

*Памяти коллеги по исследованию
внутриклеточных медиаторных
рецепторов Ольги Павловны Юрченко*

О ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕЦЕПЦИИ МЕДИАТОРОВ

© 2018 г. Ю. Б. Шмуклер¹, *, Д. А. Никишин¹

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.04.2018 г.

Идее о том, что рецепторы медиаторных веществ могут быть локализованы внутриклеточно уже более полувека, однако этот факт остается дискуссионным до сих пор. В статье суммированы накопленные на сегодняшний день данные о такой локализации медиаторных рецепторов у одноклеточных, у ранних зародышей до формирования у них нервной системы и в клетках взрослых организмов, включая нейроны. Эти данные получены как с помощью фармакологических экспериментов с использованием пар гидрофильных и липофильных аналогов лигандов медиаторных рецепторов, так и прямым методом – микроинъекции, а также связыванием меченных лигандов и электрофизиологическими методами. Данные о внутриклеточной локализации медиаторных рецепторов заставляют вновь критически рассмотреть представления о возникновении самих медиаторных веществ и соответствующих рецепторов. Предполагается, что они сформировались в результате эволюции функций систем, первоначально связанных не с межклеточными взаимодействиями, а с процессами внутриклеточных синтезов.

Ключевые слова: медиаторы, внутриклеточные рецепторы, ранние зародыши, одноклеточные, нейроны, эволюция функций

DOI: 10.1134/S1027813318040076

Пятидесятые годы XX столетия были периодом активного развития исследований нейромедиаторов, разработки электрофизиологических методик и первых наборов фармакологических инструментов в этой области. Открытая в эксперименте на нервно-мышечном препарате сердца химическая передача сигнала [1] и в дальнейшем рассматривалась как нейробиологический механизм, и основные силы мировой науки были сосредоточены именно на этом направлении, а сами нейромедиаторы рассматривались исключительно как атрибут нейрональных и нервно-мышечных взаимодействий.

Однако уже вскоре обнаружили факты и стали складываться воззрения, которые поставили под вопрос исключительно нервную сферу действия химических посредников. И первым известным в этой области фактом стало обнаружение в гаметам и ранних зародышах морских ежей ацетилхолина и ацетилхолинэстеразы [2]. Внятного объяснения присутствию этих веществ в ранних зародышах автор не дал, если не считать странно-

го предположения о том, что эти вещества запасены впрок.

Тогда же в лаборатории физиологии Института морфологии животных, которой руководил профессор Х.С. Коштоянц и возникло диссидентское течение относительно происхождения и функций нейромедиаторов. Стиль лаборатории диктовался личностью и воззрениями ее руководителя, активно развивавшего идеи сравнительной и эволюционной физиологии, восходящие к трудам И.М. Сеченова. Различающиеся в деталях, но сходящиеся в главном воспоминания сотрудников лаборатории того времени сводились к тому, что уже в конце 50-х гг. здесь “витала в воздухе”, а затем сформировалась идея о том, что “синаптическая передача возникла на основе эволюционно предшествующих внутриклеточных механизмов регуляции в результате смены их функций в ходе филогенеза и онтогенеза”. Кому конкретно принадлежит авторство этой формулировки, давно бытовавшей в лаборатории эмбриофизиологии ИБР, уже невозможно установить, но, очевидно, что именно такие взгляды руководили их поисковыми работами.

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26; тел.: (499) 135-0052; e-mail: yurishmukler@yahoo.com.

Первые экспериментальные данные о функциональной активности нейромедиаторного вещества в эмбриогенезе были получены в лаборатории физиологии Г.А. Бузниковым и Б.Н. Манухиным в экспедиции на Беломорскую биостанцию МГУ. Обстоятельства возникновения этой работы описываются ее авторами противоречиво. Согласно версии Г.А. Бузникова, они были направлены Коштойанцем с заданием найти модель для демонстрации донервных функций серотонина, а Б.Н. Манухин (личное сообщение) описывал это так: “Мы возились с кладками голожаберников, и кто-то предложил: а давай польем на них серотонин”. Это вещество незадолго до того Коштойанец привез из-за границы и отсыпал им “на дорожку” в экспедицию. Так или иначе, но этот опыт был поставлен и продемонстрировал влияние этого вещества на моторику личинок [3].

