

П. КОСТЮК

КАЛЬЦІЙ: ІОН ЖИТТЯ, ІОН СМЕРТІ

Унікальну роль у процесах життєдіяльності відіграють іони кальцію. Їх не можна замінити жодними іншими іонами. Завдяки своїм особливим фізико-хімічним характеристикам вони в усіх без винятку живих тканинах виконують функцію універсального посередника між процесами, які розвиваються на поверхні клітин, і внутрішньоклітинними цитоплазматичними механізмами. Закономірності їхньої поведінки вже багато років інтенсивно вивчаються у відділі загальної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Кальцієві іони керують не тільки практично всіма функціями клітини, а й її життєвим циклом у цілому, починаючи від зародження, росту, диференціації і закінчуючи смертю. При цьому вони зв'язуються з різними білковими структурами, змінюючи їхню конформацію. Ефективність такого керування базується на здатності живих клітин підтримувати в цитоплазмі мінімальний (наномольний) рівень іонів кальцію у вільному стані, витрачаючи на усунення їхнього надлишку значну частину своєї метаболічної енергії. Внаслідок цього мізерні зміни їхнього рівня вже стають керуючими сигналами. Водночас така висока ефективність приховує і величезну небезпеку: якщо порушується робота механізмів, що підтримують необхідний баланс, ті ж самі іони можуть перетворитися на ефективну зброю знищення клітини.

Які ж принципові механізми кальцієвої сигналізації у живих клітинах? Завдяки величезній різниці концентрації іонів кальцію у позаклітинному середовищі і цитоплазмі (5 порядків) створити кальцієвий сигнал усередині клітини дуже просто — досить лише відкрити в її мембрані канал, яким іони прямуватимуть усередину. Відповідні молекулярні структури — кальцієві канали — детально досліджені як структурно, так і функціонально. У збудливих клітинах — нервових, м'язових, секреторних — вони керуються змінами мембранного потенціалу (тобто виникненням імпульсу збудження). Підтипи таких каналів (L, N, P, R, T), що різняться за своїми функціональними характеристиками і, що особливо важливо, — за чутливістю до фармакологічних модуляторів, добре відомі. У збудливих, як і у незбудливих, клітинах досить поширені також канали, які відкриваються під час зв'язування з ними певних хімічних сигналів (медіаторів, гормонів).

Доля прониклих усередину клітини іонів Ca^{2+} надзвичайно складна. Передусім вони зустрічаються з потужною системою цитоплазматичних білкових буферів, внаслідок зв'язування з якими залишається вільним не більше одного з кожних ста прониклих іонів. Далі вони захоплюються внутрішньоклітинними структурами — ендоплазматичним (саркоплазматичним у випадку м'язових клітин) ретикулумом і мітохондріями.

Раніше основну увагу дослідники приділяли саме ретикулуму, який поглинає Ca^{2+} за рахунок енергії АТФ з допомогою власної АТФази. Однак останні спостереження змушують звернути особливу увагу на мітохондрії, котрі, як з'ясувалося, виконують функції не тільки постачальників енергії, а й потужних кальцієвих депо. Прямі вимірювання доводять, що коли поглинальна потужність ретикулуму становить приблизно 3 нмол/мг білка, то для мітохондрій вона на три порядки вища, тобто досягає 3 мкмол/мг. При цьому іони надходять до них з величезною швидкістю, оскільки прямують не шляхом АТФ-залежного активного транспорту, а під дією існуючого на внутрішній

мембрані мітохондрій потужного електричного поля через систему так званого кальцієвого уніпортера (схожою на систему іонних каналів). Концентрація іонів Ca^{2+} у матриксі мітохондрій виявляється такою високою, що вони оборотно випадають в осад у вигляді фосфатної солі.

Слід також враховувати різне топографічне розташування кальцієвих депо у клітині: як правило, мітохондрії розміщуються стратегічно дуже вигідно — безпосередньо під поверхневою мембраною. Таким чином вони першими перехоплюють іони, які надходять у клітину.

