

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Казанский государственный медицинский университет»**

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Казанский государственный университет
им.В.И.Ульянова-Ленина»**

А.Л. Зефирова, Г.Ф. Ситдикова

Ионные каналы возбудимой клетки

(структура, функция, патология)

Казань – 2010

УДК 612.01+ 612.014 612.8 + 577.352

ISBN

Авторы:

Зефилов Андрей Львович - Заслуженный деятель науки РФ и РТ, член-корр. РАН, заведующий кафедрой нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета, профессор, д.м.н.

Ситдикова Гузель Фаритовна - профессор кафедры физиологии человека и животных Казанского государственного университета, д.б.н.

Рецензенты:

Островский М.А. - академик РАН, заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, заведующий кафедрой молекулярной физиологии МГУ им. М.В.Ломоносова, профессор, д.б.н.

Скребицкий В.Г. - член-корр. РАН и РАН, заведующий лабораторией функциональной синаптологии ГУ НЦ неврологии РАН, профессор, д.б.н.

Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / Зефилов А.Л., Ситдикова Г.Ф. – Казань: Арт-кафе, 2010. – 271 с.

В настоящей книге обобщены современные литературные и собственные данные о структурно-функциональной организации ионных каналов возбудимых клеток. Помимо подробного описания строения и функционирования различных типов ионных каналов, представлены методы исследования ионных каналов, рассмотрено участие ионных каналов в обеспечении основных свойств возбудимых клеток - формировании мембранного потенциала покоя, потенциала действия, роль ионных каналов в межклеточной сигнализации: регуляции освобождения медиатора, генерации синаптических и рецепторных потенциалов. Особое внимание уделено каналопатиям - нарушениям работы ионных каналов. Проанализированы патофизиологические механизмы, связанные с дефектами ионных каналов, выражающиеся в целом ряде заболеваний у человека и животных.

Книга предназначена для широкого круга читателей: физиологов, биофизиков, биохимиков, врачей-клиницистов, специалистов смежных специальностей. Кроме того, монография будет полезна студентам медицинских ВУЗов и биологических факультетов университетов.

Таблиц -2, рисунков -75, библиография – 541 название.

Zefirov A.L., Sitdikova G.F. Ion channels of excitable cell (structure, function, pathology).

Recent literature and own data concerning ion channels of excitable cells are summarized in the present book. The detail description of structure and properties of ion channels, methods of their study are presented here. We also described the role of ion channels in the formation of membrane potential, generation of action potential, their role in intercellular communication – transmitter release, generation of postsynaptic and receptor potentials. Special attention was devoted to channelopathies, where the pathophysiological mechanisms underlying in the number of human diseases associated with the dysfunction of ion channels were analyzed. The monograph is aimed for the broad circle of scientists: physiologists, biophysicists, biochemists, clinicians, related specialists. It will be useful also for students of medical and biological faculties of universities.

The tables – 2, figures – 75, bibliography – 541 items.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1. Общие принципы строения и функционирования ионных каналов. Классификации	7
2. Методы исследования ионных каналов	30
3. Строение и функциональные свойства основных типов ионных каналов	47
3.1. Натриевые каналы	47
3.2. Калиевые каналы	53
3.3. Хлорные каналы	68
3.4. Кальциевые каналы	76
3.5. Каналы синаптических везикул	85
3.6. Лиганд-активируемые неселективные ионные каналы	86
3.7. Стретч-каналы	100
3.8. Коннексоны	102
3.9. Протон-активируемые каналы	104
3.10. Аквапорины	105
4. Ионные каналы и межклеточная сигнализация	107
4.1. Мембранный потенциал покоя	109
4.2. Потенциал действия	112
4.3. Ионные каналы и синаптические сигналы	123
4.3.1. Ионные каналы и ионные токи в пресинаптическом нервном окончании	128
4.3.2. Кальциевые каналы нервного окончания в процессах экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора	147
4.3.3. Ионные каналы и постсинаптические электрические сигналы	156
4.3.4. Ионные каналы и синаптическая пластичность	162
4.4. Ионные каналы и рецепторные сигналы	167
4.4.1. Роль ионных каналов в процессе фототрансдукции	169
4.4.2. Ионные каналы и механорецепция	172
4.4.3. Роль ионных каналов в процессах трансдукции в обонятельных и вкусовых рецепторах	178

4.4.4. Ионные каналы и терморцепция	183
4.4.5. Ионные каналы и ноцицепция	183
5. Нарушения работы ионных каналов. Каналопатии	185
5.1. Дисфункции ионных каналов	185
5.2. Каналопатии	189
5.2.1. Натриевые каналы	194
5.2.2. Калиевые каналы	202
5.2.3. Хлорные каналы	208
5.2.3. Кальциевые каналы	214
5.2.4 Лиганд-активируемые неселективные ионные каналы	221
5.2.5. Глиальные каналопатии	224
5.3. Принципы терапии каналопатий	225
Заключение	226
Список литературы	228

Сокращения

МП - мембранный потенциал, ПД - потенциал действия, ЦНС - центральная нервная система, АХ - ацетилхолин, Н-АХ-рецептор – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, АТФ - аденозин трифосфорная кислота, цАМФ–циклический аденозинмонофосфат, цГМФ-циклический гуанозинмонофосфат, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, Ри - рианодин, ЭПР - эндоплазматический ретикулум, СПР - саркоплазматический ретикулум, ИФ₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат, ГиперПП - гиперкалиемический периодический паралич, LQT - синдром длительного QT интервала, CFTR - регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе, П-рецептор – пуриновый рецептор, НМДА - N-метил-D-аспартат, АМПА - α-амино-3-гидроксил-5-метил-4-изоксазолепропионовая кислота, 5НТ₃ – серотонин, 4-АП – 4-аминопиридин, ТЭА – тетраэтиламмоний.

Введение

Ионные каналы мембран живой клетки выполняют целый ряд функций (Hille B., 1992, Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002). Они регулируют рН и объем клетки, обеспечивают пассивный транспорт ионов и воды через мембрану, внутриклеточную концентрацию ионов кальция. Часто являясь рецепторами, каналы включены в системную регуляцию функций организма. Особое значение ионные каналы имеют в возбудимых клетках. Они обеспечивают создание мембранного потенциала (МП) покоя, возбудимость, а также активную или пассивную деполяризацию, инициируют выделение гормонов и сокращение мышечных волокон. Каналы принимают участие в синаптических процессах - процессах передачи информации с одной нервной клетки на другую, включающих экзоцитоз синаптических везикул с выделением медиатора и его взаимодействие с рецепторами постсинаптической мембраны, обеспечивают тонкую настройку всех пре- и постсинаптических функций за счет наличия обратных связей и ретроградных сигналов. Именно эти процессы лежат в основе сложнейших интегративных функций мозга, кратковременной и долговременной синаптической пластичности (Sperelakis N., 1995, Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C. F., 2000). Ионные каналы принимают участие в восприятии сенсорной информации, обеспечивая процессы трансдукции и возникновения рецепторных потенциалов. С каждым годом число обнаруженных ионных каналов увеличивается, а количество подтипов одного вида каналов с учетом особенностей их молекулярного строения и фармакологических свойств возрастает многократно. Можно думать, что в ближайшее время число обнаруженных в клетках типов и подтипов ионных каналов достигнет нескольких сотен.

Ионные каналы клетки представляют собой сложные белковые структуры с молекулярными системами открытия, закрытия, селективности, инактивации и регуляции. Как и в любой биологической структуре в канале могут возникнуть дисфункции, которые приводят к нарушению функционирования клетки (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. 1999, Catteral et al., 2008, Крыжановский Г.Н., 2002). Эти дисфункции могут, прежде всего, быть связаны

с генетическими мутациями генов, кодирующих субъединицы канала, а также с эндогенными агентами (аутоантителами), изменяющими работу канала. Достижения в молекулярной биологии и физиологии ионных каналов приобретают в последнее время все большее патофизиологическое и прикладное значение. С каждым годом возрастает количество обнаруженных врожденных заболеваний (каналопатий) человека и животных, которые сопровождаются дисфункциями каналов (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999, Зефирова А.Л. и др., 2000, Catterall et al., 2008). Исследования в этих направлениях позволяют сделать заключение о строении и функционировании дефектного канала, объяснить патогенез, симптоматику и патофизиологические основы формирования заболеваний, связанных с этим дефектом, разработать тактику лечения. Кроме этого, результаты таких исследований важны для нормальной физиологии и позволяют оценить роль структурных элементов интактного ионного канала в формировании определенных свойств и характеристик его работы, значение различных типов каналов в функционировании клетки.

В настоящей книге проанализированы современные данные по исследованию основных ионных каналов клетки, представлены функциональные характеристики, молекулярное строение и механизмы регуляции наиболее известных потенциал- и лиганд-активируемых каналов, подчеркнута роль определенного типа каналов в механизмах функционирования клетки, показаны молекулярные дефекты, нарушающие работу ионных каналов. Мы также рассмотрели участие ионных каналов в обеспечении основных свойств возбудимых клеток – формировании МП покоя, потенциала действия (ПД), роль ионных каналов в межклеточной сигнализации: регуляции освобождения медиатора, генерации постсинаптических потенциалов. Также представлены механизмы генерации рецепторных потенциалов в рецепторных клетках. Проанализированы патофизиологические механизмы, связанные с дефектами ионных каналов, выражающиеся в целом ряде заболеваний у человека и животных. В отдельный раздел книги также включены наши собственные исследования, посвященные выявлению и анализу ионных каналов нервного окончания.

Не все разделы данной книги равноценны по глубине и детализации, так как мы ставили своей задачей обобщить, систематизировать и донести до разных по уровню подготовки и профессиональным интересам читателей (ученых, преподавателей, врачей–клиницистов, аспирантов и студентов) накопленный к настоящему времени огромный молекулярно-биологический, физиологический и патофизиологический материал по исследованию нормальных и дефектных ионных каналов.

1. Общие принципы строения и функционирования ионных каналов. Классификации

Клеточная мембрана. Клеточные мембраны состоят из липидов и встроенных в липиды белковых молекул (рис. 1). Молекулы липидов организованы в двухслойную мембрану (бислой) толщиной около 6 нм. Полярные гидрофильные головки липидов обращены к поверхностям мембраны, а гидрофобные хвосты вытянуты к середине бислоя. Липиды очень плотно упакованы, поэтому мембрана плохо пропускает воду, практически непроницаема для ионов, не говоря уже о других крупных молекулах.

Белковые молекулы частично погружены в слой липидов либо с внеклеточной, либо с цитоплазматической стороны. Некоторые белки целиком пронизывают мембрану. Именно пронизывающие мембрану трансмембранные белки образуют структуры, обеспечивающие движение ионов через мембрану (ионные переносчики и ионные каналы). Мембранные структуры клетки можно разделить на поверхностную плазматическую мембрану, отделяющую цитоплазму клетки от окружающей среды, и мембраны внутриклеточных органелл (ядра, эндоплазматического ретикулума (ЭПР), аппарата Гольджи, митохондрий, везикул и др.) (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Siegel G.J. et al., 2006). Основные электрические клеточные процессы разворачиваются на поверхностной плазматической мембране.

Как выглядит ионный канал? На рисунке 2 показан участок поверхностной мембраны клетки с встроенными в нее ионными каналами. Плотность каналов значительно варьирует в разных живых клетках. На один

квадратный микрометр мембраны приходится от одного до двух тысяч ионных каналов. Ионный канал - это крупный белок, образующий центральную водную пору, которая сообщает наружную и внутреннюю среду клетки. Канал имеет наружное устье, обращенное в сторону межклеточной среды, и внутреннее, которое обращено в сторону цитоплазмы.

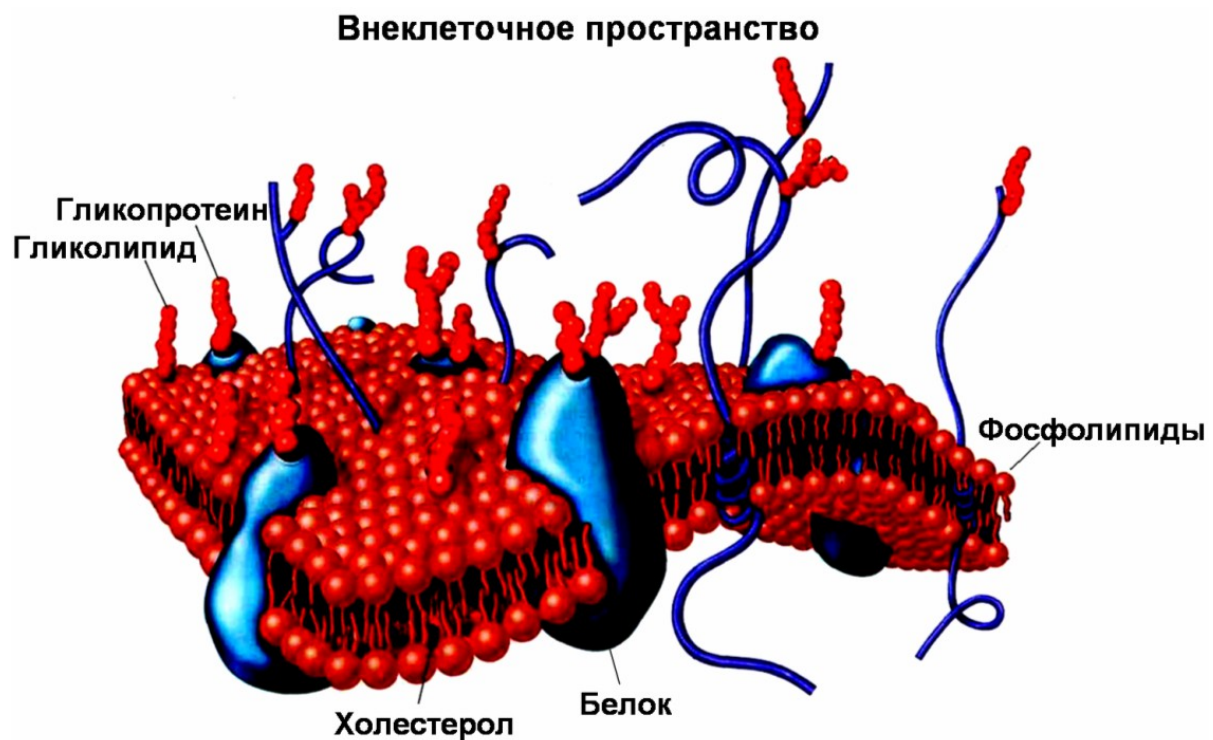


Рис. 1. Строение клеточной мембраны.

Мембрана клетки представляет собой липидный бислой, который пронизан интегральными белками. Большая часть липидов мембран представляет собой фосфолипиды, среди которых чаще всего встречаются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит. В состав мембран также входят сфинголипиды, к которым относят сфингомиелин, цереброзиды и ганглиозиды. Цереброзиды и ганглиозиды, имеющие в своем составе углеводную часть, также называют гликолипидами. В состав мембран входит холестерин, относящийся к классу стероидов. Белки мембран также как и некоторые липиды могут быть гликозилированы, в этом случае их называют гликопротеинами. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Кроме этого канал имеет ворота - специальный участок, который может конформационно меняться и перекрывать водную пору. При помощи этого воротного механизма канал может открываться и закрываться (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002).

Существуют несколько классификаций каналов, которые в разных соотношениях учитывают свойства и характеристики работы каналов, молекулярную организацию и гены, кодирующие, структуру каналов, участие в определенной клеточной функции, регуляцию, чувствительность к химическим блокаторам и др. (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002). Эти классификации мы представим в соответствующих разделах книги.

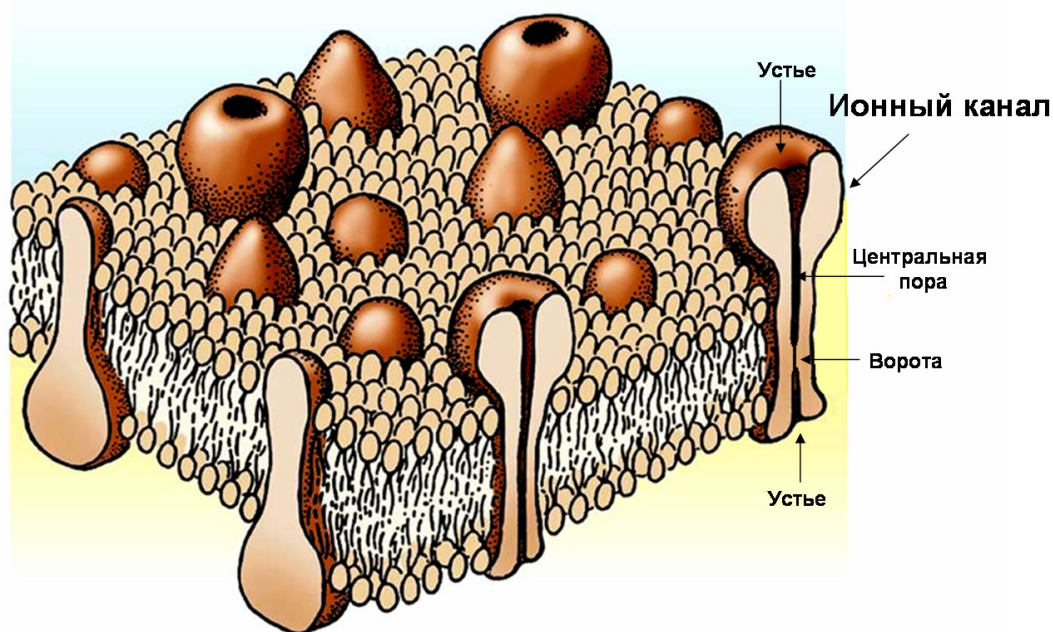


Рис 2. Ионные каналы клеточной мембраны.

Некоторые трансмембранные белки образуют ионные каналы. На рисунке схематично представлен ионный канал с центральной водной порой, устьями и воротным механизмом. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Два основных типа ионных каналов. Все каналы возбудимых клеток можно разделить на два основных типа. Первый тип – это *каналы покоя*, которые спонтанно открываются и закрываются без всяких внешних воздействий. Они важны для генерации МП покоя. Второй тип - это, так называемые, *gate-каналы, воротные каналы* (gate - ворота). В покое эти каналы закрыты и могут открываться под действием тех или иных раздражителей. Раздражители могут действовать непосредственно на канал или опосредовано через систему вторичных посредников. Некоторые разновидности таких каналов принимают участие в генерации электрических сигналов возбудимых клеток (ПД, синаптических и рецепторных потенциалов) (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Избирательность. Большинство ионных каналов характеризуются избирательностью (селективностью), то есть через определенный вид каналов проходят только определенные ионы. По этому признаку различают натриевые (Na-), калиевые (K-), кальциевые (Ca-), хлорные (Cl-) каналы. Селективность каналов определяется размерами поры, размерами иона и его гидратной оболочки, зарядом иона, а также зарядом внутренней поверхности канала. Однако, встречаются и неселективные каналы, которые могут пропускать сразу несколько различных ионов, например, калий и натрий или хлор и калий. Есть каналы, через которые могут проходить все ионы и даже более крупные молекулы (Hille B., 2001).

Открытое и закрытое состояние. Ионный канал характеризуется двумя состояниями - открытым и закрытым. Причем переход из закрытого состояния в открытое и обратно происходит практически мгновенно. Особенностью работы канала является то, что он открывается только на определенное время. Время открытого состояния канала меняется случайным образом при каждом открытии, но среднее время открытого состояния - характерная величина для данного вида каналов, а все вариации происходят вокруг этого среднего показателя. Обычно ионный канал открывается на 1 мсек (Hille B., 2001).

Активация. Как уже было сказано, некоторые ионные каналы открываются достаточно часто даже в покое. Иными словами, вероятность нахождения таких каналов в открытом состоянии в неактивированной клетке относительно высока. Остальные (воротные) ионные каналы при этом закрыты,

то есть вероятность нахождения их в открытом состоянии очень низка. Активация таких каналов адекватным раздражителем резко увеличивает вероятность открытия. По способу активации все обнаруженные к настоящему времени ионные каналы можно разделить на четыре группы (рис. 3). Некоторые каналы специфически отвечают на физические изменения в клеточной мембране нейрона. Наиболее яркими представителями этой группы являются **потенциал-активируемые каналы**. Примерами могут служить чувствительные к потенциалу на мембране К-, Na-, Са-каналы, которые отвечают за формирование ПД. Эти каналы открываются при достижении определенного потенциала на мембране. К группе каналов, активирующихся физическими изменениями, относятся также **механо-чувствительные каналы**, которые отвечают на механические воздействия (растяжение или деформацию клеточной мембраны) (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Зефиров А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002).