В последующие годы работы в этой области были, в основном сосредоточены на разработке удобных моделей исследования донервных функций медиаторов в эмбриогенезе, в частности, простой и удобной системы определения функциональной активности антагонистов медиаторов на оплодотворенных яйцеклетках морских ежей, позволявшей проводить массовые опыты в короткие сроки, определявшиеся скоростью развития иглокожих — приблизительно 1 деление дробления в час. Эти исследования показали, что активностью в раннем эмбриогенезе иглокожих обладают антагонисты как серотонина, так и катехоламиновых медиаторов, а также ацетилхолина (см. [4]).

Очевидно, что к мысли о внутриклеточности эмбриональных функций нейромедиаторов вернулись в начале 70-х гг. XX столетия с развитием арсенала нейрофармакологических препаратов и, в частности, появлением пар липофильных и гидрофильных аналогов, существенно различающихся по способности проникать внутрь клеток морских беспозвоночных. Первой такой работой было исследование, с применением рядов индольных производных, различающихся по липофильности, показавшее на классическом объекте — делениях дробления культуры зародышей морских ежей прямую зависимость эмбриостатического эффекта от липофильности препаратов [5]. В дальнейшем та же идеология была применена на модели межклеточных взаимодействий у интактных зародышей морских ежей, где легко проникающие в клетку липофильные препараты намного более эффективно, чем их гидрофильные аналоги вызывали формирование “двойниковых зародыше” [6].

Следующим шагом в этом направлении стали прямые эксперименты по введению антагонистов нейротрансмиттеров в клетки зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, организован-

ные при участии заинтересовавшегося этой тематикой академика Т.М. Турпаева [7]. Было показано, что при полном отсутствии эффекта внесения в среду β -адренолитика пропранолола, его микроинъекция вызывала специфическую временную блокаду делений дробления, ослабляемую одновременным добавлением адреналина. Аналогичные результаты были получены и в отношении м-холинолитика атропина.

Дополнительные доказательства внутриклеточной локализации медиаторного звена в регуляции процессов делений дробления были получены в опытах с мечеными лигандами β -адренорецепторов. Было обнаружено специфическое связывание [^3H]-дигидроальprenолола ($K_D 3 \times 10^{-9}$ М) и [^{125}I]-йодоцианопиндолола ($K_D 1.5 \times 10^{-9}$ М) микросомальной и митохондриальной фракциями зародышей *X. laevis* в период делений дробления [8]. Аналогичные результаты на микросомальной фракции были получены и с меченым лигандом м-холинорецепторов [^3H]-3-хинуклидинил бензилатом (Шмуклер, Григорьев, неопубликованные данные).

То обстоятельство, что ультрацитохимическое исследование показало, что активность аденилатциклазы в зародышах морского ежа связана, в основном с мембранами эндоплазматического ретикулула [9], именно эта структура и предполагалась как наиболее вероятное место локализации внутриклеточных медиаторных рецепторов.

Таким образом, накопленные различными методами данные однозначно свидетельствовали в пользу внутриклеточной локализации рецепторного звена медиаторного процесса в раннем эмбриогенезе, по крайней мере, иглокожих и земноводных, причем нескольких медиаторов одновременно. В этот период возникло представление, что собственно это и составляет своеобразие медиаторных процессов в раннем эмбриогенезе, что на некоторое время стало незыблемой парадигмой. Физиологическим обоснованием “кажущейся избыточности” [10] в эмбриональной клетке сигнальных веществ — наличия в ней и медиаторов, и вторичных мессенджеров — послужили сравнительные эффективные дистанции действия медиаторов и вторичных мессенджеров [11]. Они составляют около 20 мкм для ИТФ и около 3 мкм — для Ca^{2+} , тогда как размер яйцеклеток эти величины серьезно превосходит, а для таких медиаторов, как серотонин, ограничения эффективной дистанции практически не существует.