Важливо також, що нагромаджені у кальцієвих депо іони можуть тут же повернутися в їхній внутрішньоклітинний кругообіг. У ретикулумі це система каналів, які відкриваються з цитозольного боку або самими іонами Ca^{2+} (кальцій-індукований викид Ca^{2+}), або особливими посередниками. Виробляються такі посередники ензиматичними системами клітини за їх активації під дією зовнішніх стимулів (інозитол-3-фосфат-індукований викид). Цей викид стає ніби підсилювачем тих кальцієвих сигналів, які створюються входженням іонів через канали поверхневої клітинної мембрани. Нагромаджені у мітохондріях іони також повертаються назад у цитозоль завдяки наявності у їхній внутрішній мембрані системи іонообмінників. Правда, цей процес не піддається такому регулюванню, як вихід іонів з ретикулуму. Однак тут функціонує інший потужний механізм: за переважання мітохондрій кальцієм у їхній мембрані відкривається система широких пор (permeability transition pores), крізь які у цитозоль виливається потужний потік як самих іонів, так і більших молекул (приміром цитохрому C), що може спричинити істотні порушення функцій клітини. При цьому мітохондрії втрачають свій мембранний потенціал і відповідно свою енергетичну функцію.

Таким чином, кальцієвий сигнал у клітині виявляється результатом надзвичайно складної просторової і часової інтеграції її молекулярних механізмів. Це визначає можливість як виконання ним численних клітинних функцій, так і порушення життєдіяльності клітини. Такі порушення можуть мати будь-який характер залежно, по-перше, від того, яка саме ланка в цій інтегрованій системі виявляється зіпсованою, і, по-друге, від того, який аспект життєдіяльності клітини перебуває під контролем даного типу кальцієвих сигналів.

З механізмів генерації і модуляції кальцієвих сигналів найвразливішими є, мабуть, структури, що безпосередньо запускають такі сигнали, тобто мембранні кальцієві канали, а також внутрішньоклітинні структури, які найефективніше обмінюють іони Ca^{2+} з цитоплазмою, тобто мітохондрії. Відповідно може бути введена номенклатура для таких порушень: каналопатії і мітопатії.

Уже одержані досить детальні дані про генетичні мутації, що спричиняють зміни в структурі і функціях кальцієвих каналів. Наявність таких мутацій корелює з розвитком хронічних неврологічних і міопатичних синдромів. Йдеться про сімейні геміплегічні мігрени, епізодичну атаксію і прогресуючу нейродегенерацію, а також про Ламберт-Ітонівський міастенічний синдром. В останньому випадку у сироватці хворих ідентифіковані антитіла проти основних типів кальцієвих каналів (L- і N-типів), які відповідають за нейром'язову передачу збудження і генерацію м'язового скорочення. Їхня дія спрямована на зниження щільності каналів у мембрані, що зумовлює відповідні функціональні зміни. Якщо вводити такі антитіла здоровим тваринам, у них також можуть індукуватися подібні міастенічні синдроми. Антитіла проти потенціал-керованих кальцієвих каналів знаходять також у хворих з аміотрофічним латеральним склерозом. Мабуть, поява цих антитіл пов'язана з певними мутаціями в молекулярній структурі відповідних каналів.

Інший тип каналопатії — порушення процесу синтезу каналів у ході розвитку і диференціювання збудливих структур. Приклад такої патології — важкі нейрональні зміни при фенілкетонурії, які характеризуються порушеннями обміну тирозину і накопиченням у плазмі його попередника — L-фенілаланіну. Нормальний рівень тирозину надзвичайно важливий для синтезу кальцієвих каналів, а в разі фенілкетонурії він істотно порушується.