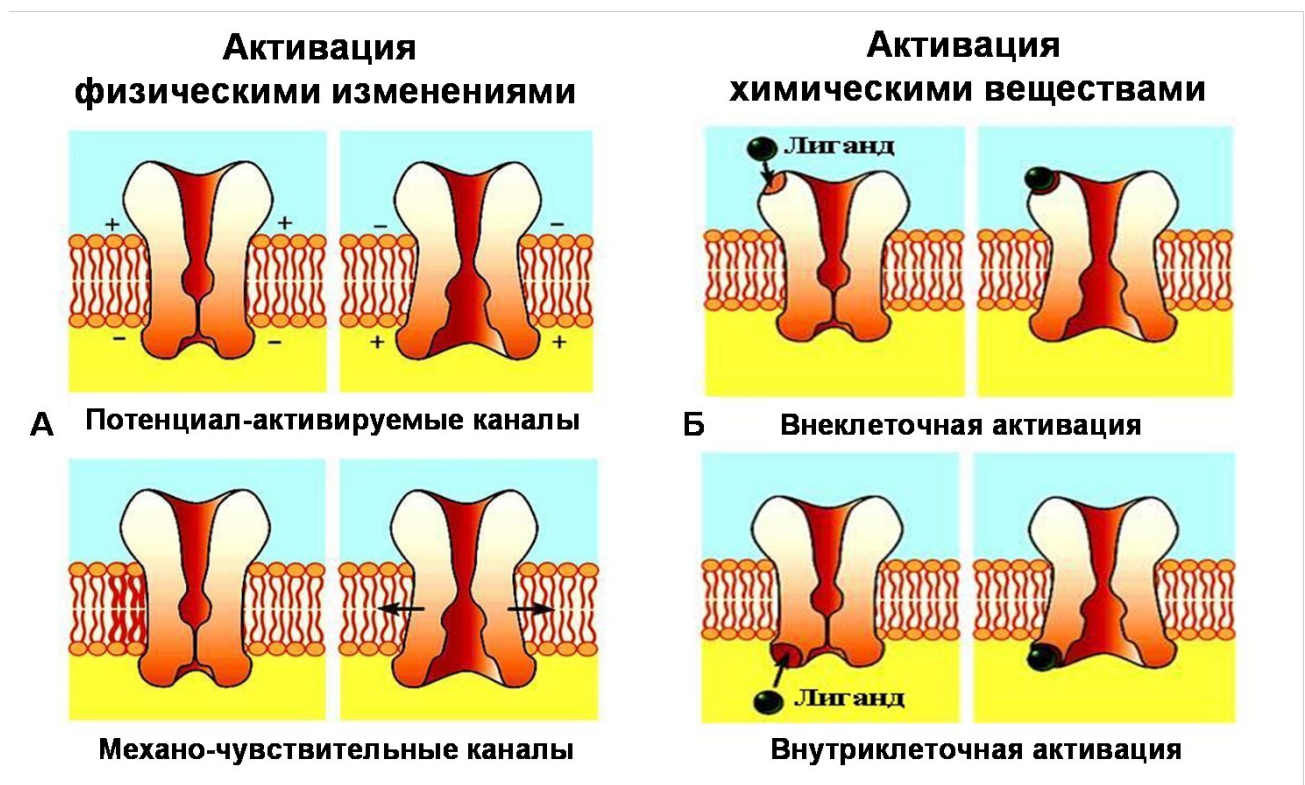


Рис. 3. Способы активации ионных каналов.

А - Ионные каналы, активируемые изменением мембранного потенциала или растяжением мембраны. Б - Ионные каналы, активируемые химическими

агентами (лигандами) с внеклеточной или с внутриклеточной стороны. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Ионные каналы другой группы открываются тогда, когда химические вещества активируют специальные рецепторные связывающие центры на молекуле канала. Такие *лиганд-активируемые каналы* подразделяются на две подгруппы в зависимости от того, являются ли их рецепторные центры внутриклеточными или внеклеточными. Лиганд-активируемые каналы, отвечающие на внеклеточные стимулы, называют также *ионотропными рецепторами*. Они включают каналы, чувствительные к нейромедиаторам и принимающие непосредственное участие в передаче информации в синаптических структурах (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002). Лиганд-активируемые каналы, активирующиеся с цитоплазматической стороны, включают каналы, чувствительные к изменениям концентрации специфических ионов и внутриклеточных лигандов. Например, Са-активируемые К-каналы активируются локальным повышением концентрации внутриклеточного кальция. Такие каналы играют важную роль в реполяризации клеточной мембраны во время завершения ПД. Помимо ионов Са типичными представителями внутриклеточных лигандов являются циклические нуклеотиды. Циклический ГМФ, например, отвечает за активацию Na-каналов в палочках сетчатки. Такой тип канала играет принципиальную роль в работе зрительного анализатора. Представленная классификация каналов по способу активации в значительной степени условна. Некоторые ионные каналы могут активироваться только при нескольких воздействиях. Например, Са-активируемые К-каналы чувствительны также к изменению потенциала, а некоторые потенциал-активируемые ионные каналы чувствительны к внутриклеточным лигандам (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002).

Необходимо специально остановиться еще на одном непрямом виде активации ионных каналов с участием *метаботропных рецепторов* плазматической мембраны. Метаботропные рецепторы представляют собой комплекс белков, состоящий из собственно *рецепторного белка*,

связывающегося с нейромедиатором, **G-белка**, который при активации взаимодействует с **эффекторными белками** - ферментами или ионными каналами, изменяя их активность. В неактивной форме G-белок существует в виде $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримера, связывающего ГДФ. При связывании рецепторного белка с лигандом происходит активация α -субъединицы, которая имеет повышенное сродство к ГТФ и пониженную аффинность к $\beta\gamma$ -комплексу. В результате α -субъединица освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ и диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера. В состоянии комплекса с ГТФ α -субъединица активирует или ингибирует различные внутриклеточные ферменты такие, как фосфолипазу A_2 , катализирующую выделение арахидоновой кислоты, аденилатциклазу, катализирующую синтез цАМФ из АТФ, гуанилатциклазу, катализирующую синтез цГМФ из ГТФ, фосфолипазу C, расщепляющую фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат мембраны на инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ₃) и диацилглицерол.

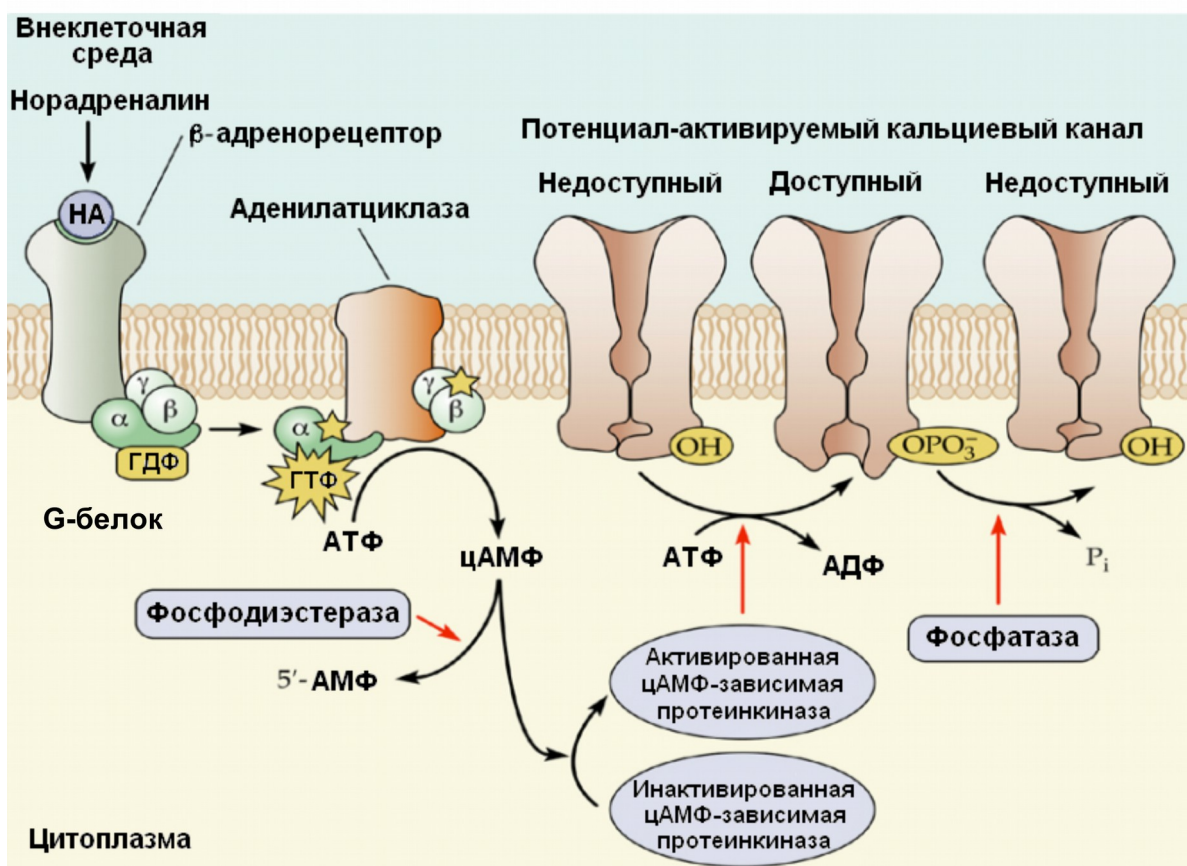


Рис. 4. Связь метаботропного рецептора с ионным каналом при участии G-белка и вторичного посредника.

Норадреналин (НА), взаимодействуя с β -адренорецептором, вызывает активацию аденилатциклазы и последующий синтез вторичного посредника - цАМФ. цАМФ активирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует потенциал-активируемый Са-канал. Ответ, вызванный НА, прекращается в результате гидролиза цАМФ фосфодиэстеразами и дефосфорилирования белка фосфатазами. В кардиомиоцитах НА вызывает фосфорилирование Са-каналов, переводя их в состояние, из которого они могут быть активированы в ответ на деполяризацию мембраны (доступный). (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

В результате этих событий меняется уровень вторичных посредников – ионов Ca, цАМФ, цГМФ, ИФ₃ и диацилглицерола, что приводит к активации соответствующих пулов протеинкиназ: цАМФ-зависимых протеинкиназ (А-киназ), цГМФ-зависимых протеинкиназ (G-киназ), Ca-кальмодулин-зависимых протеинкиназ (В-киназ) и Ca-фосфолипид-зависимых протеинкиназ (С-киназ). Активация протеинкиназ обуславливает фосфорилирование ионных каналов и может инициировать их открытие или закрытие (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Siegel et al., 2006, Ткачук В.А., 2007). Один из вариантов таких взаимодействий представлен на рис.4.

В некоторых случаях димер $\beta\gamma$ может напрямую взаимодействовать с субъединицами ионных каналов, обуславливая стимулирование или ингибирование активности каналов. В этом случае G-белок непосредственно взаимодействует с ионными каналами (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Siegel et al., 2006, Ткачук В.А., 2007).

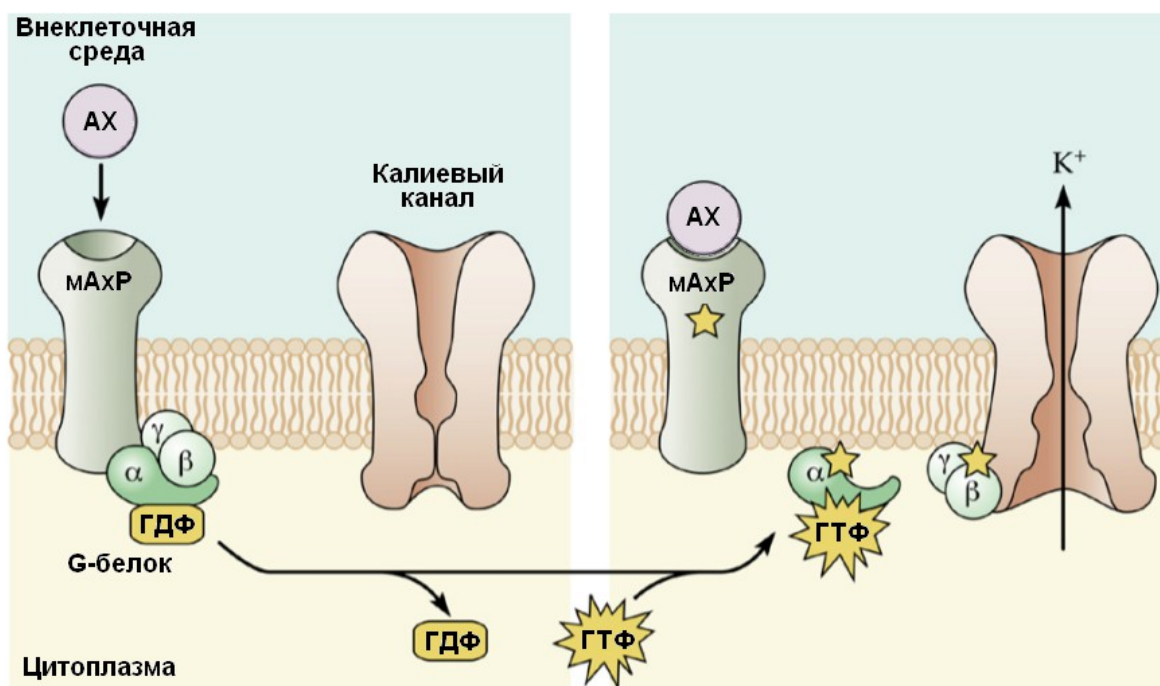


Рис. 5. Связь метаботропного рецептора с ионным каналом при участии G-белка.

Ацетилхолин (АХ), взаимодействуя с мускариновыми рецепторами М₂/М₄-типа (mAChR) вызывает активацию К-каналов с помощью $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

На рис.5 представлен один из вариантов связи метаботропного ацетилхолинового (АХ) рецептора с К-каналом. В отличие от ионотропного рецептора метаботропный рецептор способен контактировать последовательно со многими десятками и сотнями молекул G-белка, которые, в свою очередь, активируют большое количество молекул фермента, что сопровождается резким усилением ответа. Все это приводит к активации большого числа ионных каналов и продолжительному физиологическому ответу (Hille B., 1994, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Siegel et al., 2006).

Деактивация. Иногда адекватный стимул может деактивировать ионные каналы, бывшие активными в покое. Важно помнить, что активация или деактивация канала означает возрастание или снижение вероятности открытия канала, но не увеличение или уменьшение времени открытого состояния канала.

Инактивация, десенситизация, блок. Помимо процессов активации и деактивации ионный ток через канал регулируется двумя другими процессами. Во-первых, ионный канал может переходить в такое конформационное состояние, в котором обычный активирующий стимул не способен вызвать открытие канала. Для ионных каналов, активируемых потенциалом, такое состояние называется *инактивацией*. По скорости инактивации различают быстро инактивирующиеся и медленно инактивирующиеся ионные каналы. Для каналов, отвечающих на химические стимулы, это состояние известно как *десенситизация*. Во-вторых, прекращение ионного тока через канал может возникнуть также при *блоке открытого канала*. Такое случается, когда крупная молекула (например, молекула токсина) связывается с ионным каналом и физически закупоривает пору. Другим примером может служить блокирование некоторых каналов, например, ионами магния или кадмия. Эти катионы сами не проникают через такие ионные каналы, но связываются с каналом в области его устья и тем самым мешают проникновению других катионов (Hille, 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002).

Проводимость и проницаемость. Каждый канал характеризуется проводимостью и проницаемостью. Величина тока, проходящего через ионный канал, является прямым отражением того, как быстро заряженные ионы движутся через канал. Ток ионов в значительной степени зависит от

трансмембранного потенциала. Если концентрация ионов по обе стороны мембраны одинакова, то ток через открытый канал (i), равен $i = \gamma \cdot V$, где V - потенциал на мембране. Эта формула представляет собой преобразованный закон Ома. Константа γ называется **проводимостью** канала. В зависимости от величины этой константы различают каналы с высокой и низкой проводимостью. При одном и том же потенциале на мембране канал с высокой проводимостью проводит больший ток по сравнению с каналом, имеющим низкую проводимость. Проводимость измеряется в сименсах (См). В нейронах трансмембранный потенциал обычно выражается в милливольтгах (1 мВ = 10^{-3} В), токи одиночных ионных каналов в пикоамперах (1 пА = 10^{-12} А), проводимость в пикосименсах (1 пСм = 10^{-12} См) (Hille В., 2001, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Проводимость ионного канала зависит от двух факторов: во-первых, от того, с какой легкостью ионы проходят через открытый канал. Это внутреннее свойство канала известно как **проницаемость** канала. Во-вторых, проводимость зависит от концентрации ионов около устья канала. Так, в отсутствие ионов как внутри, так и снаружи клетки не может быть и тока независимо от величины проницаемости канала и разности потенциалов на мембране. Отсюда, взаимоотношения между проницаемостью и проводимостью могут быть представлены следующим образом:

Открытый канал ~ проницаемость.

Проницаемость + ионы ~ проводимость.

Проницаемость канала определяется особенностями прохождения ионов через канал. Одним из возможных механизмов движения ионов является диффузия через водную среду, заполняющую пору канала. Представление о диффузии лежало в основе ранних гипотез о процессе ионной проницаемости. Однако, для большинства каналов простая диффузия описывает ионную проницаемость недостаточно адекватно. Главная причина в том, что проникающие ионы вступают во взаимодействие с белками ионного канала. Так, в растворе благодаря наличию заряда ионы всегда покрыты гидратной оболочкой. Если пора ионного канала узкая, необходимо некоторое количество энергии, чтобы освободить ион от ассоциированных молекул воды и позволить ему проникнуть через этот участок. Кроме этого, в канале ион может быть

объектом притяжения или отталкивания зарядами стенки канала. Взаимодействие иона со стенками ионного канала может приводить к своеобразным «перескокам» иона с одного центра связывания на другой. Такие взаимодействия иона могут влиять как на ионную избирательность, так и на проницаемость ионных каналов (Hille, 2001, Николс Дж. Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Движение ионов через открытый канал. Движущие силы. Потенциал равновесия. Передвижение ионов в канале обеспечивается наличием двух движущих сил. Первая - это *химическая движущая сила*, которая определяется разностью концентраций ионов снаружи и внутри клетки (рис. 6). Концентрация ионов снаружи и внутри клетки неодинакова, что связано с работой специальных мембранных транспортных систем-переносчиков (насосов). Вторая сила - *электрическая движущая сила*, зависящая от потенциала на мембране. Проследим взаимодействие движущих сил на примере К-канала (рис. 7). Если К-канал открыт, а на мембране существует концентрационный

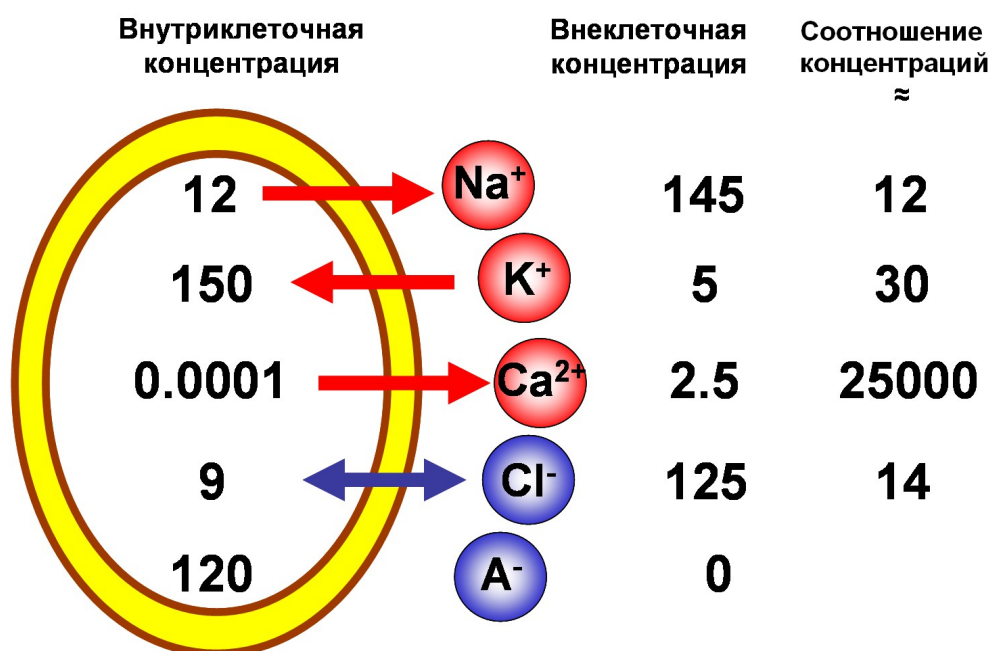


Рис. 6. Вне- и внутриклеточные концентрации ионов в двигательных нейронах спинного мозга.

На рисунке указаны вне- и внутриклеточные концентрации ионов (в мМ), а также соотношение их концентраций. Стрелками указаны направления передвижения ионов через мембрану за счет работы мембранных насосов. А⁻ - анионы – крупные органические соединения не проникающие через мембрану.