Приблизительно в этот же период появился целый поток публикаций о возможности внутриклеточной локализации некоторых медиаторных рецепторов в клетках взрослых организмов. В частности, ингибирование антагонистом связывания гистамина показало предполагаемую роль этого медиатора как внутриклеточного мессенджера, запуска-



ющего агрегацию кровяных пластинок [12] и формировании колоний гранулоцитов/макрофагов (CFU-GM) нормальными клетками костного мозга человека или мыши, формирование лейкоцитарной колонии (CFU-L) клеточной линией лейкемии мыши (WENI 3B) и формирование колонии клетками костного мозга пациентов с хронической миелоидной лейкемией (CML) путем ингибиторных воздействий на формирование гистамина *de novo* и нарушающих взаимодействие гистамина с внутриклеточными сайтами связывания [13].

Видимо, под впечатлением успеха работы по прямому доказательству внутриклеточной локализации медиаторных рецепторов у ранних зародышей земноводных, Т.М. Турпаевым была инициирована и поддержана серия работ, выполненная, главным образом, О.П. Юрченко, которая до того занималась вопросом взаимодействия трансмиттеров в нейрональных процессах [14].

В исследованиях влияния внутриклеточной перфузии медиаторными веществами на ацетилхолиновые ответы нейронов моллюсков было показано, что в части изолированных нейронов париетального и висцерального ганглиев *Lymnaea stagnalis* серотонин, добавленный к внутреннему и внешнему раствору, снижал ответ на АХ. В других нейронах серотонин, добавленный к внутриклеточному раствору, увеличивал ответ на АХ; а, когда его добавляли внеклеточно, вызывал противоположный эффект на тех же самых клетках [15]. На другом объекте – нейронах R2 абдоминального ганглия моллюска *Aplysia depilans*, в условиях фиксации потенциала мембраны дофамин, инъецированный внутриклеточно, повышал амплитуду входящих и выходящих токов, регистрируемых в ответ на аппликацию АХ. Добавление дофамина к внешней перфузионной жидкости вызывало снижение ответа на АХ [16]. Эти результаты, свидетельствующие о модулирующих эффектах серотонина и дофамина на холинергическую синаптическую передачу в нервной системе моллюсков, заставили предположить и возможность существования в этих нейронах внутриклеточных медиаторных рецепторов.

К сожалению, внешние обстоятельства обогнали эту интереснейшую и перспективную линию исследований, и в современной литературе развития этой темы обнаружить не удалось.

Параллельно развивались исследования роли нейромедиаторных веществ в одноклеточных, что само по себе имело огромное значение с точки зрения понимания эволюции функций этих веществ [17], см. также обзор [18]. Что же касается медиаторной рецепции у одноклеточных, то нельзя исключать воздействия медиаторов с мембранными

рецепторами [18], однако продемонстрировано и присутствие D1-дофаминового рецептора, локализованного у этого одноклеточного на эндоплазматическом ретикулуме и в эндосомах [19], подобно тому, как это наблюдалось в ранних зародышах морских ежей (см. выше), у которых также были обнаружены и мембранные рецепторы [20].

В последние десятилетия к вопросу о внутриклеточной локализации медиаторных механизмов у ранних зародышей морских ежей вернулись в связи с появлением нового фармакологического инструмента – конъюгатов трансмиттеров с жирными кислотами, такими как арахидоновая и эйкозапентаеновая, которые обладают значительно большей способностью проникать в клетки, чем их гидрофильные аналоги [21]. Использование арахидоновых производных серотонина и дофамина, с одной стороны, продемонстрировало их существенно более выраженное защитное действие против эмбриостатических нейрофармакологических препаратов, а с другой – в отличие от прежних данных – отсутствие явно выраженной фармакологической специфичности рецепторного звена зародышей морских ежей, когда защитное действие против одного и того же вещества практически в равной мере оказывают и арахидоноил-серотонин, и арахидоноил-дофамин [22]. При этом антагонисты серотониновых и дофаминовых рецепторов значительно отличаются по их влиянию на состояние тубулинового цитоскелета (Шмуклер, Никишин, в печати).