Проведене у нас детальне вивчення експериментальної фенілкетонурії на новонароджених пацюках виявило у них істотні зміни мозкових функцій і паралельне зменшення у нейронах щільності кальцієвих каналів L-типу. Додавання тирозину частково усувало ці порушення. Модельні дослідження на клітинах феохромоцитомі прямо показали, що додавання до середовища тирозину надзвичайно істотно впливає на підтримання таких каналів у функціональному стані. Разом з тим, надлишок фенілаланіну ще й пригнічує генетичний механізм експресії потенціал-керованих кальцієвих каналів. Було проведено порівняння їх експресії в ооцитах жаби після ін'єкції у них мРНК з мозку контрольних пацюків і пацюків з експериментально викликаною гіперфенілкетонемією. Виявилося, що в другому випадку амплітуда експресованих кальцієвих потоків була істотно меншою, ніж у контролі. Крім того, ці токи були значно менш стабільними і швидко слабшали у ході реєстрації.

Протилежна форма каналопатії — патологічне посилення надходження Ca^{2+} в клітину, що веде до зростання їх цитозольної концентрації до величини, яка виходить далеко за фізіологічно необхідні межі. Причиною такого посилення найчастіше є їхня гіперстимуляція зовнішніми хімічними впливами. Хоча порівняно з високоселективними для Ca^{2+} потенціал-керованими каналами ліганд-керовані пропускають ці іони гірше, все ж таки деякі з них можуть створити значний їх потік. Це передусім один з типів нейрональних каналів, активованих основним збуджуючим медіатором глутаматом (так звані НМДА-канали). Масивне виділення глутамату у міжклітинний простір — характерна риса найпоширеніших форм мозкового ураження — гіпоксії-ішемії (тому його часто називають ексцитотоксичністю). Воно супроводжується таким самим масивним внутрішньоклітинним накопиченням Ca^{2+} в основному за рахунок активації НМДА-каналів. При цьому відбуваються й певні зміни їхніх характеристик, які зумовлюють таку патологію, зокрема зростає їх базальна тонічна активність і афінність до глутамату.

Ще одним своєрідним прикладом кальцієвої каналопатії, також пов'язаної з надлишковим надходженням іонів до клітини, може бути хвороба Альцгеймера. У цьому випадку причиною є фактичне утворення в нейрональній мембрані нових каналів за рахунок синтезу β -амілоїду — невеликого пептиду, до складу якого входять 42 амінокислотні залишки.

Молекули амілоїду агрегуються і вбудовуються у клітинну мембрану, утворюючи проникні для Ca^{2+} (а також для інших іонів) канали і прокладаючи у такий спосіб додатковий шлях для їх надлишкового надходження у клітину. Ізольовані нейрони, які піддаються дії амілоїду, демонструють швидке нарощування внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} (протягом кількох годин) з наступною появою ознак дегенерації.

Кальцієві каналопатії, що призводять до надлишкового надходження Ca^{2+} до клітини, як виявилося, тісно пов'язані з патологічними змінами у внутрішньоклітинних кальцій-акумуляюючих структурах, серед яких провідне місце посідають мітопатії. Висока ефективність і швидкість захоплення Ca^{2+} мітохондріями за допомогою уніпортерного механізму призводить до того, що вони стають першими структурами, які зазнають відповідних патологічних змін. Кальцієвий уніпортер не є високоафінною структурою і

починає діяти, коли рівень Ca^{2+} у цитозолі сягає 500 нМ. Однак цей рівень легко долається навіть за фізіологічних умов, не кажучи вже про патологічне посилення надходження іонів у клітину.