градиент для калия, то ионы К начинают двигаться через канал и выходят из клетки. Ионы К несут положительные заряды, поэтому снаружи мембрана заряжается положительно, а потеря положительных зарядов клеткой ведет к появлению отрицательного заряда на внутренней поверхности мембраны. В результате этого на мембране формируется разность потенциалов (с отрицательным зарядом внутри). Как только это произошло, возникает электрическая движущая сила, которая заставляет ионы К входить в клетку. В конце концов, химическая сила уравнивается электрической, и движение ионов К через канал прекращается. Электрический потенциал на мембране, который прекращает движение ионов К через К-канал по градиенту концентрации носит название *равновесного потенциала* для калия. Учитывая заряд иона и его концентрационный градиент, аналогичные построения можно произвести и для ионов Na, Ca и Cl, для которых в мембране есть селективные каналы (рис. 7) (Hille B., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002, Николс Дж. Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Еще раз хочется отметить, что равновесный потенциал зависит только от концентрации ионов по обе стороны мембраны, но не от свойств ионного канала или механизма проникновения ионов через канал. Экспериментальные определения в скелетных мышцах млекопитающих показали, что равновесный потенциал для ионов К составляет -95 мВ (знак показывает заряд на внутренней поверхности мембраны), ионов Na - $+67$ мВ, ионов Ca - $+123$ мВ. Для Cl⁻ равновесный потенциал составляет -89 мВ (рис. 7). В других возбудимых клетках, например, в нейронах равновесный хлорный потенциал меньше и составляет $-40-50$ мВ (Boron W.F., Boulpaep E.L. , 2003).

Равновесный потенциал можно рассчитать по уравнению Нернста:

$$E_x = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{[X]_o}{[X]_i}\right),$$

где $[X]_o$ и $[X]_i$, концентрации иона снаружи и внутри клетки, F - константа Фарадея, R - газовая постоянная, T - температура по Кельвину, z - валентность иона. Это уравнение можно применить для расчета электрохимического равновесного потенциала для любого иона.

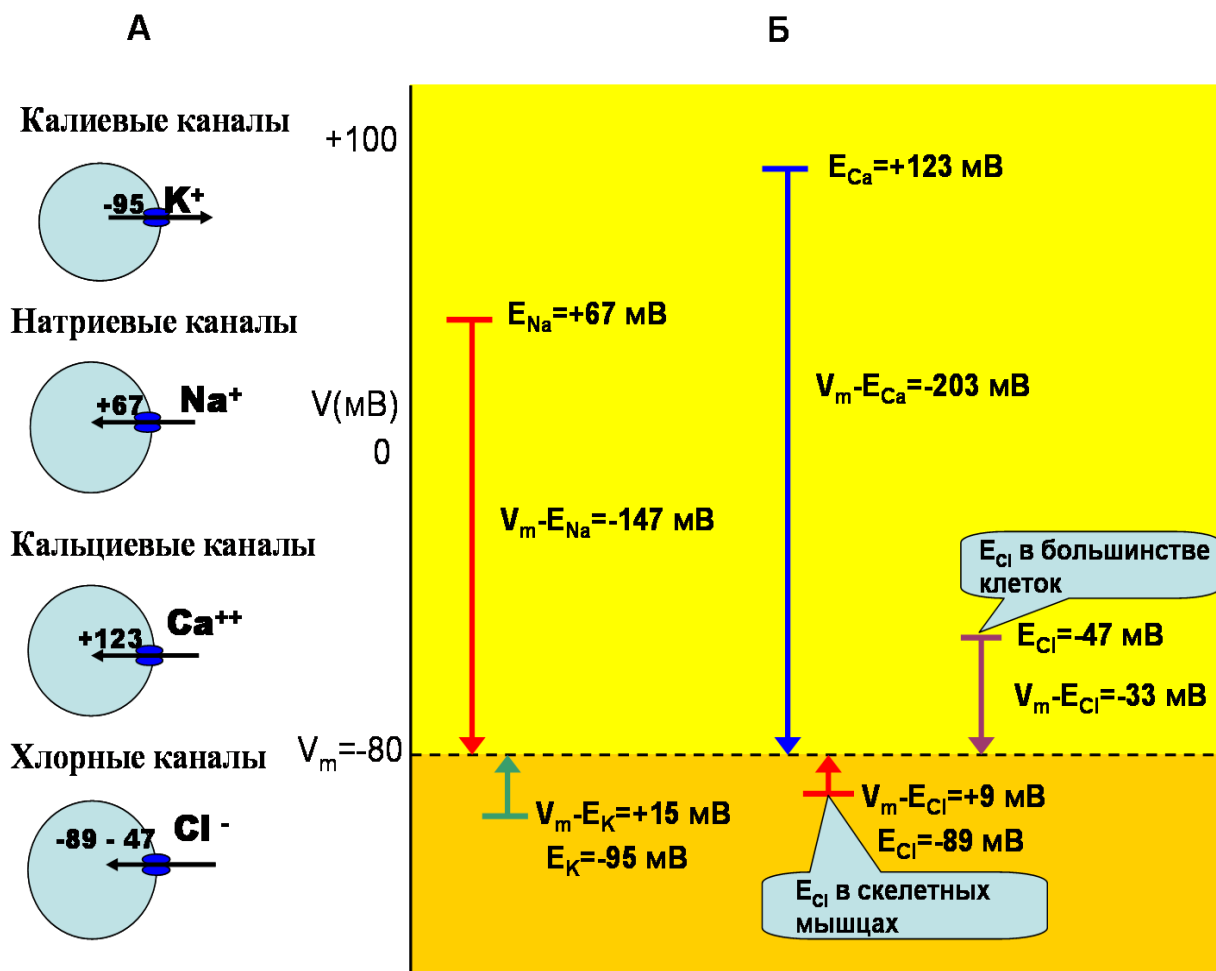


Рис 7. Итоговые движущие силы для различных ионов.

А - При открытии К-, Na-, Ca- и Cl-каналов ионы двигаются через мембрану по концентрационному градиенту до тех пор, пока на мембране не возникнет потенциал, прекращающий движение иона (равновесный потенциал). Стрелка показывает на направление движения иона. Для каждого иона представлен равновесный потенциал (знак указывает заряд на внутренней поверхности мембраны). Б - Значения равновесных потенциалов (короткие горизонтальные линии для различных ионов). Вертикальными стрелками показана движущая сила для каждого иона при мембранном потенциале (МП) -80 мВ (пунктирная линия). Значения рассчитаны для скелетной мышцы млекопитающих. Также дано типичное значение E_{Cl} для немышечных клеток. Для ионов Na и Ca стрелки направлены вниз, что говорит о том, что при таких значениях МП открытие каналов вызовет входящий ток ионов. Для ионов К стрелка направлена вверх, то есть движущая сила вызывает выходящий ток. В скелетно-мышечных клетках движущая сила для ионов Cl направлена наружу, а в других клетках – внутрь. (Из Boron W.F., Boulpaep E.L., 2003 с изменениями).

На основе представлений о равновесном потенциале становится ясным, какая сила в естественных условиях обеспечивает движение ионов через каналы. По формуле $i = \gamma \cdot V$ -ионный ток, текущий через канал, пропорционален потенциалу на мембране, но эта формула не учитывает градиента концентрации и равновесного потенциала для иона. Например, при потенциале -95 мВ тока через К-каналы не будет, поскольку этот потенциал равен калиевому равновесному потенциалу, при потенциале $+67$ мВ не будет тока через Na-каналы, при $+123$ мВ - через Ca-каналы.

Следовательно, ток через канал пропорционален разнице между значением МП (V) и значением равновесного потенциала для иона (E), $i = \gamma \cdot (V - E)$. Эта разница $\cdot (V - E)$ и является **итоговой движущей силой** для иона. На рис. 7 показаны итоговые движущие силы для различных ионов при потенциале мембраны -80 мВ: для ионов К она составляет $+15$ мВ, ионов Na - -147 мВ, ионов Ca - -203 мВ, ионов Cl - от $+9$ до -47 . Из представленных данных следует несколько заключений. Во-первых, итоговая движущая сила зависит от МП, во-вторых, знак указывает направление движения ионов через открытый канал ((+) - выход ионов из клетки, а (-) - вход). В-третьих, абсолютное значение итоговой движущей силы пропорционально величине ионного тока через канал (Boron W.F., Boulpaer E.L., 2003).

Мембранные токи и потенциалы. Если каналов в мембране много, то ток через мембрану (I) определяется током через каждый канал (i), общим количеством каналов (N) и вероятностью (p) того, что данный канал откроется, $I = i \cdot p \cdot N$. Поскольку ток является движением заряженных частиц через мембрану, то будет происходить изменение потенциала на мембране. Мембранные токи формируются различными по заряду ионами, отсюда потенциал на мембране будет зависеть от величины и направленности этих токов (Boron W.F., Boulpaer E.L., 2003).

Принципы молекулярной организации ионных каналов. Применение современных методов исследования позволило определить молекулярную структуру большинства известных ионных каналов (Meir A., Rahamimoff R., 1999, Hille B., 2001) и выявить функциональное значение их элементов. Оказалось, что практически любой канал состоит из нескольких структурно-

функциональных частей, отвечающих за открытие, закрытие, селективность, инактивацию, регуляцию.

Порообразующая часть ионного канала может представлять собой единый полипептид, организованный в виде нескольких идентичных трансмембранных доменов, или состоять из нескольких белковых субъединиц, которые могут быть как одинаковы (гомоолигомер), так и неодинаковы (гетероолигомер) по своей структуре (рис. 8). Каждая порообразующая **субъединица** или **домен** обычно представлены несколькими трансмембранными α -спиральными **сегментами** с N- и C-терминальными доменами белка, направленными внутриклеточно или внеклеточно. Один из трансмембранных сегментов субъединицы потенциал-активируемых каналов содержит уникальный набор положительных зарядов и функционирует как **сенсор потенциала** (Armstrong С.М., Hille В., 1998, Hille В., 2001). Практически все каналы в составе порообразующих субъединиц имеют регуляторные домены, связывающиеся с различными регуляторными молекулами.

Каналы обладают свойством селективно пропускать ионы, которое реализуется в самом узком месте канала, так называемом **селективном фильтре**. Например, катион-селективные каналы часто имеют негативно заряженные остатки в области селективного фильтра, которые притягивают положительные и отталкивают отрицательные ионы (Armstrong С.М., Hille В., 1998, Hille В., 2001).

Многие ионные каналы имеют одну или более **вспомогательных субъединиц**, которые играют модуляторную, структурную или стабилизирующую роли (рис. 8) (Catterall W.A., 2000). Эти субъединицы можно подразделить на два основных класса. Один класс состоит из полностью цитоплазматических внутриклеточных субъединиц, не имеющих трансмембранных доменов, другой – содержит один или несколько трансмембранных доменов.

Методы молекулярной биологии позволили вскрыть **молекулярные механизмы активации и инактивации потенциал-активируемых ионных каналов**. Поскольку открытие потенциал-активируемых каналов связано с уменьшением МП, то для того, чтобы канал открылся необходимо наличие заряженных структур в составе белка канала, которые меняют свое положение

при деполяризации. Одной из структур, привлечших особое внимание исследователей в этой связи, является спиральный сегмент S4, пронизывающий мембрану и содержащий цепочку положительно заряженных аминокислот, а, именно, лизина или аргинина, расположенных в каждой третьей позиции на данном участке молекулы. Предполагают, что этот сегмент играет роль потенциал-чувствительного элемента, обеспечивающего связь между МП и работой воротного механизма.

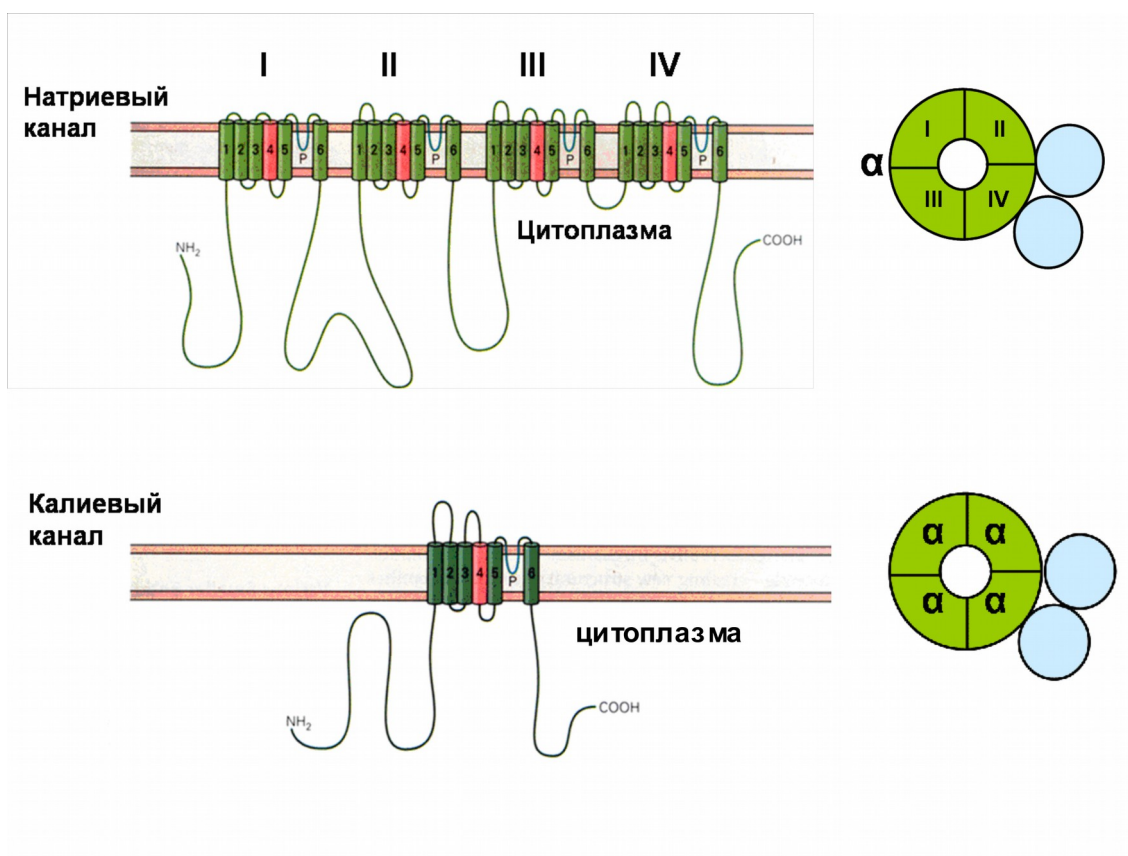


Рис 8. Структура потенциал-активируемых ионных каналов

Порообразующая α -субъединица потенциал-активируемых Na- и K-каналов. α -субъединица Na-канала представляет собой одну белковую молекулу с четырьмя доменами (I-IV), соединенными внутриклеточными аминокислотными петлями. Каждый домен имеет 6 спиральных трансмембранных сегментов. α -субъединица образует канал. α -субъединица K-канала похожа на одиночный домен Na-канала. В этом случае канал образуется за счет стыковки четырех α -субъединиц. Справа показано схематическое изображение каналов (вид сверху). Указано взаимное расположение порообразующих (α) и вспомогательных (регуляторных) субъединиц. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002 с изменениями).

Эти предположения были подтверждены направленными мутациями гена, кодирующего область S4 молекулы Na-канала мозга крысы. Нейтральные или кислые аминокислотные остатки заменили одним или более щелочными остатками для удаления положительных зарядов из спирали. Такие мутации привели к нарушению потенциал-зависимости открытия канала. Подобные результаты были получены и в экспериментах с мутациями области S4 K-каналов (Hille B., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002).

Согласно традиционной модели активации канала деполяризация мембраны вызывает смещение положительных зарядов в направлении внеклеточной среды, поэтому весь сегмент перемещается в том же направлении (рис. 9 А), при этом четвертый сегмент любой субъединицы движется внутри собственной небольшой полости, образованной другими частями молекулы, например, сегментами 1-3. Перемещение S4 влечет за собой дополнительные изменения конформации белковой молекулы, которые приводят к открытию канала. В состоянии покоя отрицательный внутриклеточный заряд притягивает сегмент в направлении цитоплазмы. Использование метода рентгеноструктурного анализа бактериального K-канала привело к пересмотру модели, описывающей движение сенсора потенциала (Jiang Y. et al., 2003 а, б). Согласно новым представлениям потенциал-чувствительные элементы S4 сегмента находятся на внешней поверхности α -субъединицы, образуя «лопасти» (рис. 9 А). В состоянии покоя «лопасти» расположены ближе к внутренней стороне мембраны, и канал имеет конусообразную форму. При деполяризации мембраны сегмент S4 перемещается и занимает вертикальное положение, перенося таким образом заряды через электрическое поле (рис. 9А). В результате α -субъединицы приобретают цилиндрическую форму, и канал открывается (Jiang Y. et al., 2003 а, б).

Молекулярные механизмы инактивации каналов иные (рис. 9 Б). Потенциал-активируемые каналы обычно проявляют два типа инактивации – быструю и медленную. Эти два непроводящих состояния опосредуются различными молекулярными механизмами. Быстрая инактивация описывается как быстрое и полное снижение токов, наблюдаемое в ответ на короткие деполяризации (миллисекунды). Медленная инактивация происходит, когда клетка деполяризуется на секунды и минуты. Возвращение из состояния

инактивации происходит при реполяризации мембраны в тех же временных шкалах, что и сама инактивация.

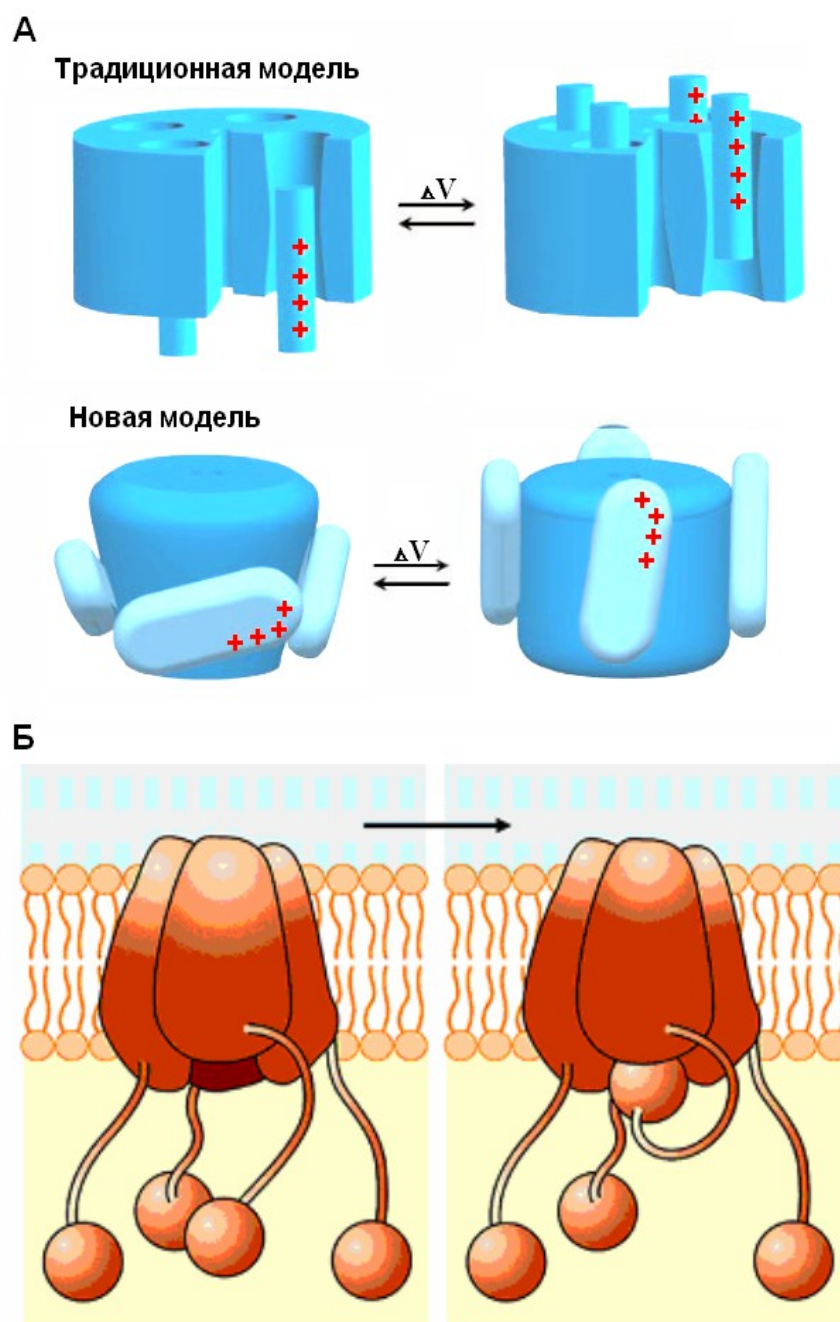


Рис. 9 . Молекулярные механизмы активации и инактивации ионных каналов.