Таким образом, можно констатировать, что на сегодняшний день накоплено значительное количество данных, которые прямо или косвенно свидетельствуют о существовании внутриклеточной рецепции таких медиаторов, как серотонин, дофамин и гистамин, у одноклеточных, ранних зародышей и в дефинитивных клетках взрослых многоклеточных, то есть об универсальном характере этого явления. В этой связи, стоит вернуться к вопросу, упомянутому в начале данной статьи – о происхождении и оригинальной функции медиаторов в эволюции.

Существующие концепции формирования медиаторных систем так или иначе исходят из их связи с нейрональным синаптическим процессом, оказываясь в психологической ловушке, обусловленной семантикой понятия “нейромедиатор”, хотя внутреннее противоречие здесь очевидно.

На ставший хрестоматийным вопрос “Why do neurons have different transmitters when any one transmitter could in fact mediate all the required electrical signals?” [23], в утвердительной форме по-

¹ Почему в нейронах присутствуют разные медиаторы, когда на самом деле только один медиатор может опосредовать все требующиеся электрические сигналы?

вторенный Д.А. Сахаровым: “каждому физиологу, одолевшему науку синаптических взаимодействий рано или поздно приходит в голову, что нервной системе вполне бы хватило одного передатчика” [24], следует ответить, что собственно нервная передача информации действительно могла бы быть организована на основе всего одного нейромедиатора, если бы она возникала именно в момент формирования нервной системы и именно для передачи нервного импульса с одной клетки на другую.

Следует, однако, признать, что все эти клетки к моменту формирования нервной системы уже имели солидную предысторию и накопили механизмы, которые и были адаптированы к этому очень важному, но все же не единственному процессу в развитии. Поэтому и существующие концепции множественности транмиттеров пригодны для объяснения лишь того, как эти механизмы могли закрепиться в ходе эволюции многоклеточных. Самое же существование множества нейромедиаторов может рассматриваться не только с точки зрения того, для чего они требуются организму, но и с точки зрения того, откуда они взялись.

Исходной посылкой дальнейшего изложения является постулирование филогенетической первичности тех онтогенетически первичных функций транмиттеров, т.е. тех, которые реализуются в раннем развитии. Учитывая многообразную активность транмиттерных систем у простейших и на донервных стадиях развития многоклеточных, логично допустить, что филогенетически транмиттеры возникли задолго до формирования даже самой примитивной нервной системы и, более того, даже просто многоклеточных организмов. В ходе филогенеза функции транмиттеров неоднократно модифицировались, что находит свое отражение в тех их изменениях в онтогенезе, которые мы наблюдаем на современном этапе эволюции. Внутриклеточные рецепторы и системы внутриклеточных транмиттеров ранних зародышей являются более древней формой организации и вероятно были эволюционным предшественником соответствующих дефинитивных систем. Эволюция, по выражению Франсуа Жакоба — халтурщица [25] в том смысле, что она ничего не в состоянии изобрести заново, а лишь переделывает уже существующие механизмы. Таким образом, мы возвращаемся к идее о происхождении медиаторов — производных незаменимых аминокислот триптофана и тирозина — как сигнальных веществ, являющихся датчиками процессов синтеза белка [10].

БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, № 0108-2018-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Loewi O.* // *Pflügers Arch.* 1921. V. 189. P. 239–242.
2. *Numanoi H.* // *Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.* 1953. V. 3. P. 193–200.
3. *Бузников Г.А., Манухин Б.Н.* // *Журн. общ. биол.* 1960. Т. 21. С. 347–352.
4. *Бузников Г.А.* // *Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития*. Москва: Наука, 1967. 265 с.
5. *Бузников Г.А., Кабанкин А.С., Колбанов В.М., Ландау М.А., Ароян А.А., Овсепян Т.Р., Теплиц Н.А.* // *Хим.-фарм. журн.* 1976. Т. 10. С. 23–27.
6. *Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б.* // *Онтогенез.* 1978. Т. 9. С. 173–178.
7. *Шмуклер Ю.Б., Григорьев Н.Г., Бузников Г.А., Турпаев Т.М.* // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274. С. 994–997.
8. *Шмуклер Ю.Б., Григорьев Н.Г., Московкин Г.Н.* // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 1988. Т. 24. С. 621–624.
9. *Ростомян М.А., Абрамян К.С., Бузников Г.А., Гусарева Э.В.* // *Цитология.* 1985. Т. 27. С. 877–881.
10. *Shmukler Yu.B., Buznikov G.A.* // *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1998. V. 5. P. 469–480.
11. *Allbritton N.L., Meyer T., Stryer L.* // *Science.* 1992. V. 258. P. 1812–1815.
12. *Saxena S.P., Brandes L.J., Becker A.B., Simons K.J., LaBella F.S., Gerrard J.M.* // *Science.* 1989. V. 243. P. 1596–1599.
13. *Bencsáth M., Gidáli J., Brandes L.J., Falus A.* // *Acta Biol. Hung.* 2002. V. 53. P. 299–306.
14. *Yurchenko O.P., S.-Rózsa K.* // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1984. V. 77. P. 127–133.
15. *Turpaev T.M., Yurchenko O.P., Grigoriev N.G.* // *Cell Mol. Neurobiol.* 1987. V. 7. P. 381–390.
16. *Yurchenko O.P., Grigoriev N.G., Turpaev T.M., Konjević D., Rakić L.* // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1987. V. 87. P. 389–391.
17. *Csaba G., Nagy S.U., Lantos T.* // *Acta Biol. Med. Ger.* 1978. V. 37. P. 505–507.
18. *Csaba G.* // *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 2015. V. 62. P. 93–108.
19. *Ud-Daula A., Pfister G., Schramm K.W.* // *Pak J. Biol. Sci.* 2012. V. 15. P. 1133–1138.
20. *Shmukler Yu.B.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1993. V. 106C. P. 269–273.
21. *Бузников Г.А., Безуглов В.В.* // *Рос. физиол. журн.* 2000. Т. 86. С. 1093–1108.
22. *Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić Lj., Bezuglov V.V., Shmukler Yu.B.* // *Zygote.* 2016. V. 24. P. 206–218.
23. *Kandel E.R.* // *The Harvey Lectures Ser. 73.* N. Y.: Academic Press, 1979. P. 19–92.
24. *Сахаров Д.А.* // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 1990. Т. 26. С. 734–741.
25. *Jacob F.* // *Science.* 1977. V. 196. P. 1161–1166.

О ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕЦЕПЦИИ МЕДИАТОРОВ**Ю. Б. Шмуклер^{a, #} and Д. А. Никишин^a***^aФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия**#e-mail: yurishmukler@yahoo.com.**Поступила в редакцию 04.04.2018 г.*

Идея о том, что рецепторы медиаторных веществ могут быть локализованы внутриклеточно уже более полувека, однако этот факт остается дискуссионным до сих пор. В статье суммированы накопленные на сегодняшний день данные о такой локализации медиаторных рецепторов у одноклеточных, у ранних зародышей до формирования у них нервной системы и в клетках взрослых организмов, включая нейроны. Эти данные получены как с помощью фармакологических экспериментов с использованием пар гидрофильных и липофильных аналогов лигандов медиаторных рецепторов, так и прямым методом – микроинъекции, а также связыванием меченных лигандов и электрофизиологическими методами. Данные о внутриклеточной локализации медиаторных рецепторов заставляют вновь критически рассмотреть представления о возникновении самих медиаторных веществ и соответствующих рецепторов. Предполагается, что они сформировались в результате эволюции функций систем, первоначально связанных не с межклеточными взаимодействиями, а с процессами внутриклеточных синтезов.

Ключевые слова: медиаторы, внутриклеточные рецепторы, ранние зародыши, одноклеточные, нейроны, эволюция функций