biofizika* **57** (5), 771 (2012).
67. R. S. Haber and J. N. Loeb, *Am. J. Physiol.* **255**, E912 (1988).
68. A. Murette, J. Krischer, L. Lavoie, et al., *Am. J. Physiol.* **265**, C1716 (1993).
69. C. B. Thompson, I. Dorup, J. Ahn, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C509 (2001).
70. V. V. Kravtsova, V. V. Matchkov, E. V. Bouzinova, et al., *Biomed. Res. Int.* **2015**, 720172 (2015).
71. T. L. Radzyukevich, A. E. Moseley, D. A. Shelly, et al., *Cell. Physiol.* **287** (5), 1300 (2004).
72. M. W. Williams, W. G. Resneck, T. Kaysser, et al., *J. Cell Sci.* **114**, 751 (2001).
73. S. J. Wood and C. R. Slater, *Prog. Neurobiol.* **64**, 393 (2001).
74. M. T. Miles, E. Cottey, A. Cottey, et al., *J. Neurosci.* **303**, 53 (2011).
75. R. L. Ruff, *Muscle & Nerve* **44**, 854 (2011).
76. F. Vyskocil, A. I. Malomouzh, and E. E. Nikolsky, *Physiol. Res.* **58**, 763 (2009).
77. J. Monod, J. Wyman, and J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
78. A. Karlin, *J. Theor. Biol.* **16**, 306 (1967).
79. J. Changeux and S. J. Edelman, *Curr. Opin. Neurobiol.* **11** (3), 11369 (2001).
80. K.-S. Park, S.-K. Cha, M.-J. Kim, et al., *Neurosci. Lett.* **482**, 167 (2010).
81. I. I. Krivoi, T. M. Drabkina, V. V. Kravtsova, et al., *Pflug. Archiv – Eur. J. Physiol.* **452**, 756 (2006).
82. V. V. Matchkov and I. I. Krivoi, *Front. Physiol.* **7**, 179 (2016).
83. V. V. Kravtsova, T. M. Drabkina, A. V. Prokof'ev, et al., *Russ. Fiziol. Zhurn. im. I. M. Sechenova* **94** (10), 1181 (2008).
84. R. J. Prince and S. M. Sine, *J. Biol. Chem.* **274**, 19623 (1999).
85. G. G. Wilson and A. Karlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1241 (2001).
86. A. Mourot, J. Rodrigo, F. Kotzyba-Hibert, et al., *Mol. Pharmacol.* **69**, 452 (2006).
87. I. I. Krivoi, T. M. Drabkina, A. N. Vasiliev, et al., *Biol. Membr.* **23** (2), 139 (2006).
88. H. Bao, H. Sun, Y. Xiao, et al., *Sci. Rep.* **5**, 8849 (2015).
89. J. A. Rafael, E. R. Townsend, S. E. Squire, et al., *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1357 (2000).
90. F. Galbiati, B. Razani, and M. P. Lisanti, *Trends Mol. Med.* **7**, 435 (2001).
91. V. V. Kravtsova, B. S. Shenkman, V. M. Mikhailov, et al., *Biofizika* **55**, 834 (2010).
92. V. V. Kravtsova, V. M. Mikhailov, A. V. Sokolova, et al., *Dokl. Biol. Sci.* **441**, 357 (2011).
93. M. Doi and K. Iwasaki, *Mol. Cell Neurosci.* **38**, 548 (2008).
94. I. Levitan, D. K. Singh, and A. Rosenhouse-Dantsker, *Front. Physiol.* **5**, 65 (2014).
95. D. Zhu, W. C. Xiong, and L. Mei, *J. Neurosci.* **26**, 4841 (2006).
96. R. Willmann, S. Pun, L. Stallmach, et al., *EMBO J.* **25**, 4050 (2006).
97. G. Brannigan, D. N. LeBard, J. Henin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 14122 (2010).
98. F. Cornelius, *Biochem.* **47**, 1652 (2008).
99. Y. Chen, X. Li, Q. Ye, et al., *J. Biol. Chem.* **286** (17), 15517 (2011).
100. E. Kapri-Pardes, A. Katz, H. Haviv, et al., *J. Biol. Chem.* **286** (50), 42888 (2011).
101. H. Haviv, M. Habeck, R. Kanai, et al., *J. Biol. Chem.* **288** (14), 10073 (2013).
102. V. V. Kravtsova, A. M. Petrov, A. N. Vasiliev, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **158**, 298 (2015).
103. J. R. Arthur, K. A. Heinecke, and T. N. J. Seyfried, *Lipid Res.* **52**, 1345 (2011).
104. Т. Н. Ефремова, В. И. Чубинский-Надеждин, С. Ю. Хайтлина и Е. А. Морачевская, *Цитология* **54** (6), 508 (2012).