А - Модели, иллюстрирующие механизм активации канала в ответ на изменение потенциала на мембране. По традиционной схеме, четвертая спираль каждой субъединицы несет положительные заряды (сенсор потенциала) и движется внутри канала в сторону наружной поверхности мембраны, форма тетрамера при этом остается неизменной. Согласно другой модели заряды переносятся “лопастями”, которые движутся по наружной поверхности тетрамера, изменяя его форму (Jiang Y., Lee A., Chen J. et al., 2003). Б – Быстрая

инактивация многих каналов обеспечивается закупориванием внутреннего устья канала внутриклеточной аминокислотной петлей (модель «мяча на цепочке»). (Из Nicholls J.G. et al., 2003).

Для объяснения быстрой инактивации (так называемой N-тип инактивации) была предложена модель «мяча и цепи» (Armstrong C.M., Hille B., 1998), в которой внутриклеточная блокирующая частица («мяч»), прикрепленная к цитоплазматической стороне канала молекулярной цепью, входит во внутреннее устье канала и блокирует ток ионов. Быстрая инактивация Na-канала связана с цитоплазматической петлей, соединяющей III и IV домены, где инактивационная частица (мяч), по-видимому, состоит из 3 аминокислот в центре петли (Vassilev P.M., Scheuer T., Catterall W.A., 1988 а, б). «Мячом» быстро инактивирующихся K-каналов является часть NH₂-конца (Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W., 1990) Медленная C-тип инактивация отличается от быстрой не только кинетически, но и структурно и, по всей видимости, связана с конформационными изменениями белка. Она имеется почти у всех потенциал-активируемых катионных каналов (Lopez-Barneo J., Hoshi T, Heinemann S.H., Aldrich R.W., 1993). Нарушения описанных механизмов инактивации точечными мутациями приводят к P-типу инактивации (pore-type) (De Blasi M. et al, 1993). Описаны также и другие инактивационные механизмы, включающие модификацию внутриклеточного устья канала дополнительными субъединицами (Morales M.J. et al, 1996).

Основой всех лиганд-активируемых каналов (или ионотропных рецепторов) является крупный белок, состоящий из пяти, реже четырех белковых субъединиц. Молекулярные массы белка варьируют от 40 до 70 кДа (рис. 10). Субъединицы рецептора пронизывают толщу клеточной мембраны, образуя ионный канал. Первичная структура белковых субъединиц различных лиганд-активируемых каналов обнаруживает высокую степень гомологии – от 20 до 60%. Лиганд-активируемые каналы не имеют сенсора потенциала, но имеют специальные внеклеточные домены, выступающих над поверхностью клетки и служащие для узнавания и взаимодействия с медиатором. Домены, расположенные на внутренней поверхности мембраны, служат для взаимодействия со скелетными белками и внутриклеточными модулирующими факторами. В состоянии покоя каналы ионотропных рецепторов закрыты, при взаимодействии с медиатором происходит конформационное изменение субъединиц рецептора, и канал открывается.

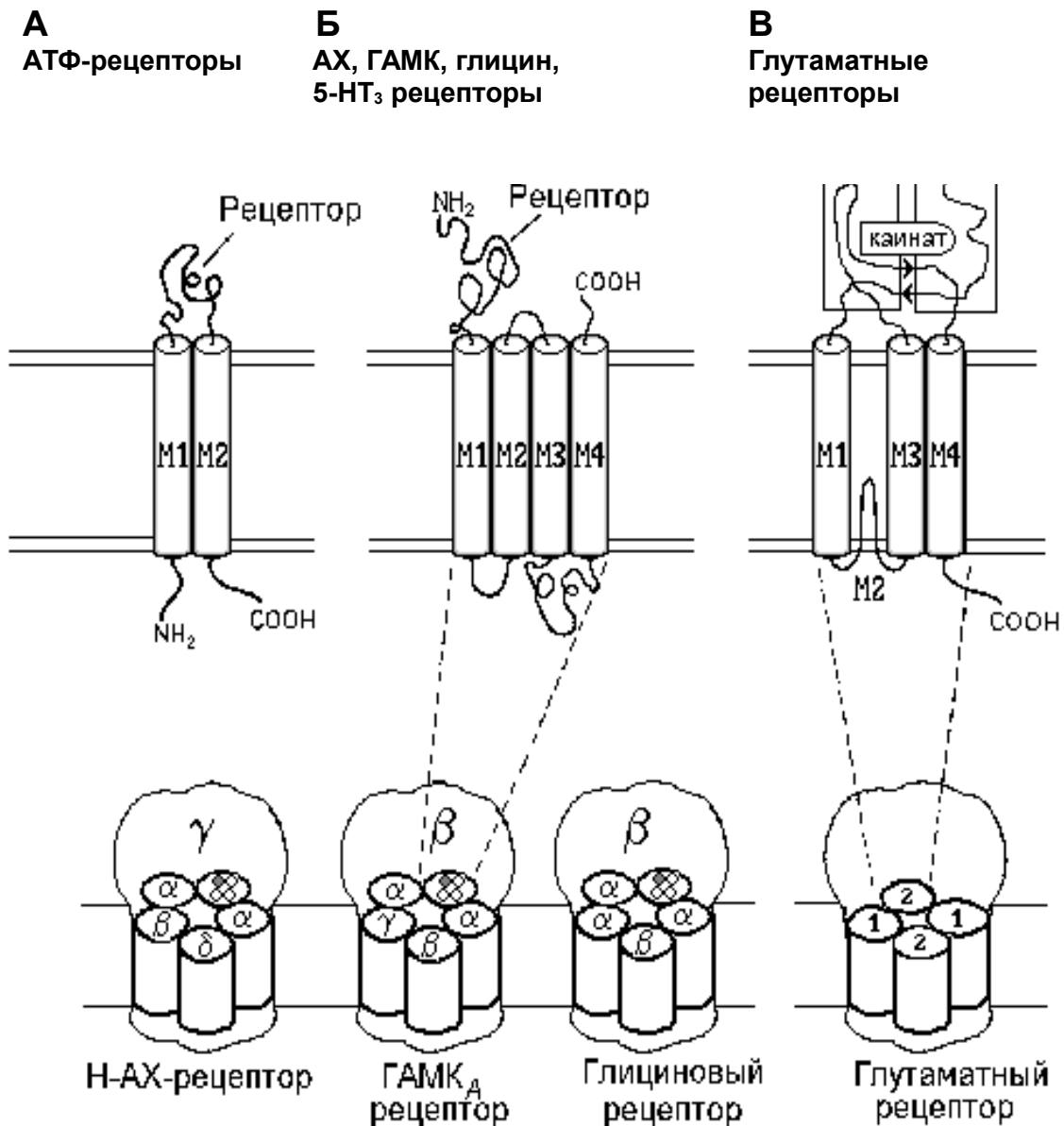


Рис.10. Три семейства лиганд-активируемых каналов.

А – Субъединица АТФ-активируемого ионного канала (пуриновый (P_{2x})-рецептор) состоит из двух мембранопроницающих доменов (M1 и M2) и большой внеклеточной петли. Б – Никотиновые АХ (Н-АХ), ГАМК_A-, глициновые и серотониновые (5-НТ₃) рецепторы представляют собой пентамеры, состоящими из нескольких типов субъединиц, каждая из которых включает 4 трансмембранных домена (M1-M4). В – Глутаматные рецепторы, являются тетрамерами, состоящими из двух типов субъединиц. Каждая субъединица состоит из трех трансмембранных доменов (M1, M3 и M4) и области (M2), формирующей внутримембранную петлю. Петля M2 образует каналную пору. Участок связывания глутамата формируется NH₂-концом и внеклеточной петлей, соединяющей M3 и M4 домены. Показано связывание субъединицы с молекулой каината, который является слабым агонистом рецепторов. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

После активации рецепторы теряют на некоторое время чувствительность к медиатору – наступает временная десенситизация (Hille B., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002). Анализ генов, кодирующих рецепторы АХ, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), серотонина (5-НТ₃) и глицина, позволил предположить, что лиганд-активируемые каналы относятся к одному семейству, несмотря на различную ионную селективность. Глутаматные рецепторы, по-видимому, образованы другим классом белков и представляют собой другое генетическое семейство лиганд-активируемых каналов (рис.10). Третье семейство лиганд-активируемых каналов образовано рецепторами к АТФ.

Трансмембранная топология АТФ-рецепторов не изучена полностью, по-видимому, субъединица канала содержат два трансмембранных домена, связанных большой внеклеточной петлей (Рис. 10) (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Образование ионных каналов. За редким исключением каждая клетка человеческого организма содержит одинаковый набор генов, количество которых составляет около 50000. 1-2 % генома человека кодирует большое семейство белков ионных каналов. Наличие тех или других видов ионных каналов в различных клетках определяются тем набором генов, который экспрессируется в конкретной клетке в данный момент времени. Многие канальные гены экспрессируются тканеспецифичным образом, тогда как другие экспрессируются повсеместно (Felix R., 2000). Активация определенного гена зависит от целого ряда вне- и внутриклеточных факторов. Регуляторные ДНК-связывающиеся белки (транскрипционные факторы), определяющие экспрессию субъединиц определенных каналов, синтезируются в цитоплазме и входят в ядро через ядерные поры.

В мозге экспрессируется больше генов по сравнению с другими органами. Показана экспрессия 200000 различных мРНК, что в 10-20 раз больше, чем, например, в почках или печени. В ядре клетки происходит образование молекул РНК (рРНК, мРНК, тРНК) на участке одной из нуклеотидных цепочек молекулы ДНК – процесс транскрипции. Молекулы РНК покидают ядро через ядерные поры, и синтез субъединиц канала происходит в цитоплазме клетки. мРНК связываются с рибосомами, которые образуют небольшие кластеры,

называемые полисомами, прикрепленные к поверхности шероховатого ЭПР. В ходе трансляции рибосомы синтезируют интегральный мембранный белок с С-концом на цитоплазматической стороне и N-концом с внутренней стороны ЭПР. При этом полипептид может иметь несколько трансмембранных областей. В ЭПР происходят модификации полипептидов – образование внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys-S-S-Cys), имеющих важное значение при формировании третичной структуры белка. Белки могут подвергаться нескольким модификациям как во время синтеза (котрансляционная), так и после (посттрансляционная). Одна из общих котрансляционных модификаций – ацилирование миристиловой группой, 14-углеродной жирной кислотой, что позволяет белку связываться с мембраной с помощью жирной кислоты. Изопренилирование – пример посттрансляционной модификации, важной для белков, связывающихся с цитозольной стороной мембраны. Некоторые посттрансляционные модификации обратимы и регулируют функцию белка. Одна из важнейших таких модификаций – фосфорилирование гидроксильной группы в остатках серина, треонина или тирозина протеинкиназами. Дефосфорилирование катализируется протеинфосфатазами. Благодаря возникновению ионных, ковалентных, водородных и гидрофобных связей между радикалами удаленных друг от друга аминокислот происходит сворачивание цепочки аминокислот строго определенным образом, формируется третичная структура белка – субъединицы канала. Синтезированный белок перемещается в комплекс Гольджи, где формируется мембранный пузырек (везикула), транспортирующий субъединицу канала к мембране клетки. Затем при слиянии везикулы с мембраной происходит встраивание отдельных канальных субъединиц в мембрану клетки, их объединение и формирование ионного канала, который фиксируется в определенном месте мембраны при помощи специальных молекул (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Многообразие ионных каналов связано не только с разнообразием генов, кодирующих определенные типы каналов, что ведет к молекулярным комбинациям мономера, но и с процессом альтернативного сплайсинга, что позволяет одному и тому же гену продуцировать множественные варианты и, следовательно, различные белковые продукты. Отсюда, в основе разнообразия

«изотипов» каналов лежит несколько генетических и молекулярных механизмов: 1) кодирование различными генами различных изотипов каналов; 2) альтернативный сплайсинг, при котором канальный пептид может кодироваться различными участками ДНК (экзонами). Транскрипция различных сочетающихся экзонов приводит к образованию изотипов каналов; 3) сочетание различных субъединиц в пределах одного подсемейства ионных каналов; 4) комбинация порообразующей субъединицы (порообразующих субъединиц) с различными вариантами вспомогательных субъединиц (Sperelakis N., 1995).

Разнообразие изотипов каналов в организме имеет большое биологическое значение. Во-первых, каждый изотип имеет различные функциональные характеристики, соответствующие определенной клетке. Во-вторых, изотипы каналов могут быть дифференциально чувствительны к внутриклеточным модуляторам, что позволяет клеточным механизмам изменять свойства специфических каналов селективно. В-третьих, наличие изотипов каналов близких по своим кинетическим характеристикам может играть роль в усилении надежности выполнения определенной клеточной функции. Не исключено также, что разнообразие изотипов каналов является следствием эволюционного приспособления к действию биологических токсинов (Meir A. et al., 1999).

Регуляция ионных каналов. Активность ионных каналов может регулироваться целым рядом факторов. Изменения потенциала мембраны будет не только активировать потенциал-активируемые каналы, а также модулировать работу и других типов ионных каналов. Каналы регулируются химическими лигандами, которые могут связываться с каналами как с вне-, так и с внутриклеточной стороны мембраны. Инактивация некоторых потенциал-активируемых каналов требует входа ионов Са. Ионы Са могут инактивировать канал либо непосредственно связываясь участком канала, либо активируя внутриклеточные ферменты, которые инактивируют канал посредством белкового дефосфорилирования. Каналы могут также регулироваться давлением или растяжением. При этом энергия, связанная с растяжением мембраны, передается к каналу по цитоскелету или непосредственно путем изменения натяжения липидного бислоя. Быстрые воротные механизмы каналов могут регулироваться долговременными изменениями метаболического статуса

клетки. Некоторые каналы чувствительны к внутриклеточному уровню АТФ, тогда как у других воротные свойства изменяются в ответ на изменение окислительно-восстановительного статуса и внеклеточного pH (Sperelakis N., 1995, Hille B., 2001). Ионные каналы являются мишенями действия целого ряда внутриклеточных посредников, которые образуются в результате активации каскадов внутриклеточных реакций. Показана модуляция кинетических свойств различных ионных каналов при действии циклических нуклеотидов, протеинкиназ, газообразных посредников, арахидоновой кислоты и ее метаболитов и других жирных кислот (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

2. Методы исследования ионных каналов

Для исследования ионных каналов в возбудимых тканях применяются разнообразные электрофизиологические, биохимические, фармакологические, генетические и др. методы.

Электрофизиологические методы

Регистрация интегральных токов и потенциалов. Движение ионов через огромное количество различных ионных каналов мембраны формирует интегральный трансмембранный ток, который вызывает перераспределение зарядов на мембране и изменения потенциала. При этом возможна регистрация либо изменений потенциала на мембране в результате протекания токов, либо регистрация токов, текущих через мембрану. Электрофизиологические методы регистрации потенциалов и токов, текущих через мембрану возбудимой клетки, можно условно разделить на **внутри- и внеклеточные**. Для этого обычно используются металлические электроды или стеклянные микропипетки (микроэлектроды).

Внутриклеточная регистрация. В 1939 году А.Ходжкин и А.Хаксли впервые измерили разность потенциалов и ПД на мембране животной клетки с использованием тонкого металлического неполяризующегося электрода, введенного в гигантский аксон кальмара (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1945).

В этих экспериментах электрод вводился в нервное волокно со стороны среза нерва до неповрежденных участков аксона, индифферентный электрод находился в окружающем растворе. В этой ситуации проводилась регистрация напряжения между аксоплазмой волокна и внешним омывающим раствором. После приложения электрического раздражения внутриклеточный электрод регистрировал быстрое колебание напряжения – ПД, состоящий из фазы деполяризации - увеличение потенциала от потенциала покоя (-70 мВ) до +30-+40 мВ - и фазы реполяризации - возвращение потенциала к исходному уровню. Данный метод позволяет судить о функции каналов только косвенно по изменениям формы ПД (Hodgkin A. L., Huxley A. F., 1945, 1952 а, б, Николс Дж. Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Использовать вышеописанный метод можно только на очень крупных объектах (гигантские аксоны). Применение внутриклеточного отведения для исследования нейронов и мышечных клеток стало возможным с введением в практику электрофизиологического эксперимента **стеклянных микроэлектродов**, предложенных Джерардом и Лингом в 1946 году (Ling G, Gerard R.W., 1949). Этот метод, кроме точного измерения МП покоя клетки, обеспечил регистрацию ПД, а также синаптических и рецепторных сигналов. Метод **внутриклеточной микроэлектродной регистрации** МП проиллюстрирован на рис. 11. Стеклообразный микроэлектрод (микропипетка) с диаметром кончика около 0.5 мкм, заполненный концентрированным солевым раствором (например, КСl), подводится к клетке, второй электрод помещается во внеклеточную жидкость.

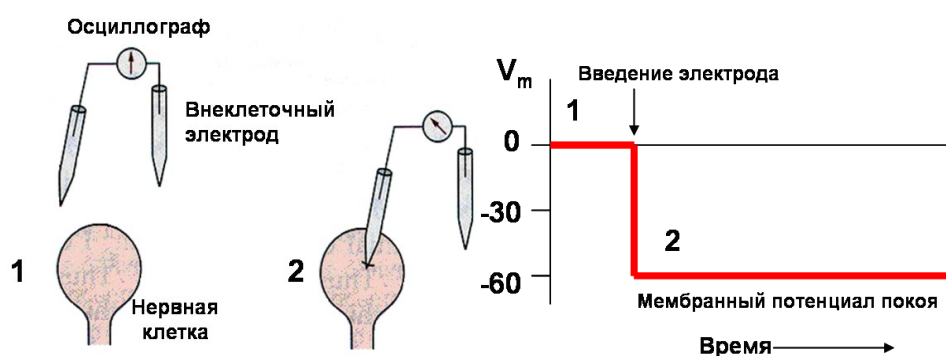


Рис 11. Регистрация мембранного потенциала при помощи стеклянных микроэлектродов.

1- оба электрода находятся во внеклеточном растворе. 2 - один электрод вкалывается в клетку. Справа показано, что введение микроэлектрода в клетку приводит к смещению регистрируемого потенциала в сторону отрицательных значений. МП покоя в данном случае равен -60 мВ. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

Оба электрода присоединяются к усилителю и осциллографу для регистрации потенциала. В момент прокалывания микроэлектродом клеточной мембраны осциллограф регистрирует появление отрицательного потенциала, соответствующего МП покоя (рис. 11).

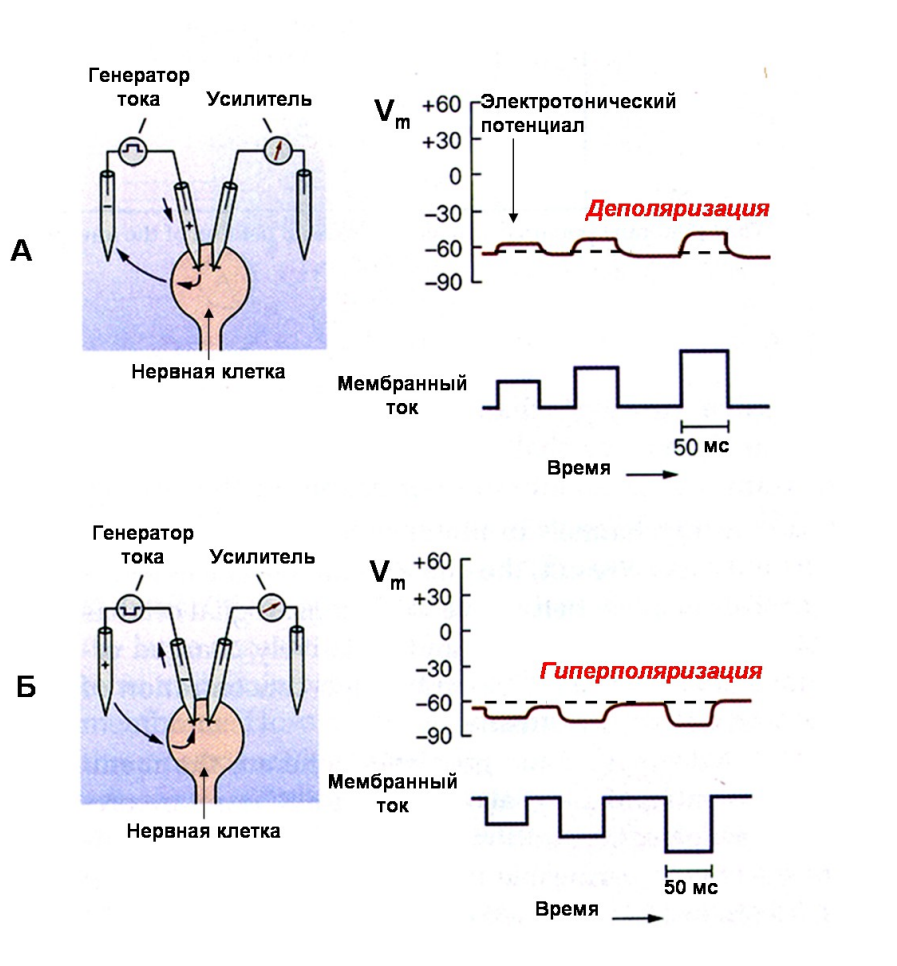


Рис 12. Изменения мембранного потенциала при пропускании электрического тока.