Саме по собі надходження Ca^{2+} у мітохондрії фізіологічно необхідне, зокрема для регуляції процесів окислювального фосфорилування. Однак швидка акумуляція в них надлишку Ca^{2+} викликає низку порушень у їхніх функціях, насамперед деполаризацію мембрани і відповідно зниження синтезу АТФ. Ще небезпечнішою виявляється активація вже згаданих пор скороминущої проникності. Вона може мати катастрофічні наслідки для клітини у зв'язку з виходом у цитоплазму нагромадженого кальцію, який активує протеолітичні ферменти, а також високоактивних сполук (цитохрому С, супероксидних радикалів), що ведуть до індукції апоптозу, тобто генетично запрограмованої клітинної смерті. Через це запобігання процесу активації пор скороминущої провідності у мітохондріях — ефективний спосіб відвернення ексцитотоксичності. В експериментальних умовах таким запобіжним фактором є циклоспорин А. Показано також, що він є ефективним протектором і в міоцитах, протидіючи їхньому реперфузійному ушкодженню після ішемії. При цьому також відбувається масований викид Ca^{2+} з мітохондрій у цитозоль, що викликає активацію деградуючих ензимів (фосфоліпаз, протеаз, ендонуклеаз) і стимулює утворення не менш небезпечних вільних радикалів.

Розглядаючи роль кальцієвої сигналізації та її змін у процесах життєдіяльності, можна у найзагальнішій формі розподілити її на термінову (функціональну) і тривалу (структурутворюючу). Остання визначає, з одного боку, розвиток і диференціацію клітин, з другого — їхню термінацію.

Оскільки кальцієві сигнали запускають основні функції клітин — скорочення, виділення медіаторів тощо, то зміна їх амплітудних чи часових характеристик природно спричинить зміни у нормальному перебігу цих процесів. Роль такого зв'язку у фізіологічних умовах добре демонструється на прикладі синаптичної передачі сигналів між нейронами. Під час переходу від поодинокого імпульсу до ритмічної стимуляції відбувається підсумовування кальцієвих транзєнтів у пресинаптичних закінченнях і відповідно посилюється виділення синаптичного медіатора, яке ними запускається, — потенціюється синаптична передача. У певних синаптичних сполуках (приміром, у гіпокампі) дедалі активніше зростання рівня Ca^{2+} у постсинаптичному нейроні запускає складну низку молекулярних процесів, що спричинюють появу ретроградних сигналів у пресинаптичній структурі. Ці сигнали істотно збільшують ефективність виділення синаптичного медіатора. Потенціація стає тривалою, що може бути основою для збереження слідів нейрональної активності — короткострокової пам'яті.

Однак такий фізіологічний ефект підсилення і подовження кальцієвих сигналів зберігається лише до певної межі. Якщо механізми регуляції цих характеристик порушуються (наприклад, у зв'язку з ослабленням активності Ca^{2+} АТФаз, що відкачують іони з цитозоля у позаклітинне середовище чи в ендоплазматичний ретикулум, або порушенням Са-обмінної функції мітохондрій), то відбувається надлишкове накопичення Ca^{2+} у відповідних клітинах. Спершу це призводитиме до їхньої гіперактивності. За приклад може правити розвиток невропатичних синдромів у больовій нейрональній системі при запалювальних процесах, цукровому діабеті тощо. Проведені у нас дослідження на експериментальних моделях показали, що такі патології супроводжуються появою надзвичайно сповільнених кальцієвих сигналів як у первинних, так і у вторинних ноціцептивних нейронах. Це призводить до надмірної потенціації передачі больової імпульсації у вищій мозковій структурі і стає основою гіпералгезії, алодонії та інших патологічних синдромів. Однак за прогресуючого кальцієвого перевантаження

починається вже описана вище низка деструктивних змін, які закінчуються некротичними явищами або апоптозом і відповідно втратою больової чутливості.

Подібні зміни функціональної ролі кальцієвих сигналів спостерігаються і в процесі старіння. У нашому інституті проведено дослідження кальцієвої сигналізації під час збудження нейронів старих пацюків (25—30 місяців). Зареєстровано розвиток у них наростаючого загальмування таких сигналів. Причому рівень цитозольного Ca^{2+} після збудження не повертається до базового значення протягом десятків секунд. Очевидно, кальцієве перевантаження клітин, що виникло в цьому випадку, вмикає патологічні деструктивні механізми, котрі спричинюють дегенеративні зміни в них і їхню загибель.