105. D. M. Owen, A. Magenau, D. Williamson, and K. Gaus, *Bioessays* **34** (9), 739 (2012).
106. J. A. Dani and M. De Biasi, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **70**, 439 (2001).
107. E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon, and S. W. Rogers, *Physiol. Rev.* **89**, 73 (2009).
108. R. A. Lester and J. A. Dani, *J. Neurophysiol.* **74**, 195 (1995).
109. N. L. Benowitz, S. Zevin, and P. Jacob, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **43**, 259 (1997).
110. R. C. Pierce and V. Kumaresan, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**, 215 (2006).
111. H. Wang and X. Sun, *Brain Res. Rev.* **48**, 420 (2005).
112. L. Larsson and J. Orlander, *Acta Physiol. Scand.* **10**, 343 (1984).
113. L. Larsson, J. Orlander, T. Ansved, and L. Edstrom, *Acta Physiol. Scand.* **134**, 519 (1988).
114. T. Nakatani, T. Nakashima, T. Kita, and A. Ishihara, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**, 671 (2003).
115. T. B. Price, S. Krishnan-Sarin, and D. L. Rothman, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, 116 (2003).
116. A. N. Vasil'ev, V. V. Kravtsova, and I. I. Krivoi, *Russ. Fiziol. Zhurn. im. I. M. Sechenova* **97** (11), 1204 (2011).
117. А. В. Прокофьев, И. А. Разговорова, В. В. Кравцова и И. И. Кривой, *Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3* (№ 1), 72 (2010).
118. L. Wang, J. G. McComb, M. H. Weiss, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1422 (1994).
119. P. S. Biser, K. A. Thayne, W. W. Fleming, and D. A. Taylor, *Brain Res.* **931**, 186 (2002).
120. H. Deng, Z. Yang, Y. Li, et al., *Neurosci. Res.* **65**, 222 (2009).
121. W. Masocha, L. G. González, and A. Agil, *Eur. J. Pharmacol.* **774**, 43 (2016).
122. G. Scheiner-Bobis and W. Schoner, *Nature Med.* **7**, 1288 (2001).
123. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, and O. V. Fedorova, *Pharmacol. Rev.* **61**, 9 (2009).
124. I. Dostanic, J. N. Lorenz, J. E. J. Schultz, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 53026 (2003).
125. I. Dostanic, R. J. Paul, J. N. Lorenz, et al., *Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H477 (2005).
126. S. Yamamoto, A. A. Fox, and K. Greeff, *Eur. J. Pharmacol.* **71**, 437 (1981).
127. I. I. Krivoi, T. M. Drabkina, V. V. Kravtsova, et al., *Biophysics* **51** (5), 799 (2006).
128. R. Sacchetto, A. Margreth, M. Pelosi, and E. Carafoli, *Eur. J. Biochem.* **237**, 483 (1996).
129. M. W. Berchtold, H. Brinkmeier, and M. Muntener, *Physiol. Rev.* **80**, 1216 (2000).
130. M. Fill and J. A. Copello, *Physiol. Rev.* **82**, 893 (2002).
131. M. P. Blaustein, *Am. J. Physiol.* **264**, C1367 (1993).
132. P. A. Doris and A. Y. Bagrov, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218**, 156 (1998).
133. D. Lichtstein and H. Rosen, *Neurochem. Res.* **26**, 971 (2001).
134. B. E. Jacobs, Y. Liu, M. V. Pulina, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H1317 (2012).
135. D. A. Sibarov, A. E. Bolshakov, P. A. Abushik, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343**, 596 (2012).
136. M. Dvela, H. Rosen, H. C. Ben-Ami, and D. Lichtstein, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **302**, C442 (2012).
137. M. Dvela-Levitt, H. C. Ami, H. Rosen, et al., *J. Neurotrauma* **31**, 1942 (2014).
138. Z. Radak, K. Suzuki, M. Higuchi, et al., *Free Radic. Biol. Med.* doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.024 (2016).
139. X. Yuan, Z. Lin, S. Luo, et al., *J. Cell. Physiol.* **212**, 509 (2007).
140. M. Kristensen, M. K. Rasmussen, and C. Juel, *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **456**, 979 (2008).
141. K. T. Murphy, O. B. Nielsen, and T. Clausen, *Exp. Physiol.* **93**, 1249 (2008).
142. C. Juel, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R125 (2009).
143. N. B. Nordsborg, K. Kusuhara, Y. Hellsten, et al., *Acta Physiol.* **198**, 487 (2010).
144. B. Benziane, U. Widegren, S. Pirkmajer, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E456 (2011).
145. M. K. Rasmussen, M. Kristensen, and C. Juel, *Acta Physiol. (Oxf.)* **194**, 67 (2008).
146. K. M. Baldwin, F. Haddad, C. E. Pandorf, et al., *Front. Physiol.* **4**, 284 (2013).
147. S. C. Bodine, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **45**, 2200 (2013).
148. H. Boon, E. Kostovski, S. Pirkmajer, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E864 (2012).
149. B. D. Perry, P. Levinger, H. G. Morris, et al., *Physiol. Rep.* **3** (2), e12294 (2015).
150. M. J. McKenna, B. D. Perry, F. R. Serpiello, et al., *J. Appl. Physiol.* **113**, 1505 (2012).
151. E. Morey-Holton, R. K. Globus, A. Kaplansky, and G. Durnova, *Adv. Space Biol. Med.* **10**, 7 (2005).
152. B. S. Shenkman and T. L. Nemirovskaya, *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **29**, 221 (2008).
153. R. H. Fitts, P. A. Colloton, S. W. Trappe, et al., *J. Appl. Physiol.* **5**, 667 (2013).
154. J.-F. Desaphy, S. Pierno, C. Leoty, et al., *Brain* **124**, 1100 (2001).
155. S. Pierno, J.-F. Desaphy, A. Liantonio, et al., *Brain* **125**, 1510 (2002).
156. O. Tyapkina, E. Volkov, L. Nurullin, et al., *Physiol. Res.* **58**, 599 (2009).
157. I. I. Krivoi, V. V. Kravtsova, E. G. Altaeva, et al., *Biofizika* **53**, 1051 (2008).
158. A. C. Petersen, K. T. Murphy, R. J. Snow, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R266 (2005).
159. K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Okada, et al., *Cardiovasc. Res.* **28**, 957 (1994).