А - Один внутриклеточный микроэлектрод введен в клетку и регистрирует МП покоя. Другой внутриклеточный микроэлектрод также введен в клетку и служит для пропускания слабых кратковременных толчков тока от генератора. Если пропускаемый ток имеет входящее направление, то за счет перераспределения зарядов на мембране МП клетки уменьшается (деполяризация). Величина деполяризации зависит от силы тока, а возникающий потенциал называется электротоническим потенциалом. Б - Аналогичная схема, но пропускаемый ток имеет выходящее направление. В этом случае МП увеличивается (гиперполяризация). (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

С помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов возможно регистрировать изменения МП при пропускании электрического тока через мембрану с помощью второй пары электродов, подсоединенных к источнику тока (рис. 12). При пропускании электрического тока выходящего направления происходит уменьшение заряда на мембране и снижение МП - **деполяризация**. Изменение направления пропускаемого тока ведет к увеличению отрицательного заряда на внутренней поверхности мембраны - **гиперполяризации**. В естественных условиях деполяризация или гиперполяризация мембраны возбудимых клеток возникает при открытии потенциал-активируемых или лиганд-активируемых ионных каналов. Так, открытие Na- или Ca-каналов и поступление положительно заряженных ионов в клетку будет приводить к деполяризации. Открытие K-каналов и выход положительно заряженных ионов K из клетки вызовет гиперполяризацию. Открытие Cl-каналов нервных клеток обычно сопровождается поступлением отрицательно заряженных ионов Cl в цитоплазму и вызывает гиперполяризацию мембраны.

Метод фиксации мембранного потенциала. Вышеописанные методы внутриклеточной регистрации не позволяют регистрировать ионные токи, текущие через мембрану возбудимой клетки. Дело в том, что при изучении ионных токов исследователь сталкивается с очень сложной проблемой. Протекание тока через мембрану за счет перераспределения зарядов приводит к изменению МП, а изменение потенциала сказывается на величине протекающих токов. Для анализа и разделения мембранных токов в начале 50-х годов прошлого века Коулом, Ходжкиным и Хаксли (Cole K. S., 1949, Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B., 1952) был предложен революционный метод **фиксации потенциала** (voltage clamp), который позволяет поддерживать МП на определенном уровне при помощи усилителя обратной связи. Метод дает информацию о величине и кинетике ионных токов при заданном значении МП. Авторы вводили в гигантский аксон кальмара не один, а два электрода, один из которых служил для регистрации МП, а второй – для подачи импульсов стимулирующего тока. МП клетки искусственно смещался до определенного уровня, а специальный усилитель обратной связи поддерживал его на заданном уровне (рис. 13). Ток, поддерживающий МП на постоянном уровне, являлся

отражением ионных токов, протекающих через мембрану. Аналогичный метод с использованием двух стеклянных внутриклеточных микроэлектродов был применен для анализа ионных токов в нейронах и постсинаптических сигналов в мышечных волокнах (рис. 13).

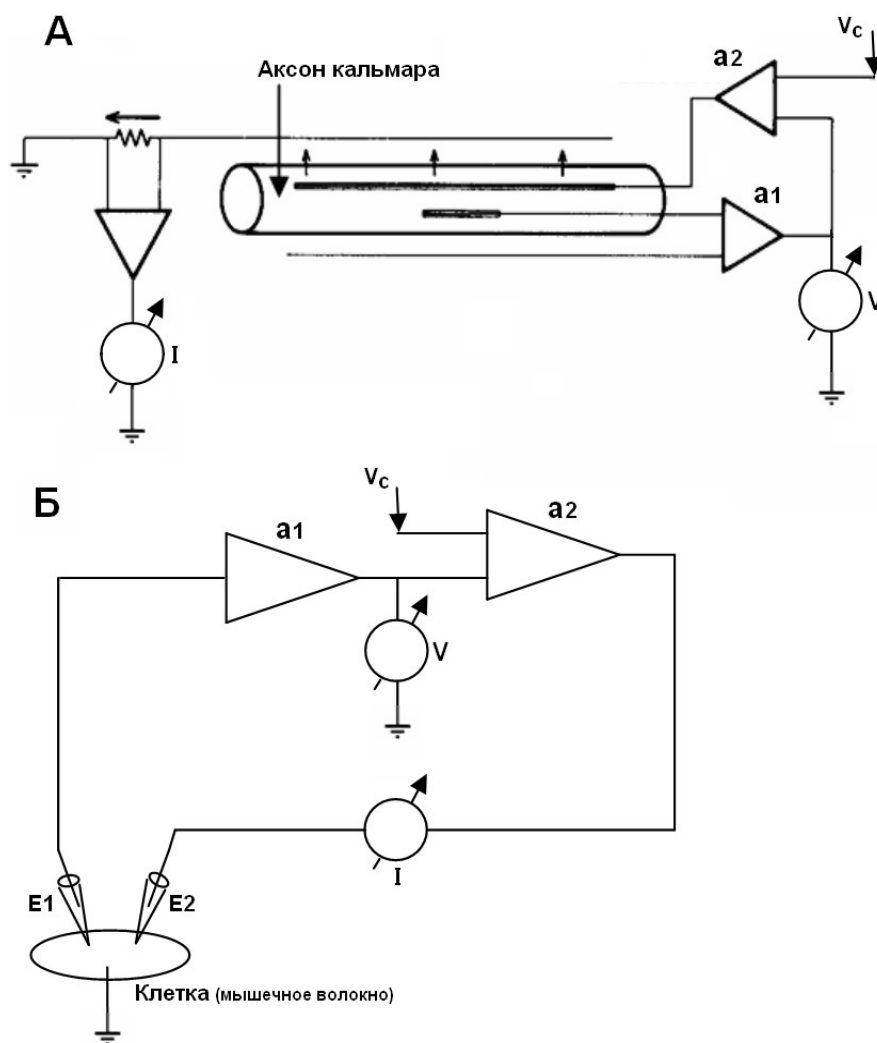


Рис. 13. Метод фиксации мембранного потенциала.

А – с использованием металлических электродов, введенных в гигантский аксон кальмара, Б – с использованием двух микроэлектродов, введенных в отдельную клетку на примере мышечного волокна. $a1$ – усилитель, $a2$ – усилитель обратной связи, V_c – смещение мембранного потенциала, V – регистрация мембранного потенциала (мВ), I – регистрация мембранного тока (нА), $E1$ – отводящий электрод, $E2$ – токовый электрод.

Однако, применить метод внутриклеточной микроэлектродной регистрации электрических сигналов удается не всегда. Если размеры объекта исследования составляют несколько микрометров, то внутриклеточный микроэлектрод вызывает серьезные повреждения клетки с ее быстрой гибелью. Поэтому для изучения электрогенеза мелких клеток и нервных окончаний нейронов достаточно широко используется **внеклеточная или фокальная регистрация**. Наиболее часто такой метод регистрации используется для исследования двигательных нервных окончаний, образующих синаптические контакты с мышечными волокнами скелетных мышц. При этом регистрация ведется от небольшого участка мембраны, ограниченного размерами кончика регистрирующего электрода. Внеклеточно регистрируемый сигнал является падением напряжения на изолирующем сопротивлении электрода, которое пропорционально току, протекающему через участок мембраны нервного окончания под электродом (Brigant J.L., Mallart A., 1982, Mallart A., Brigant J.L., 1982, Зефирова А.Л., Халилов И.А., 1985, 1987). Принципиальная схема внеклеточного отведения приведена на рисунке 14.

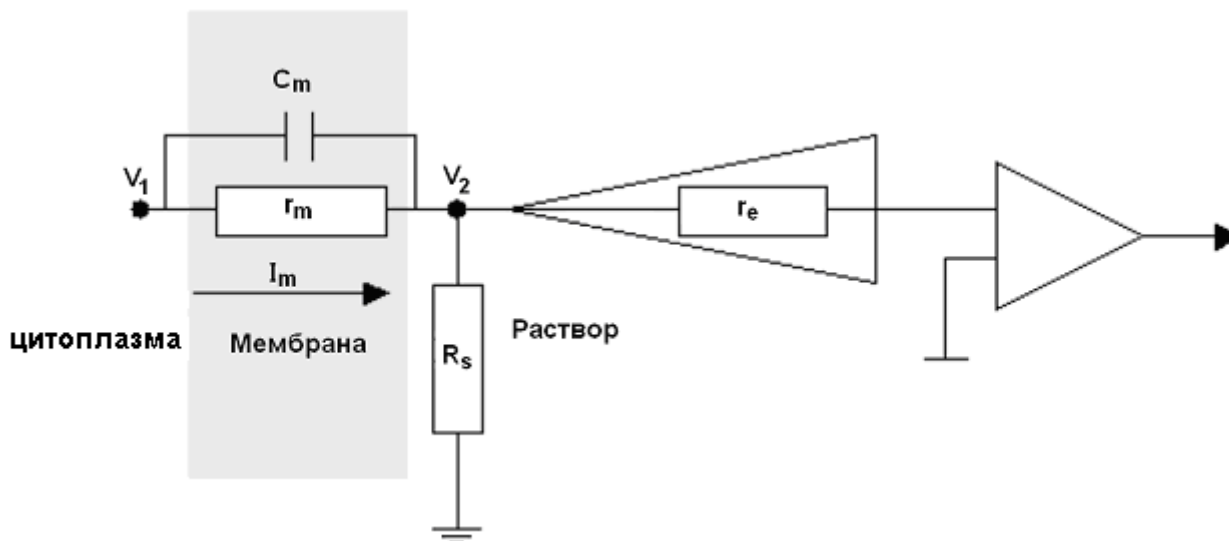


Рис. 14. Внеклеточное отведение электрических сигналов.

V_1 – потенциал на внутренней стороне мембраны, V_2 – потенциал на внешней стороне мембраны, C_m – ёмкость мембраны, r_m – сопротивление мембраны, I_m – ток, текущий через мембрану, R_s – шунтирующее сопротивление, r_e – сопротивление электрода.

Амплитуда регистрируемого ответа часто соизмерима с шумом, поэтому на практике производят усреднение регистрируемой кривой для выявления фокального ответа мембраны. Вариантом фокального отведения является **периневральное отведение** (Gundersen C.B., Katz B., Miledi R., 1982; Mallart A, 1985 б; Penner R., Dreyer F., 1986), при котором удается регистрировать сигналы гораздо большей амплитуды, чем при фокальном. Особенности этого метода будут рассмотрены ниже в специальном разделе.

Измерение токов одиночного канала. Для измерения ионных токов через одиночные каналы был разработан специальный метод, который получил название *пэтч-кламп (patch-clamp)* (рис. 15) (Neher E., Sakmann B., 1992). Метод пэтч-кламп был введен в исследовательскую практику Неером и Сакманом. В 1976 г. ими была опубликована статья в журнале “Nature”, которая называлась “Токи через одиночные каналы в мембране волокна денервированной мышцы лягушки” (Neher E.; Sakmann B., 1976). Для пэтч-кламп регистрации необходимо, чтобы кончик стеклянной пипетки с внутренним диаметром около 1 мкм плотно контактировал с мембраной исследуемой клетки. При удачном подведении, благодаря легкому присасыванию между клеточной мембраной и стеклом пипетки создается сопротивление больше 10^9 Ом (отсюда возник термин «гигаомный контакт»). Если пипетка соединена с усилителем и осциллографом, то регистрируются небольшие токи, проходящие через участок мембраны, находящийся внутри кончика пипетки. Такая конфигурация пэтч-кламп метода называется *cell-attached* (контакт с клеткой). Достигнув контакта с клеткой, можно, отводя электрод, оттянуть участок мембраны и оторвать его для формирования *inside-out* (внутренняя сторона наружу) конфигурации. В последнем случае цитоплазматическая сторона мембраны будет обращена к перфузионному раствору. Кроме этого, из конфигурации *cell-attached* с помощью небольшого дополнительного присасывания можно прорвать участок мембраны расположенный внутри регистрирующего электрода, обеспечив контакт последнего с цитоплазмой клетки. В этих условиях будут регистрироваться токи в конфигурации *whole-cell* (целая клетка). И, наконец, после получения конфигурации «целая клетка», можно оттянуть электрод от клетки, сформировав из мембраны сначала тонкую перемычку, а затем, после отделения

этого участка, получить конфигурацию outside-out (наружная сторона наружу). Каждая из этих конфигураций имеет свои преимущества, их использование зависит от типа изучаемого ионного канала и той информации, которую мы хотим получить в данном эксперименте.

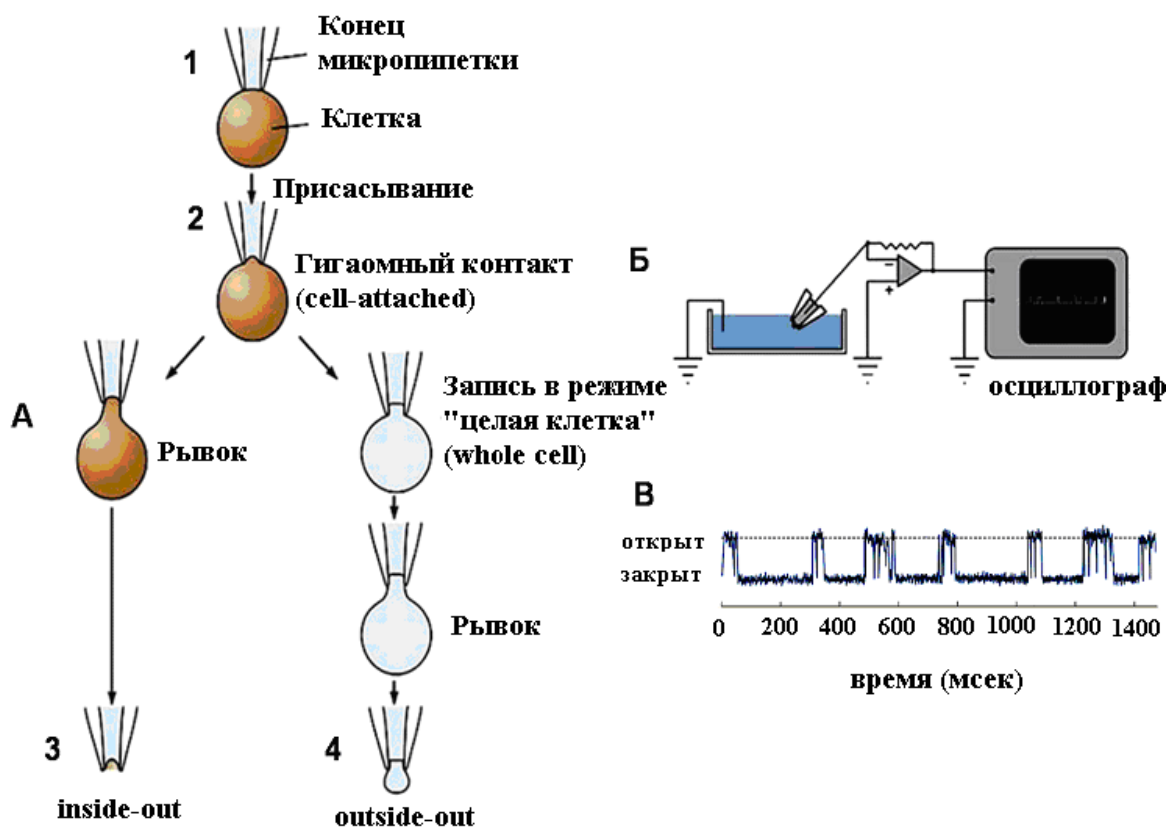


Рис. 15. Регистрация ионных токов через одиночные каналы методом пэтч-кламп.

А - Принцип метода. Тонкая стеклянная пипетка образует плотный контакт с мембраной (1), который благодаря легкому понижению давления превращается в гигаомный контакт (2). Оттягивание мембраны с последующим отрывом ее фрагмента приводит к конфигурации inside-out (3). Другой вариант основан на последовательном образовании конфигурации «whole cell» (целая клетка) и затем — «outside-out» (4). Б - Регистрация токов отдельных ионных каналов. Пипетка с участком мембраны клетки помещается в раствор. Токи, текущие через одиночный канал усиливаются и регистрируются с помощью осциллографа. В - Пример токов одиночных ионных каналов, зарегистрированных методом пэтч-кламп. Видно, что каналы быстро открываются и закрываются. Время открытого состояния канала колеблется

вокруг определенного среднего значения. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

При использовании пэтч-кламп метода регистрируемые события состоят из прямоугольных токовых сигналов, отражающих процессы открытия и закрытия каналов (рис. 15). Пэтч-кламп метод предоставляет новые уникальные возможности для изучения поведения ионных каналов. Во-первых, изоляция маленького участка мембраны позволяет наблюдать активность всего нескольких ионных каналов, а не тысяч, которые активируются в целой клетке. Во-вторых, высокое сопротивление контакта дает возможность регистрировать даже крайне малые токи. В результате мы имеем возможность точного измерения величины токов одиночных ионных каналов и анализа кинетики их работы. Метод позволяет менять потенциал на мембране, варьировать ионный состав как с наружной, так и внутренней поверхности мембраны, использовать разнообразные фармакологические подходы для исследования свойств канала. Вышеуказанный метод широко используется для регистрации мембранных ионных токов в возбудимых клетках. Однако, необходимым условием его применения является возможность подхода к мембране и достаточно большие размеры клетки. Если возбудимая структура покрыта соединительной тканью, миелиновой оболочкой или имеет размеры в несколько микрометров, то использование этого метода становится невозможным. В этом случае применяют другие электрофизиологические методы.

Естественно, выбор электрофизиологического метода исследования каналов возбудимых структур связан с их размерами и возможностями подхода к мембране. Отсюда внутри- и внеклеточное отведение используется обычно на крупных синапсах (гигантский синапс кальмара, двигательные нервные окончания), а метод пэтч-кламп - на нейронах ЦНС и в культуре клеток.

Математическое описание ионных токов плазматической мембраны

Достаточно часто для исследования ионных токов и потенциалов в возбудимых клетках используются методы математического моделирования, которые позволяют вскрыть не всегда доступные для анализа в эксперименте свойства ионных каналов. Существует два подхода в описании транспорта ионов - *дискретный* (Cole K.S., 1955), основанный на предположении, что частицы преодолевают мембрану с помощью нескольких переходов через «потенциальные ямы» с определенной скоростью, и *непрерывный* (Hodgkin A. L., Huxley A.F., 1952 б, Ходоров Б.И., 1975), основанный на теории свободной электродиффузии и миграции частиц в однородной мембране. Для большинства нервных клеток описание ионного тока каналов основывается на уравнении электрохимической диффузии Нернста-Планка, решенном в приближении постоянного поля, - уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца.

Для реконструкции ионных токов гигантского аксона кальмара Ходжкин и Хаксли (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 б) использовали закон Ома для замкнутой цепи. С учетом потенциал-зависимых воротных механизмов каналов с помощью уравнений Ходжкина и Хаксли можно получить ионные токи мембраны (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 б; Dodge F.A., Frakenhaeuser B., 1959). Авторы на основе работ с нейротоксинами и блокаторами ионных каналов сделали вывод об отсутствии взаимодействия различных транспортных систем для различных ионов друг с другом (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 б), что позволило представить общий ионный ток мембраны в виде суммы ионных токов. В общем виде, ток через канал описывается следующим уравнением:

$$I_j = g_j (V - V_j),$$

где I_j - ионный ток, j - тип ионов, g_j - проводимость мембраны для них, V_j - равновесный потенциал, V – потенциал мембраны. Проводимость с учетом потенциал-зависимых воротных механизмов выражается в следующем виде:

$$g_j = \bar{g}_j m^k n^l,$$

где \bar{g}_j - максимальная проводимость для j типа ионов, m^k и n^l - описывают инактивационный и активационный воротные механизмы ионного канала или, другими словами, вероятность открытого состояния канала. Так как

вероятность открытого состояния - это отношение количества открытых каналов к общему числу каналов, а максимальная проводимость - это произведение общего числа каналов на проводимость единичного канала, то, в принципе, g_j - есть проводимость открытых каналов j типа в сегменте мембраны.