Динамічне співвідношення між конструктивною і деструктивною роллю кальцієвих сигналів дуже яскраво проявляється у випадку диференціювання зародкових клітин, встановлення міжклітинних контактів, а також утворення нейронних мереж. Під час визрівання зародкові клітини (нейробласти) випускають відростки з колбами росту і філоподіями на кінцях, які під впливом зовнішніх хімічних сигналів знаходять клітинні мішені, встановлюють з ними контакти і врешті-решт формують функціональні синаптичні сполуки. Разом з тим відростки, які ростуть, уникають неправильних з'єднань, а у випадку їх утворення (або тоді, коли взагалі не знаходять партнера) надсилають у сому клітини якийсь ретроградний сигнал, що викликає клітинне самогубство (апоптоз).

Дуже зручним об'єктом для вивчення цих надзвичайно складних процесів є нервові клітини у культурі низької щільності, де можна простежити окремі відростки, які ростуть, і з допомогою флюорографічної техніки виміряти в них кальцієві сигнали. Колба росту та її філоподії характеризуються локальним підвищенням внутрішньоклітинного рівня кальцію. Таке підвищення пов'язане з активацією під впливом ростових факторів метаболічних рецепторів і низькопорогових кальцієвих каналів і стає стимулом посиленого надходження із соми з током аксоплазми «будівельних матеріалів». Філоподії під дією такого локального підвищення вигинаються і тим самим спрямовують ріст аксону у бік цілі. Однак якщо вплив виявляється не адекватним і викликає більш генералізований сигнал, тоді ситуація змінюється, і філоподії вигинаються у протилежний бік, ведучи за собою зростаючий аксон. За його надмірного підсилення настають уже згадувані катастрофічні зміни, і клітина гине.

Ці динамічні переходи можна спостерігати в культурі клітин, які диференціюються за дуже простих впливів, скажімо, вмішуючи їх у розчини з різною концентрацією іонів калію, котрі змінюють мембранний потенціал клітин і відповідно активність вбудованих у мембрану кальцієвих каналів та внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} . Виявляється, що виживання культури і стимуляція росту відростків спостерігається лише за певного невисокого оптимального їх рівня (порядку 100 нМ). За підвищення його до кількох сотень нМ відростки, навпаки, втягуються і настає загибель клітин.

У процесі апоптозної загибелі клітини істотним компонентом також є кальцієва сигналізація, у цьому випадку в клітинне ядро. Як показали останні дослідження, ядерна мембрана теж являє собою об'ємне кальцієве депо, котре може ефективно впорскувати іони в нуклеоплазму під дією внутрішньоклітинних сигналів. Ці іони відіграють важливу роль в ущільненні ядерного хроматину і злипанні білків, які реплікуються. Вони також активують різні гідролізуючі ензими — протеази, нуклеази і ліпази, що призводять до деградації ядерного ламініну і ДНК.

Унікальні фізико-хімічні характеристики іонів Ca^{2+} роблять їх активними учасниками будь-яких життєвих процесів у клітині. З усіх іонів, що були у складі первісного

життєвого середовища, вони виявилися найпридатніши ми для цієї мети. Разом з тим, ці іони приховують у собі і смертельну небезпеку, коли їхня активність стає надмірною. Тому проблема регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого обміну — одна з головних у вивченні життя клітини. Дуже важливим результатом дослідження даної проблеми став висновок про те, що зовнішні втручання в цю регуляцію — надзвичайно ефективний спосіб керування життєвими процесами.

© КОСТЮК Платон Григорович. Академік НАН України. Директор Інституту фізіології ім. О. О.Богомольця НАНУ (Київ). 2001.