160. V. V. Senatorov, P. K. Stys, and B. Hu, *J. Physiol.* **525**, 343 (2000).
161. R. Ladka and Y.-C. Ng, *Mol. Cell. Biochem.* **211**, 79 (2000).
162. M. Ohira, H. Hanada, F. Kawano, et al., *Jpn. J. Physiol.* **52**, 235 (2002).
163. L. De-Doncker, M. Kasri, F. Picquet, and M. Fallempein, *J. Exp. Biol.* **208**, 4585 (2005).
164. B. Benziane, M. Bjornholm, S. Pirkmajer, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 23451 (2012).
165. B. S. Shenkman, T. L. Nemirovskaya, and Y. N. Lomonosova, *Front. Physiol.* **6**, 298 (2015).
166. C. Juel, *Acta Physiol. (Oxf.)* **216**, 447 (2016).
167. S. Pirkmajer and A. V. Chibalin, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* doi: 10.1152/ajpendo.00539.2015 (2016).
168. T. A. Partridge, in *Dystrophin – a Gene, Protein and Cell Biology*, Ed. by S. C. Brown and J. A. Lucy University Press, Cambridge, 1997), pp. 310–330.
169. A. В. Соколова, В. В. Зенин и В. М. Михайлов, *Цитология* **52** (5), 399 (2010).
170. C. G. Carlson and D. M. Roshek, *Eur. J. Physiol.* **442**, 369 (2001).
171. N. A. Timonina, V. V. Kravtsova, E. V. Mikhailova, et al., *Vestnik Sankt-Peterburg. Univ.* **3**, 66 (2015).
172. C. Hirn, G. Shapovalov, O. Petermann, et al., *J. Gen. Physiol.* **132**, 199 (2008).
173. D. G. Allen, O. L. Gervasio, E. W. Yeung, N. P. Whitehead, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 83 (2010).
174. J. E. Anderson, *Biochem. Cell Biol.* **69**, 835 (1991).
175. J. F. Dunn, K. A. Burton, and M. J. Dauncey, *J. Neurol. Sci.* **133**, 11 (1995).
176. F. Rahimov and L. M. Kunkel, *J. Cell Biol.* **201**, 499 (2013).
177. N. Abdullah, M. Padmanarayana, N. J. Marty, and C. P. Johnson, *Biophys. J.* **106**, 382 (2014).
178. J. P. Kerr, C. W. Ward, and R. J. Bloch, *Front. Physiol.* **5**, 89 (2014).
179. U. Roostalu and U. Strahle, *Dev. Cell.* **22**, 515 (2012).
180. P. Krajacic, E. E. Pistilli, J. E. Tanis, et al., *Biology Open* **2**, 1245 (2013).
181. M. D. Grounds, J. R. Terrill, H. G. Radley-Crabb, et al., *Am. J. Pathol.* **184**, 1668 (2014).

Isoform-Specific Functions of Na,K-ATPase in Skeletal Muscle

I.I. Krivoi

St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

The present review is devoted to the analysis of literature data and results of our own research in the field of molecular and functional diversity of Na,K-ATPase. This integral protein maintains concentration gradients for Na⁺ and K⁺, which are important for electrogenesis, excitability and for numerous other transport mechanisms. The major Na,K-ATPase in vertebrates is localized in skeletal muscles where the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of catalytic and transport α -subunit of Na,K-ATPase are co-expressed. Na,K-ATPase activity is crucial to maintaining contractile function and the skeletal muscle ability to produce force. Accumulated data allow us to assume that the Na,K-ATPase $\alpha 1$ isoform carries the main pump function. The $\alpha 2$ isoform exerts additional functions that are stipulated by its specific membrane localization, functional interactions with protein and lipid environment and by other different regulatory factors including motor activity.

Key words: Na,K-ATPase, isoforms, nicotinic choline receptor, safety factor, neuromuscular transmission, cardiotonic steroids, motor activity