Схема хорошо работает в условиях гигантского аксона кальмара, но не вполне приемлема в случае миелинизированных нервных волокон. В перехватах Ранвье изменение Na-тока в начальные периоды развития деполяризации является нелинейным в отличие от тока ионов Na в мембране гигантского аксона кальмара. Поэтому Dodge и Frankenhaeuser (1959) применили для описания кинетики ионных токов уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца:

$$I_j = P_j \frac{EF}{RT} \frac{[j]_i - [j]_o \exp\left(\frac{EF}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{EF}{RT}\right)},$$

$$P_j = \bar{P}_j m^k n^l,$$

где P_j - ионная проницаемость мембраны, которая определяется физическими свойствами мембраны и не зависит от содержания ионов в окружающих растворах. Воротные механизмы описываются релаксационными уравнениями типа:

$$\frac{dY(t)}{dt} = (1 - Y(t))a_V(V) - Yb_V(V),$$

в которых коэффициенты a , b - зависят только от потенциала. Путем фиксации напряжения на мембране и разделения ионных токов Ходжкин и Хаксли нашли соответствующий вид зависимости коэффициентов a , b в этих уравнениях от потенциала.

Уравнения Ходжкина и Хаксли широко применяется для описания распространения возбуждения по нервным волокнам. При этом волокно представляется в виде полой трубки, заполненной электролитом. Стенка этой трубки - плазматическая мембрана, которая представляется состоящей из отдельных сегментов с цилиндрической симметрией, обладающих тем или иным набором ионных проводимостей. Кроме этого в модели учитывают пассивные свойства волокна - сопротивление и емкость. Общий мембранный

ток сегмента равен сумме емкостного и ионного токов, и может быть описан дифференциальным уравнением:

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + \sum_i I_i,$$

где C - емкость мембраны, I_i - ионный ток.

В результате можно получить изменение потенциала сегмента мембраны и вызывающие его токи. Для реконструкции распространения возбуждения мембрану представляют в виде параллельно соединенных генераторов ПД и емкостей сегментов мембраны. Согласно правилу Кирхгофа - сумма токов в узле равна нулю - можно вывести балансное уравнение токов для каждого места соединения генераторов. Учитывая, что I_m будет равен сумме втекающих из возбужденных и утекающих в покоящиеся участки мембраны токов, то математическая форма уравнения, описывающего процесс распространения возбуждения, выражается в виде уравнения теплопроводности (неоднородное гиперболическое дифференциальное уравнение):

$$\frac{\partial}{\partial x} \frac{\partial V}{\partial x^2} = C \frac{\partial V}{\partial t} + \sum_i I_i,$$

где V - потенциал относительно МП покоя, a - радиус волокна, R_i - удельное сопротивление аксоплазмы, C - емкость единицы поверхности мембраны, I_i - суммарный ионный трансмембранный поток.

Решения этого уравнения в аналитическом виде не существует из-за сложности функции, описывающей суммарный ионный поток I_i , но с помощью различных методов численного интегрирования был рассчитан распространяющийся ПД в однородном нервном волокне (Cole K.S., 1955).

Биохимические и генетические методы исследования ионных каналов

Для исследования молекулярной структуры ионных каналов используются биохимические подходы, которые заключаются в выделении каналов из мембран и исследовании выделенных молекул с помощью физических и химических методов. Для повышения степени очистки канальных белков используют меченые нейротоксины к определенным типам каналов. Этот подход дает информацию о размере, химической структуре белков канала,

однако, имеет ограничения, которые частично снимаются применением методов, позволяющих идентифицировать последовательности ДНК, кодирующих канальные пептиды. Использование методов генной инженерии (технологий рекомбинантных ДНК) позволяет очень точно исследовать структуру и функцию каналов. Любой участок ДНК клетки может быть выделен при помощи нуклеаз и помещен в самокопирующийся генетический элемент для производства «геномного ДНК клона» (кДНК). Копия ДНК в виде мРНК молекулы, кодирующей определенную субъединицу ионного канала, может быть введена в клетку, в которой происходит синтез белков ионного канала и встраивание их в мембрану. Структура канала может быть изменена сайт-направленным мутагенезом. Для осуществления этой методики необходимо сконструировать кДНК с мутациями, меняющими какой-либо участок белка ионного канала. Это приводит к тому, что выбранные аминокислоты с присущими им физико-химическими свойствами (положительным или отрицательным зарядом, или неполярные) заменяются другими аминокислотами с отличающимися свойствами. Основной техникой сопоставления функции канала и его структуры является экспрессия ионных каналов в ооцитах *Xenopus* или в других клетках после проведения инъекции соответствующей мРНК или трансфекции ДНК. После этой процедуры можно производить запись электрических сигналов либо от фрагментов мембраны, содержащих одиночные каналы, либо регистрировать токи целой клетки, отображающие поведение всей популяции экспрессированных каналов. Таким образом, технология рекомбинантных ДНК дает возможность экспериментатору изменять структуру ионных каналов с последующим их электрофизиологическим исследованием (Sperelakis N., 1995, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Фармакологические методы

Фармакологические методы связаны с использованием природных и синтетических соединений, модулирующих работу ионных каналов. Это могут быть токсины животных и растений, блокирующие работу канала или влияющие на воротные свойства канала, что позволяет выявить роль тех или иных структурных элементов канала в его функциях. Так, например, некоторые

токсины блокируют ионную проводимость Na-каналов. К ним относят тетродотоксин, содержащийся в яичниках и других органах рыбы фугу, и сакситоксин, синтезирующийся морским планктоном. Другая группа растительных токсинов, к которым относятся вератридин, аконитин и грайянотоксин, вызывают постоянную активацию Na-каналов, что связано со сдвигом потенциал-зависимости активации канала к более отрицательным значениям МП покоя или блокированием быстрой инактивации (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002).

Потенциал-активируемые К-каналы эффективно блокируются тетраэтиламонием (ТЭА), 4-аминопиридином (4-АП) и диаминопиридином. Блокаторами Ca-каналов являются многие двухвалентные катионы (ионы кобальта, никеля, кадмия и др.), производные дигидропиридинов, фенилалкиламинов, бензодиазепинов и ряд природных токсинов, таких как токсин морской змеи *Conus Geographus* - ω -конотоксином GVIA, яд воронковых пауков, пептидный токсин FTX и др. Более детально фармакологические походы изложены ниже при описании отдельных ионных каналов.

Ультраструктурные методы

Для определения локализации, плотности и распределения ионных каналов используются методы электронной микроскопии, иммуноцитохимии, методы флуоресцентной микроскопии, в том числе с использованием моноклональных антител. Приведем пример таких исследований, касающийся Ca-каналов двигательных нервных окончаний. При исследовании ультраструктуры нервно-мышечных соединений лягушки с помощью электронной микроскопии в области активных зон (специфические места пресинаптической мембраны, в которых происходит экзоцитоз синаптических везикул и секреция медиатора) были обнаружены крупные внутримембранные частицы, видимые на сколах замороженных нервных окончаний. Было предположено, что они являются Ca-каналами (Heuser J.E., Reese T.S., Landis D.M., 1974, Ceccarelli B., Gronovaz F., Hurlbut W.P., 1979a, б, Heuser J.E., Reese T.S., 1981, Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K., 1981, Pumpllin D.W., Reese T.S., Llinas R., 1981). Это предположение было подтверждено после открытия факта, что ω -конотоксин GVIA необратимо блокирует потенциал-активируемые Ca-

каналы в моторных нервных терминалях лягушки (Cruz L.J., Johnson D.S., Olivera V.M., 1987, Hong S.J., Chang C.C., 1989). Флуоресцентные производные токсина специфически окрашивали места, где концентрировались крупные внутримембранные частицы (Cohen M. W., Jones O.T., Angelides K.J., 1991). Пресинаптические Са-каналы в нервно-мышечном соединении были также локализованы с помощью поликлональных антител против синтетического ω -конотоксина. Антитела связывались с ω -конотоксин-канальными комплексами и были локализованы с помощью иммунофлуоресценции (Torri-Tarelli F., Passafaro M., Clementi F., Sher E., 1991). При удалении нервной терминали от концевой пластинки после обработки коллагеназой, мышечные волокна окрашивались α -бунгаротоксином (блокатор постсинаптических холинорецепторов), но не ω -конотоксином, что подтверждало пресинаптическую локализацию Са-каналов. Интересно, что ω -конотоксиновая иммунореактивность выглядела как регулярные параллельные полосы на расстоянии 1 мкм друг от друга, которые были перпендикулярны оси нервной терминали и полностью соответствовали топографии активных зон (Robitaille et al., 1990) (Рис. 16).

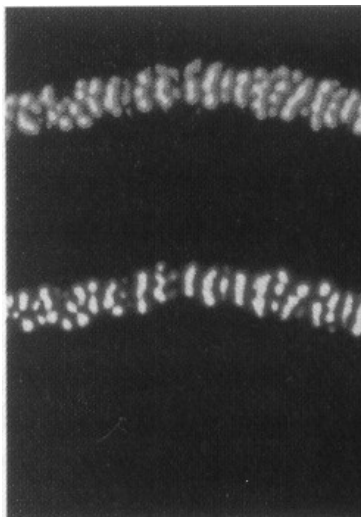


Рис. 16. Локализация пресинаптических Са-каналов и постсинаптических ацетилхолинорецепторов в нервно-мышечном синапсе лягушки.

Флуоресцентная картина пресинаптических Са-каналов, полученная с помощью поликлональных антител против синтетического ω -конотоксина (вверху), и постсинаптических холинорецепторов концевой пластинки меченых α -бунгаротоксином (внизу). (Из Robitaille et al., 1990).

Флуоресцентные методы широко применяются и для исследования изменений внутриклеточной концентрации кальция с использованием внутриклеточных кальциевых индикаторов (Van Der Kloot W., Molgo J., 1994).

Исследования ионных каналов с помощью потенциал-чувствительных красителей

Изменения МП и, следовательно, активность ионных каналов, можно регистрировать с помощью потенциал-чувствительных красителей, спектральные характеристики которых меняются в ответ на изменения потенциала (рис. 17). С помощью таких красителей возможно зарегистрировать место возникновения ПД, направление и скорость распространения ПД. Потенциал-чувствительные красители используют для анализа электрической активности клеток и внутриклеточных структур, в которых ПД невозможно зарегистрировать с помощью микроэлектродов, в многоклеточных препаратах, а также для измерения пространственных и временных параметров изменения МП. Широко используются такие потенциал-чувствительные красители, как di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, RH237, созданные на основе аминафталилэтилпиридиниума (ANEP). ANNINE-6plus – это один из последних красителей, имеющий короткое время ответа (нсек) и высокую чувствительность (Bu G. et al., 2009).

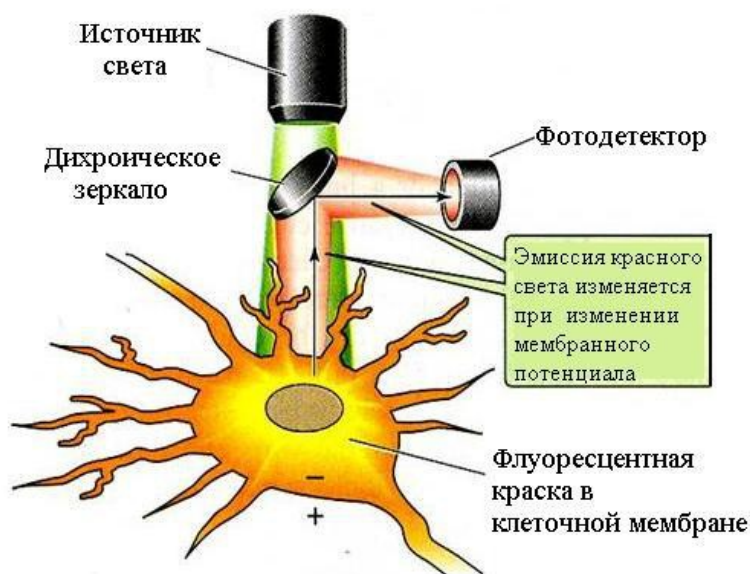


Рис. 17. Схема оптической регистрации изменений мембранного потенциала в изолированном нейроне с помощью потенциал-чувствительного красителя.

Рентгенокристаллографический метод

Использование метода рентгенокристаллографии совместно с биохимическими, генетическими, электрофизиологическими методами позволило выявить принципы структуры и функционирования канальных белков. Рентгенокристаллографический метод позволяет оценить трехмерную структуру ионного канала. Этот метод стал только недавно использоваться для структурного анализа каналов, так как они содержат трансмембранные гидрофобные домены, что затрудняет их кристаллизацию. Мак-Киннон и его коллеги впервые проанализировали молекулярную структуру ионного канала с помощью рентгенокристаллографического метода с высоким разрешением на примере бактериального К-канала, относящегося к семейству К-каналов входящего выпрямления (Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A. et al., 1998) (Рис.18).

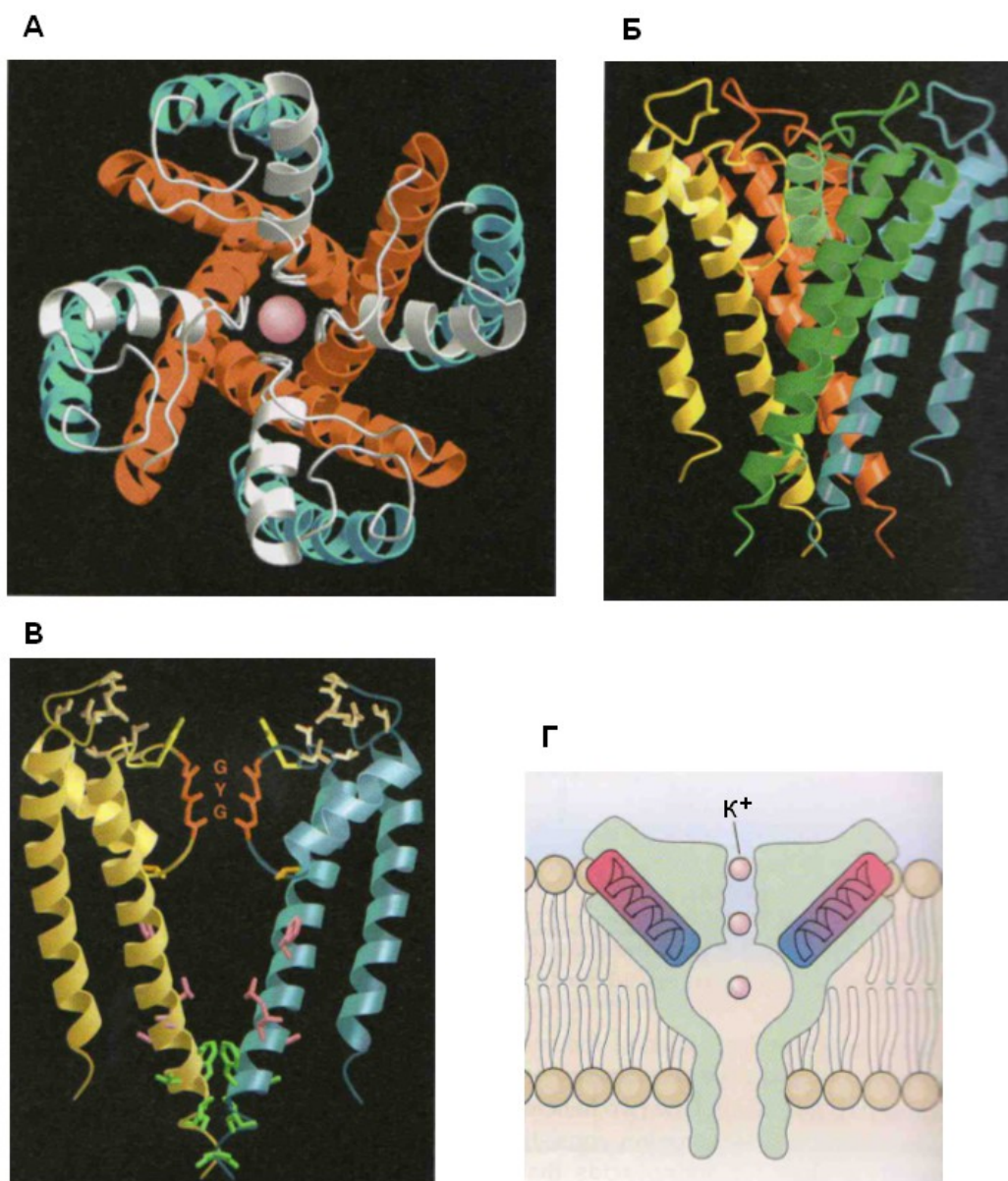


Рис. 18. Структура калиевого канала, полученная с помощью рентгенокристаллического метода

А - Вид на канал с внешней стороны мембраны. Каждая из четырех субъединиц имеет две длинных мембранопроникающих спирали (голубого и красного цветов). Область поры (Р) (показана белым) состоит из короткой спирали и петли, формирующей селективный фильтр канала. В середине поры показан ион К. Б – Вид на канал сбоку, разными цветами показаны четыре субъединицы. В - Вид на канал сбоку, показаны две из четырех субъединиц, селективный фильтр (показан красным цветом) образован карбоксильными группами трех остатков аминокислот – глицин (G), тирозин (Y) и глицин (G). Г – Схема канала в мембране, иллюстрирующая три калий-связывающих сайта внутри канала. Спирали поры образуют отрицательный диполь, который помогает стабилизировать ион К внутри поры. (Из Doyle D.A. et al., 1998 с изменениями).

Преимуществом этих каналов является относительно небольшой размер и простая трансмембранная топология. Проведенный анализ трехмерной структуры канала показал, что канал образован четырьмя идентичными субъединицами, окружающими центральную пору (Рис. 18 А). Каждая субъединица состоит из двух трансмембранных участков, соединяющихся петлей – областью Р, которая формирует селективный фильтр канала (Рис. 18 Б). Четыре внутренних сегмента каждой субъединицы образуют область поры с цитоплазматического конца. Форма и структура поры определяет ион-проводящие свойства. Внутреннее и внешнее устья поры выстланы кислыми аминокислотами, чьи отрицательные заряды притягивают катионы из внеклеточной среды.

Наиболее узкий участок поры формирует селективный фильтр, который ограничивает скорость прохождения ионов. Селективный фильтр образован тремя карбонильными атомами белкового скелета каждой из четырех субъединиц, отрицательный заряд которых обеспечивает полярное окружение для ионов К, проходящих через канал (Jiang Y. et al. 2003) (Рис.18 В). Рентгенокристаллографический анализ показал, что с порой канала могут связываться три иона К, один из которых находится в широкой внутренней полости, и до двух ионов К могут занимать селективный фильтр в одно и тоже время (Рис.18 Г) (Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V et al., 2003).

3. Строение и функциональные свойства различных типов ионных каналов

3.1. Натриевые каналы

Эти каналы обнаружены практически во всех возбудимых и многих невозбудимых клетках. В возбудимых клетках потенциал-активируемые Na-каналы участвуют в формировании ПД и обеспечивают достаточно высокую скорость распространения ПД по мембране (Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш, 1996, 1997). Самая высокая плотность Na-каналов определяется в перехватах Ранвье миелинизированных нервных волокон, более низкая - в мембранах сомы нервной клетки, нервных окончаний, мышечных и эндокринных клеток. В пресинаптических структурах Na-каналы, участвуя в формировании ПД, регулируют количество входящих ионов Са и, соответственно, количество

освобождаемых квантов медиатора (Katz B., Miledi R., 1967 б), а также синхронизируют секрецию медиатора во времени.

Детальный анализ функционирования потенциал-активируемых Na-каналов методами фиксации потенциала на гигантских аксонах беспозвоночных и миелинизированных нервных волокнах позвоночных животных привел к созданию модели работы Na-канала (Armstrong C.M., 1981, Hille B., 2001). Воротный механизм Na-канала характеризуется 4 процессами: активация при деполяризации, инактивация при длительной деполяризации, деактивация после реполяризации и реактивация канала при его выходе из инактивированного состояния. Na-каналы закрыты при нормальных значениях МП покоя и открываются на очень короткое время (1 мс и менее) при деполяризации. Проводимость одиночного канала мала и не превышает 10 пСм (Armstrong C.M., 1981). Показано, что Na-каналы фосфорилируются протеинкиназами А и С, что приводит к уменьшению их проводимости без существенного изменения потенциал-зависимости активации и инактивации (Costa M.R., Catterall W.A., 1984 а, б).

Кроме основной роли в генерации и проведении ПД Na-каналы принимают участие в создании определенной внутриклеточной концентрации ионов Na, которая влияет на внутриклеточную концентрацию ионов Ca через работу Na/Ca обменника. Поэтому увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na вызывает значительное усиление секреции медиатора (Duarte C. B., Ferreira I. L., Carvalho A. P., Carvalho C. M., 1993, Zucker R. S., 1993).

Структура Na-каналов. Первым шагом в выявлении структуры Na-каналов было выделение канальных молекул с использованием нейротоксинов, специфически связывающихся с каналом. В результате были выделены три субъединицы, которые присутствуют в равных пропорциях в Na-канале: одна представляет собой большой гликопротеин с молекулярной массой 280 кДа ($\alpha 1$) и два малых полипептида с молекулярными массами 36 кДа ($\beta 1$) и 33 кДа ($\beta 2$) (Catterall W.A., 2000). $\alpha 1$ -субъединица является основной и универсальной, тогда как малые субъединицы различаются в разных типах тканей. Биохимические исследования обнаружили, что ион-проводящая часть канала представлена 4 трансмембранными повторами (домены I-IV), состоящими приблизительно из 150 аминокислот (рис. 19). Каждый домен имеет 6

гидрофобных трансмембранных сегментов, формирующих α -спираль. Один из участков домена (S4) является постоянным в Na-каналах разных видов и гомологичен специфическим участкам потенциал-активируемых Ca- и K-каналов. Он имеет высокую плотность заряженных аминокислотных остатков и является сенсором потенциала. Кроме того, показано, что уменьшение чистого положительного заряда в сегменте S4 путем сайт-направленного мутагенеза снижает потенциал-зависимость активационных ворот (Stuhmer W., Conti F., Suzuki H. et al., 1989), а антитела, связывающиеся с тем же участком канала, замедляют инактивацию Na-каналов.

В скелетной мышце экспрессируется β 1-субъединица, а в мозге и сердце – дополнительно β 2-субъединица. Удаление β 1-субъединицы приводит к потере функциональных свойств Na-каналов, тогда как удаление β 2-субъединицы не оказывает никакого влияния на работу канала. β -субъединицы Na-каналов, по-видимому, имеют двойную функцию: 1) модуляция воротного механизма канала и 2) фиксация канала в определенном месте. β 1-субъединица оказывает влияние на величину ионного тока через канал, регулируя процессы активации и инактивации. β 1 и β 2 субъединицы близки по структуре к большому семейству молекул клеточной адгезии, которые опосредуют связь между клетками в нервной системе и в других тканях. Оказалось, что Na-каналы через β 2 субъединицу связываются с белками внеклеточного матрикса (Srinivasan J., Schachner M., Cattaral W.A, 1998), что обеспечивает формирование специализированных зон с высокой плотностью Na-каналов в перехватах Ранвье и начальном сегменте аксона.

Идентифицировано 10 различных генов, кодирующих α -субъединицу потенциал-активируемого Na-канала (SCN1A–SCN10A). По-видимому, существует несколько различных генов, кодирующих β -субъединицу, однако, к настоящему времени локализован один ген – SCN1B и два его продукта. Так как потенциал-активируемые Na-каналы ответственны за генерацию ПД, большинство этих генов экспрессируется в возбудимых тканях.

Различают множество подтипов Na-каналов в скелетной и сердечной мышце по их чувствительности к токсинам и антителам, которые могут располагаться на поверхностной мембране или мембране Т-трубочек.

Продуктом гена SCN4A является α -субъединица Na-канала, определяемая в полностью дифференцированной и иннервированной скелетной мышце, SCN5A экспрессируется в кардиальной и эмбриональной скелетной мышцах.

Клонированы и определены аминокислотные последовательности двух типов Na-каналов в скелетной мышце - SkM-1 и SkM-2, представляющие собой гетеродимеры из α - (260 кДа) и β - (38 кДа) субъединиц. SkM-1 экспрессируются как в иннервированной, так и денервированной зрелой мышце и блокируются наномолярными концентрациями тетродотоксина и μ -конотоксином. SkM-2 каналы не чувствительны к тетродотоксину и не обнаружены в зрелой мышце млекопитающих, но появляются после денервации, достигая максимума через 48 часов, и затем исчезают.

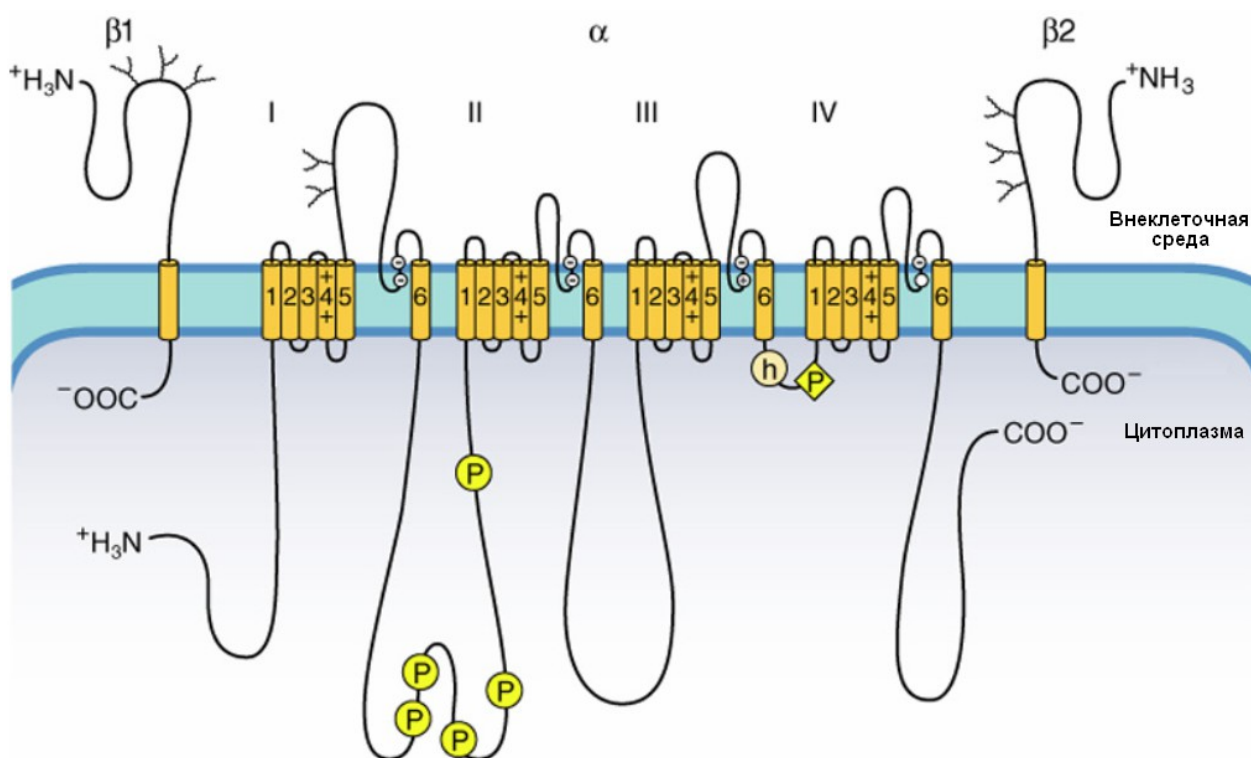


Рис. 19. Строение α и β субъединиц Na-канала.

Трансмембранные спиральные сегменты изображены в виде цилиндров. S4-сегмент содержит положительно заряженные аминокислоты и является сенсором потенциала; *h* - остатки, необходимые для быстрой инактивации; P в кружочках – сайты фосфорилирования цАМФ-зависимой протеинкиназой; P в ромбике - сайты фосфорилирования протеинкиназой C. Маленькие белые кружочки – остатки аминокислот с указанием их заряда, необходимые для высокоаффинного связывания с тетродотоксином. (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price D.L., 2006 с изменениями).

По фармакологическим и электрофизиологическим свойствам Na-каналы SkM-2-типа сходны с Na-каналами сердца. SkM-2 каналы экспрессируются в раннем онтогенезе и исчезают при увеличении количества SkM-1 каналов (Sperelakis N., 1995). Ген SCN4A кодирует α -субъединицу и SCN1B – β -субъединицу Na-каналов SkM-1-типа.

Фармакология Na-каналов. Ряд биологических токсинов модифицируют свойства Na-каналов. К ним относятся водорастворимые гетероциклические гуанидины – тетродотоксин и сакситоксин, липидорастворимые полициклические соединения – вератридин, аконитин, батрахотоксин, низкомолекулярные полипептидные яды, изолированные из яда скорпионов, морских анемонов и др. По участкам связывания и механизмам блокирующего действия все токсины можно разделить на несколько групп (Catterall W. A., 1980, 2000, Cestele S., Catterall W.A., 2000, Denac H., Mevissen M., Scholtysik G., 2000).

Первая группа. Токсины данной группы блокируют ионную проводимость Na-канала. К ним относится алкалоид тетродотоксин – хорошо известный токсин, обнаруженный в рыбе фуга (Tetrodontidae) (Mosher H. S., Fuhrman F. A., 1984). Блокирующий эффект тетродотоксина ярко выражен в двигательном нервном окончании и известен достаточно давно (Katz B., Miledi R., 1967б). Аналогичным блокирующим эффектом обладают сакситоксин и неотоксин (Cestele S., Catterall W.A., 2000). μ -конотоксины, выделенные из яда морских змей семейства Conus (Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M. et al., 1985, McIntosh J.M., Hasson A., Spira M.E. et al., 1995), блокируют Na-каналы в электрических пластинках электрического угря, в нейронах аплии и в мышечных волокнах, но неэффективны в двигательных нервах лягушки, млекопитающих и в ЦНС крысы (Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M. et al., 1985).

Вторая группа. Эти токсины вызывают постоянную активацию Na-каналов. К ним относят липидорастворимые токсины вератридин, батрахотоксин, аконитин и грайянотоксин. Все указанные токсины существуют в природе: вератридин, аконитин и грайянотоксин – это растительные алкалоиды, а батрахотоксин является секретом кожных желез колумбийских лягушек. Постоянная активация Na-каналов при действии данных вещества

объясняется двумя эффектами (Lazdunski M., Renaud J.F., 1982): сдвигом потенциал-зависимости активации к более отрицательным значениям МП и блокированием быстрой инактивации. При действии указанных токсинов каналы более легко открываются, увеличивается время их открытого состояния, поэтому их называют агонистами или активаторами Na-каналов. Вератридин ингибирует инактивацию Na-канала после его открытия (Catterall W.A., 1975). Батрахотоксин вызывает кратковременное увеличение спонтанного освобождения АХ в нервно-мышечном соединении млекопитающих (Jansson S. E., Albuquerque E.X., Daly J., 1974).

Третья группа. Токсины данной группы, связываясь с внеклеточной стороной канала, блокируют или замедляют инактивацию Na-каналов, предотвращая переход из открытого в инактивированное состояние. Это α -токсины скорпиона, выделенные из яда северо-африканских видов *Androctonus*, *Buthus* и *Leiurus*. Ряд полипептидных токсинов был выделен из морской анемоны *Anemonia sulcata* (Beress L., Beress R., Wunderer G., 1975). Анемонотоксины I, II, III, продлевая ПД нерва, вызывают спонтанную и повторную активность (Molgo J., Mallart A., 1985, Romey G., Abita J.P., Schweitz H. et al., 1976).

Четвертая группа. Данные токсины смещают потенциал-зависимость активации Na-канала к более отрицательным значениям МП, не влияя на инактивацию. В результате этого Na-токи появляются уже при потенциале -70 мВ, при котором в норме Na-каналы закрыты. Предположено, что эффект этих полипептидных токсинов обусловлен связыванием с сенсором потенциала Na-канала. К ним относятся яды северо- и южноамериканских скорпионов, которые называют β -токсинами. Токсин, выделенный из яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus*, оказывает пре- и постсинаптическое действие на нервно-мышечное соединение (Sampaio S.V., Coutinho Netto J., Arantes E.C. et al., 1996). Семь сходных токсинов были изолированы и выделены из *Tityus bahiensis* и *Tityis stigmurus* (Becerril B., Corona M., Coronas F. I. et al., 1996).

Пятая группа. Токсины данной группы вызывают повторную нейрональную активность, изменяют потенциал-зависимость и блокируют инактивацию Na-каналов. К ним относятся бреветоксин и цигуатоксин. Бреветоксин, липидорастворимый токсин, изолирован из морской

динофлагелляты *Ptychodiscus brevis*. Показано, что бреветоксин-В деполяризует гигантские аксоны и нервные окончания кальмара (Atchinson W.D., Luke V.S., Narahashi T., Vogel S.M., 1986). Цигуатоксин, выделенный из морской динофлагелляты *Gambierdiscus toxicus*, увеличивает квантовое освобождение в нервно-мышечном соединении лягушки (Molgo J., Comella J.X., Legrand A.M., 1990). Цигуатоксин-1b вызывает набухание перехватов Ранвье, модифицируя Na-каналы, что сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов натрия (Benoit E., Juzans P., Legrand A.M., Molgo J., 1996).

Шестая группа. К токсинам, связывающимся с участком 6, относят пиретроидные инсектициды, которые являются сильными возбуждающими нейротоксинами. Они вызывают гипервозбуждение и паралич животных. Пиретроиды представляют особый интерес, так как проявляют высокую степень селективной токсичности между млекопитающими и беспозвоночными животными (Denac H., Mevissen M., Scholtysik G, 2000).

Длительно активируемые Na-каналы

Большинство Na-каналов быстро активируется и инактивируется в течение нескольких миллисекунд (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 б). В ряде клеток были обнаружены Na-каналы, которые активируются при более отрицательных потенциалах, чем «нормальные» Na-каналы, и длительное время не закрываются (Fleiderman I.A., Gutnick M.J., 1996).

3.2. Калиевые каналы (K-каналы)

K-каналы возбудимых клеток участвуют в образовании МП покоя, обеспечивают реполяризацию мембраны во время ПД, формируют следовую гиперполяризацию, модулируют повторную активность, имеют очень большое значение в регуляции секреции медиатора из нервных окончаний, принимают участие в механизмах обучения и памяти (Зефилов А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2002, Солнцева Е.И., Буканова Ю.В., Скребицкий В.Г., 2003). Кроме потенциал-активируемых K-каналов, имеется широкий спектр K-каналов более или менее чувствительных к МП и активируемых или ингибируемых экзо- и эндогенными лигандами. Потенциал-нечувствительные K-каналы демонстрируют фоновую проводимость и, следовательно, определяют величину МП покоя и возбудимость. Они также играют роль в регуляции объема клетки и сигнальной

трансдукции. К-каналы составляют наиболее представительный и гетерогенный класс ионных каналов относительно кинетических свойств, регуляции, фармакологии и структуры (рис. 20 и 21). Это разнообразие обусловлено более чем 75 генами, кодирующими субъединицы канала, альтернативным сплайсингом, формированием мультимерных каналов, участием вспомогательных субъединиц и модуляцией каналов посттрансляционной модификацией и другими механизмами. К-каналы регулируются потенциалом, G-белками и внутриклеточными вторичными посредниками, являются мишенью действия фармакологических агентов (Jenkinson D.H., 2006, Solntseva E.I. et al., 2009).

По количеству трансмембранных (ТМ) сегментов К-каналы можно разделить на несколько групп. В группе **6ТМ** каждая субъединица имеет одну порообразующую область, а функциональный канал представляет собой тетрамер (рис. 20) (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006). Это семейство включает 8 подтипов потенциал-активируемых К-каналов, среди которых классический канал задержанного выпрямления, три типа Са-активируемых К-каналов и другие. **4ТМ каналы** - недавно обнаруженная группа, которая оказывает вклад в пассивную проводимость (утечку) во многих нейронах. Каждая из субъединиц 4ТМ канала содержит две пороформирующие последовательности. Функциональный канал образован двумя субъединицами. И, наконец, третья группа - **2ТМ**, к которой относят К-каналы входящего выпрямления, G-белок-активируемые К-каналы, а также АТФ-зависимые К-каналы. Классификация, основанная на структуре, имеет свои недочеты. Например, Са-активируемые К-каналы большой проводимости, относящиеся к группе 6ТМ, имеют семь ТМ сегментов (рис.21).

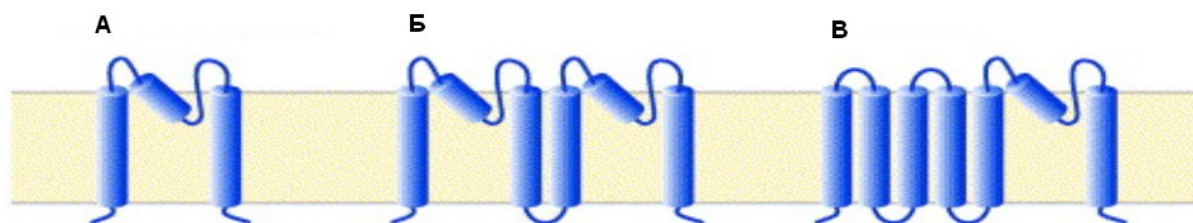


Рис. 20. Классификация К-каналов по количеству трансмембранных (ТМ) сегментов и порообразующих областей α -субъединицы:

А – каналы с двумя трансмембранными сегментами (2ТМ) и одной порой, Б - с четырьмя трансмембранными сегментами (4ТМ) и двумя порами, В – с шестью трансмембранными сегментами (6ТМ) и одной порой. (Из Goldstein S.A.N. et al., 2001 с изменениями).

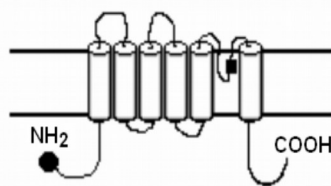
Гены, кодирующие белок К-канала, впервые были клонированы у Дрозофилы в 1987 году (Parazian D.M., Schwartz T.L., Tempell B.L. et al., 1987). Были локализованы гены, отвечающие за формирование различных типов К-каналов: Shaker и ether-a-go-go, кодирующие α -субъединицы различных потенциал-активируемых К-каналов, hyperkinetic, кодирующий β -субъединицы потенциал-активируемых К-каналов; slow-poke, кодирующий субъединицы Са-активируемых К-каналов.

К настоящему времени известно, что каждый из четырех членов семейства генов Дрозофилы имеет один или более гомологов у млекопитающих. Рассмотрим основные группы К-каналов, классифицируемых по структуре и физиологическим функциям (рис 21).

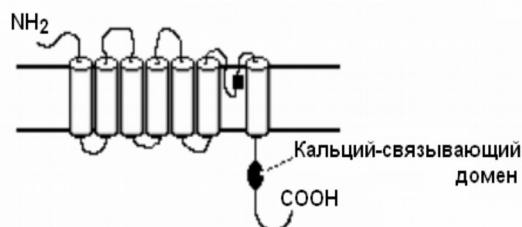
Потенциал-активируемые К-каналы (K_v -каналы). Потенциал-активируемые К-каналы образованы четырьмя α -субъединицами, формирующими канальную пору, которые могут быть связаны со вспомогательными цитоплазматическими β -субъединицами, модулирующими воротные свойства (Jan L.Y., Jan Y.N., 1994) (рис 21). Каждая α -субъединица состоит из шести гидрофобных сегментов S1-S6, области, формирующей пору – H5 или P между S5 и S6, и положительно заряженного сегмента S4 – сенсора потенциала (Рис. 8 и 21) (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999).

Обнаружено 4 семейства потенциал-активируемых К-каналов: Shaker/ K_v1 (KCNA), Shab/ K_v2 (KCNB), Shaw/ K_v3 (KCNC) и Shal/ K_v4 (KCND) (Chandy K.G., Gutman G.A., 1995). Способность образовывать гомотетрамеры (или гетеротетрамеры) внутри подсемейства канала определяется участком внутриклеточного NH_2 -конца. K_v -каналы инактивируются с различной скоростью (быстрая – N-тип инактивация и медленная – C-тип инактивация) (рис. 9). Оба типа инактивации обнаружены в большинстве эукариотических клетках животного и растительного царств (Rudy B., 1988), присутствуют не только в нервных и мышечных клетках, но и в лимфоцитах, островках поджелудочной железы и др. Каналы проявляют быструю инактивацию N-типа, если NH_2 -конец одной из α -субъединиц несет инактивационный “мяч”, как например у $K_v1.4$. В отсутствие “мяча”, быстрая инактивация также может происходить при помощи β 1-субъединицы как, например, для $K_v1.1$.

Потенциал-активируемый
K-канал



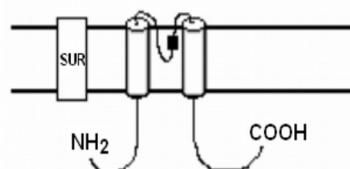
Ca-активируемый
K-канал



K-канал
аномального выпрямления



АТФ-зависимый
K-канал



K-канал утечки

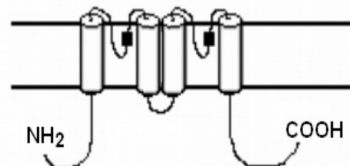


Рис. 21. Схематическое изображение α -субъединиц различных групп K-каналов.

Кружочек обозначает инактивирующий участок, квадратиками показаны порообразующие участки. SUR - АТФ-связывающий белок – рецептор сульфониуреа, часть АТФ-зависимого K-канала.

K-каналы задержанного выпрямления (Kdr-каналы). Эти каналы преобладают в большинстве возбудимых клетках, активируются при деполяризации и не инактивируются, либо инактивируются очень медленно (от сотен миллисекунд до нескольких секунд). Каналы получили свое название после исследований выходящего K-тока в гигантском аксоне кальмара (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 б), который активировался с задержкой

при деполяризации, нарастал более медленно, чем Na-ток и поэтому был назван ток задержанного выпрямления (delayed rectifier). Каналы блокируются 4-АП или ТЭА.

На основе исследований порогов активации, воротной кинетики и чувствительности к фармакологическим агентам, было показано, что Kdr-каналы негомогенны и включают несколько подтипов. Показано, что в нервном окончании кальмара Kdr-каналы имеют порог активации около -60 мВ, 3,4-диаминопиридин эффективно их блокирует и вызывает расширение пресинаптического ПД (Van Der Kloot W., Molgo J., 1994). В нервных окончаниях типа calyx Held крысы быстро активирующийся K-ток укорачивает ПД и вызывает следовую гиперполяризацию, а блокада этого тока 4-АП ведет к усилению освобождения медиатора (Forsythe I.D., 1994). В некоторых нейронах, имеющих длительный ПД, ток через Kdr-каналы также участвует в реполяризации, но воротная кинетика каналов более медленная. Так, в сенсорных нейронах аплизии Kdr-каналы активируются в течение 100-200 мс и инактивируются в течение 0.5 с (Klein M., Camardo J., Kandel E.R., 1982). Другой относительно медленный K-ток со временем активации 100 мс был зарегистрирован в нервном окончании цилиарного ганглия цыпленка (Bennet M.R., Ho S., 1992). Наконец, методом пэтч-кламп в нервных окончаниях гипофиза был обнаружен Kdr-ток с проводимостью одиночного канала 27 пСм (Bielefeldt K., Rotter J. L., Jackson M. B., 1992). Этот канал имеет относительно медленную кинетику и селективно блокируется дендротоксином. Из-за медленной активации он не участвует в реполяризации ПД, но может быть активирован во время длительных взрывов активности, имеющих место в гипоталамо-гипофизарной системе.

Быстрые K-каналы (K_A-каналы). Впервые K_A-каналы были обнаружены в нейронах моллюсков (Connor J.A., Stevens C. F., 1971). В различных нейронах функции K_A-каналов включают регуляцию повторной активности, определение латентного периода первого спайка и, в некоторых случаях, участие в реполяризации ПД. K_A-каналы активируются и инактивируются быстро, функционируют в подпороговых для генерации ПД областях, открываясь кратковременно в ответ на небольшую деполяризацию при условии предварительной гиперполяризации мембраны. Поэтому K_A-каналы способны

регулировать повторную активность низкой частоты и преобладают в сенсорных нейронах, которые разряжаются с частотой, отражающей интенсивность стимула. Следовая гиперполяризация устраняет инактивацию K_A -каналов, и кратковременный выходящий ток через эти каналы замедляет возвращение МП в сторону порога ПД. Таким образом, интервал между предыдущим и последующим ПД продлевается. K_A -каналы были обнаружены в ЦНС аплизии (Daut J., 1973, Klein M., Camardo J., Kandel E.R., 1982) и морской свинки (Kasai H., Kameyam D., Yamaguchi K., Fukuda J., 1986). Токи через эти каналы уменьшались дендротоксином, что приводило к усилению секреции медиатора и спонтанной эпилептиформной активности в интактных популяциях нейронов. В культуре гиппокампальных нейронов K_A -токи усиливаются агонистами ГАМК-рецепторов, что ведет к укорочению ПД и уменьшению секреции медиатора. K_A -каналы были идентифицированы в нервных окончаниях биполярных клеток сетчатки, но их роль остается невыясненной (Golard A., Witkovsky P., Tranchina D., 1992). Они имеют порог активации -70 мВ, быстро активируются (1-2 мс) и инактивируются (10-15 мс), эффективно блокируются 4-АП, ТЭА и капсаицином. K_A -каналы также были определены в нервных окончаниях заднего отдела гипофиза (Jackson M.B., Konnerth A., Augustine G.J., 1991), где, по-видимому, участвуют в реполяризации нервных окончаний после спайка. Кроме того, во время высокочастотной стимуляции инактивация приводит к уменьшению тока через K_A -каналы и расширению ПД. K_A -каналы проанализированы в синапсосомах электрического органа Torpedo, где имеют проводимость 24 пСм (Edry-Schiller J., Rahamimoff R., 1993). Получены доказательства присутствия K_A -каналов в двигательных нервных окончаниях лягушки (Mirrales F., Solsona C., 1996), где они могут непосредственно участвовать в регуляции секреции медиатора

Медленно активирующиеся K-каналы (K_S -каналы). Задержанные выпрямляющие K-токи с очень медленной кинетикой активации (slow) были впервые описаны в волокнах Пуркинье сердца (Noble D., Tsien R. W., 1969). Медленно активирующийся K_S -канал был обнаружен в изолированных нервных окончаниях гипофиза (Kilic G., Stolpe A., Lindau M, 1996). Временная константа активации составляет 4 с при -50 мВ и уменьшается до 700 мс при -40 мВ.

Кальций-активируемые К-каналы (K_{Ca}-каналы). K_{Ca}-каналы

управляются не только потенциалом, но и внутриклеточной концентрацией ионов Ca. K_{Ca}-токи обнаружены практически во всех нервных клетках (Зефирова А.Л., Ха-

лилов И.А., Хамитов Х.С., 1987, Meir A., Rahamimoff R., 1999, Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C. F., 2000). Целый ряд токсинов эффективно влияют на функцию K_{Ca}-каналов. К ним необходимо отнести токсины скорпиона - харибдотоксин (Bielefeldt K., Jackson M.B., 1993, Bielefeldt K., Rotter J.L., Jackson M.B., 1992, Farley J., Rudy B., 1988, Lindgren C.A., Moore J.W., 1989, Morita K., Barret E.F., 1990, Vatanpour H., Harvey A.L., 1995, Wang G., Thorn P., Lemos J.R., 1992, Wangemann P., Takeuchi S., 1993) и ибериотоксин (Vatanpour H., Harvey A.L., 1995), апамин (Bielefeldt K., Jackson M.B., 1993, Dreyer F., Penner B., 1987, Lazdunski M., 1983, Morita K., Barret E.F., 1990, Wang G., Thorn P., Lemos J.R., 1992) и бреветоксин-В (Tsai M.C., Chen M.L., 1991).

На основе биофизических и фармакологических свойств K_{Ca}-токи можно разделить на быстрые и медленные (Meir A., Rahamimoff R., 1999). Первые - активируются в течение миллисекунд, участвуют в реполяризации ПД и селективно блокируются харибдотоксином (Angaut Petit D., Benoit E., Mallart A., 1989, Bennet M. R., Ho S., 1992). Медленные K_{Ca}-токи активируются с задержкой в несколько десятков миллисекунд, вносят вклад в следовую гиперполяризацию ПД и блокируются апаминем (Morita K., Barret E.F., 1990).

По проводимости можно выделить K_{Ca}-каналы большой и малой проводимости. K_{Ca}-каналы большой проводимости (BK-каналы) имеют проводимость более 200 пСм, блокируются харибдотоксином и ТЭА (Nomura K., Naruse K., Watanabe K., Sokabe M., 1990, Wangemann P., Takeuchi S., 1993). K_{Ca}-каналы малой проводимости (SK-каналы) имеют проводимость менее 100 пСм и слабо чувствительны к ТЭА, действующему внутриклеточно (Farley J., Rudy B., 1988). Для активации каналов необходима внутриклеточная концентрация ионов Ca в пределах от 10 нМ до 100 мкМ и сдвиг МП до -30-40 мВ (Bielefeldt K., Jackson M. B, 1993, Farley J., Rudy B., 1988, Nomura K., Naruse K., Watanabe K., Sokabe M., 1990). Вероятность открытия каналов увеличивается в e раз на каждые 8-15 мВ деполяризации (Bielefeldt K., Jackson M. B, 1993, Farley J., Rudy B., 1988, Nomura K., Naruse K., Watanabe K., Sokabe

М., 1990). Увеличение внутриклеточного кальция сдвигает потенциал-зависимость активации в отрицательную сторону, то есть меньшая деполяризация необходима для активации каналов при высоких концентрациях ионов Са. В нервных окончаниях задней доли гипофиза зарегистрированы K_{Ca} -каналы, имеющие проводимость от 193 до 331 пСм (Bielefeldt K., Jackson M.B., 1993, Bielefeldt K., Rotter J.L., Jackson M., 1992, Wang G., Thorn P., Lemos J.R., 1996). В эфферентных улитковых нервных окончаниях проводимость K_{Ca} -каналов составляет 221 пСм, каналы блокируются внеклеточным ТЭА и харибдотоксином (Wangemann P., Takeuchi S., 1993).

Активность K_{Ca} -каналов может модулироваться как фосфорилированием, так и дефосфорилированием. Вероятность открытия K_{Ca} -каналов зависит от концентрации АТФ с внутриклеточной стороны мембраны. Кроме того, добавление каталитической субъединицы протеинкиназы А увеличивает активность K_{Ca} -каналов синапсом мозга крысы (Farley J., Rudy B., 1988). Некоторые клинически используемые препараты блокируют K_{Ca} -каналы. Это - аминогликозидные антибиотики (Nomura K., Naruse K., Watanabe K., Sokabe M., 1990), антималярийный препарат сульфат хинина (Bartschat D. K., Blaustein M. P., 1985).

Лучше всего изучены ВК-каналы, так они были не только клонированы из дрозофилы (Slo), но и выделены из гладких мышц трахеи и аорты. Оказалось, что мутация участка slow-roke в третьей хромосоме дрозофилы специфически уничтожает K_{Ca} -токи (Elkins T., Ganetzky B., Wu C.-F., 1986, Saito M., Wu C.-F., 1991). Молекулярный анализ данного участка показал, что он содержит 3552 нуклеотида, которые кодируют белок, состоящий из 1184 аминокислот. Субъединица канала состоит из семи гидрофобных доменов и напоминает структуру других К-каналов (Atkinson N.S., Robertson G. A., Ganetzky B., 1991), однако добавляется дополнительный домен (S0) со стороны NH_2 -конца белка (Рис. 21). Участок связывания с ионами Са, по-видимому, находится на карбоксильном конце белка. Изменения потенциала активируют K_{Ca} -каналы, что связано с наличием сенсора потенциала в сегменте S4. Другие участки данного белка имеют некоторую степень схожести с потенциал- и нуклеотид-активируемыми каналами (Jan L.Y., Jan Y.N., 1992). Можно думать, что K_{Ca} -канал, является членом суперсемейства, включающего

потенциал-активируемые Na-, K-, Ca-каналы и каналы, управляемые вторичными посредниками (Adelman J. P., Shen K.-Z., Kavanaugh M.P. et al., 1992). Были клонированы также гены, кодирующие K_{Ca}-каналы у мыши (Butler A., Tsunoda S., McCobb D.P., Wei A. et al., 1993) и человека (Tseng-Crank J., Foster C. D., Krause J. D. et al., 1994).

Был также охарактеризован ген, кодирующий β -субъединицу K_{Ca}-канала (Tseng-Crank J., Foster C.D., Krause J.D. et al., 1994, Tseng-Crank J., Godinot N., Jonansen T.E. et al., 1996). Этот ген кодирует полипептид, состоящий из 191 аминокислоты, который содержит два трансмембранных сегмента. Коэкспрессия данного белка с α -субъединицей ведет к увеличению чувствительности канала к ионам Ca и потенциалу (Mcmanus O.V. et al., 1995).

Таким образом, BK-каналы управляются как Ca, так и МП, то есть являются молекулярными интеграторами электрических событий на плазматической мембране и активации систем внутриклеточных посредников. BK-каналы вовлечены в целый ряд клеточных функций и играют существенную роль в контроле электрической активности клетки, секреции гормонов и медиаторов, сосудистого тонуса, регуляции циркадианных ритмов и др. (Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B., 2002). Функции BK-каналов могут модулироваться целым рядом внутри и внеклеточных факторов, включая изменение их окислительно-восстановительного статуса. Оказалось, что газообразные посредники – оксид азота (NO) (Bolotina V.M. et al., 1994), монооксид углерода (CO) (Xi Q. et al., 2004) и сероводород (H₂S) модулируют активность данного типа каналов. В частности показано, что H₂S усиливает активность BK-каналов в культуре гипофизарных клеток GH₃ крысы и этот эффект связан с восстанавливающим действием газа на каналный белок (Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A., 2009).

Некоторая информация имеется о молекулярных свойствах K_{Ca}-каналов малой проводимости, блокируемых апамином (Lazdunski M., 1983). Используя антитела к апамин-связывающему белку в ряде препаратов, включая синаптосомы мозга, был клонирован кодирующий его ген (Sokol P.T., Hu W., Yi L. et al., 1994). Предположено, что этот K_{Ca}-канал представляет собой олигомер, содержащий субъединицу массой 30 кДа. Белок канала состоит из 438 аминокислот, содержит 4 трансмембранных домена, участок связывания ионов

Ca, участок фосфорилирования протеинкиназой C и не имеет последовательностей, гомологичных известным ионным каналам и рецепторам.

Блокирование K_{Ca} -каналов вызывает два заметных изменения ПД нервных окончаний. Во-первых, увеличение длительности ПД (Morita K., Varret E.F., 1990), сопровождающееся увеличением входящего Ca-тока, во-вторых, исчезновение следовой гиперполяризации в течение нескольких миллисекунд после ПД (Bennet M.R., Ho S., 1992, Dreyer F., Penner B., 1987, Morita K., Varret E. F., 1990). Первый эффект объясняется выключением быстрого K_{Ca} -тока, второй - медленного (Morita K., Varret E.F., 1990). Несмотря на то, что K_{Ca} -каналы могут регулировать длительность ПД нервного окончания и управлять входом ионов Ca, эффекты блокаторов K_{Ca} -каналов на секрецию медиатора противоречивы. Некоторые исследователи сообщали об увеличении секреции медиатора из нервных окончаний при блокировании K_{Ca} -каналов селективным блокатором харибдотоксином (Robitaille R., Charlton M.P., 1992), тогда как другие - эти эффекты не подтвердили (Lindgren C.A., Moore J.W., 1989).

Не исключено, что K_{Ca} -каналы играют определенную роль при ритмической активности. Во время высокочастотной стимуляции происходит значительное увеличение внутриклеточного кальция (Jackson M. B., Konnerth A., Augustine G. J., 1991) и, как следствие, усиление K_{Ca} -тока. Активация K_{Ca} -каналов может вызывать ре- и гиперполяризацию мембраны, ограничивать Ca-вход и, таким образом, уменьшать секрецию медиатора. По крайней мере, два факта поддерживают эту гипотезу. Во-первых, существование Ca-зависимой гиперполяризации мембраны нервных окончаний и выпадение ПД при высокочастотной стимуляции (Bielefeldt K., Jackson M.B., 1994). Во-вторых, уменьшение облегчения при парной и ритмической стимуляции в нервно-мышечном соединении речного рака и лягушки при блокировании K_{Ca} -каналов. Было предположено, что K_{Ca} -каналы участвуют также в ограничении залповой активности нервных окончаний и регуляции интервалов между залпами ПД (Wang G., Thorn P., Lemos J. R., 1992). В слуховых волосковых клетках K_{Ca} -каналы участвуют в настраивании на определенную частоту и в предохранении от сверхчастотной активации (Wangemann P., Takeuchi S., 1993).

В пресинаптических структурах K_{Ca} -каналы расположены в активных зонах - вблизи Ca -каналов (Зефиоров А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С., 1987, Roberts W.M., Jacobs R.A., Hudspeth A.J., 1990, Robitaille R., Garcia M.L., Kaszorowski G.J., Charlton M. P., 1993). Это стратегическое расположение позволяет им быстро активироваться в ответ на поступление ионов Ca в терминаль.

K-каналы аномального выпрямления (Kir-каналы). K-каналы аномального выпрямления называются так потому, что входящий ток проходит через них с большей легкостью, чем выходящий, поэтому их называли каналами

входящего выпрямления (inward rectifier). Эти каналы могут активироваться гиперполяризацией и обеспечивать вход ионов К внутрь клетки при потенциалах ниже калиевого равновесного потенциала. При потенциалах более положительных, чем калиевый равновесный потенциал, канал блокируется внутриклеточными катионами или органическими полиаминами. Канал открывается тогда, когда блокирующие частицы электростатически выходят из канала. Kir-каналы обнаружены в скелетных мышцах, клетках сердца, в нейронах ЦНС позвоночных и беспозвоночных животных (Hille B., 2001). Kir-каналы вовлечены в регуляцию возбудимости и могут вносить вклад в создание МП покоя. Активация каналов ведет к гиперполяризации мембраны, уменьшению частоты сердечных сокращений и сократимости сердечной мышцы. Kir-каналы ограничивают секрецию медиатора в центральной и периферической нервной системе при ишемии и гипоксии, играют ключевую роль в секреции инсулина в клетках поджелудочной железы.

Иммуногистохимическими методами было показано наличие белков Kir-каналов в нервных окончаниях мозга крысы, а также таламокортикальных и гиппокампальных нервных терминалях (Ponce A., Bueno E., Kentros C. et al., 1996). Семейство Kir-каналов включает G-белок-активируемые каналы, опосредующие эффект АХ в пейсмекерах сердца, классические каналы входящего выпрямления в скелетных и сердечной мышце и нейронах, а также АТФ-зависимые К-каналы. Kir-каналы в разных клетках различаются по своим кинетическим характеристикам, чувствительности к блокаторам и являются важнейшими мишенями для модулирующих эффектов нейромедиаторов и вторичных посредников. Субъединица канала состоит из двух трансмембранных участков - M1, M2, P-домена, образующего пору, и не имеет сенсора потенциала типа S4 (рис. 21) (Roeper J., Pongs O., 1996). Проводимость одиночного канала, измеренная в клетках желудочка сердца, составляет 20 пСм и увеличивается при гиперполяризации. Каналы блокируются внутриклеточным ТЭА, а также ионами Cs и Ba. Более 15 генов семейства KCNJ кодируют Kir-каналы. Степень выпрямления определяется аминокислотным остатком в M2 домене около цитоплазматической стороны клетки, где отрицательно заряженный аспартат обеспечивает сильное выпрямление, а нейтральный аспарагин – слабое выпрямление (Wie X.Y., Jegla T., Salkoff L., 1996).

Присутствие остатка лизина на NH₂-конце обеспечивает чувствительность к рН (Fakler B., Schultz J.H., Yang J. et al., 1996).

G-белок управляемые K-каналы (GIRK-каналы). Некоторые каналы входящего выпрямления управляются G-белками (GIRK1,2,4). Например, GIRK1 открывается при парасимпатической нервной стимуляции посредством активации мускариновых АХ-рецепторов в клетках проводящей системы сердца, что ведет к гиперполяризации и уменьшению частоты сердечных сокращений (Kubo Y., Reuveny E., Slesinger P.A. et al., 1993, Mark M.D., Herlitze S., 2000). GIRK-каналы модулируются фосфотидилинозитол 4.5-бифосфатом, внутриклеточными ионами Na, этанолом, механическим растяжением, рН. Нейрональные GIRK-каналы вовлекаются в регуляцию возбудимости нейрона и могут вносить вклад в создание МП покоя.

Kv-каналы сердца кодируются семейством KCNQ генов. Они проявляют более быструю активацию и большую степень инактивации по сравнению Kdr-каналами, несмотря на общие фармакологические свойства. Десятилетие назад в кардиомиоцитах был описан относительно быстрый **Ikr-ток** задержанного выпрямления по сравнению с медленными токами – Iks, обусловленными Kdr-каналами (Wymore R.S., Gintant G.A., Wymore R.T. et al., 1997). Эти каналы проявили сходство с K-каналами ether-a-go-go (eag) дрозофилы, поэтому были названы human ether-a-go-go-related gene (HERG). Гетерологическая экспрессия действительно выявила K-канал, воротные и кинетические свойства которого напоминали Ikr. Уникальной особенностью этих каналов является относительно быстрая инактивация С-типа вследствие высокой чувствительности к внеклеточным катионам, а также медленная активация и деактивация. Эта комбинация воротных механизмов приводит к изменению свойств канала. Хотя HERG имеет вторичную структуру типичного потенциал-активируемого K-канала (рис. 69), он проводит задержанный входящий выпрямляющий ток (Smith P.L., Baukrowitz T., Yellen G., 1996).

АТФ-зависимые K-каналы (K_{АТФ}-каналы). K-каналы, нечувствительные к МП и управляемые цитозольной АТФ, называются K_{АТФ}-каналами. Они были обнаружены в β-клетках поджелудочной железы, где играют ключевую роль в секреции инсулина, в кардиомиоцитах, скелетных и гладкомышечных клетках и некоторых нейронах (Lazdunski M., 1994). K_{АТФ}-каналы показаны в

адренергических нервных окончаниях крысы (Lee K., Dixon A.K., Rowe I.C. et al., 1996), ГАМК-ергических нервных окончаниях субстанции нигра крысы (Stanford T.M., Lacey M.G., 1997) и холинергических двигательных нервных окончаниях мышцы (Deist M., Repp H., Dreyer F., 1992). С помощью метода пэтч-клапм K_{ATP} -каналы были охарактеризованы в нервных окончаниях двигательной коры крысы. Они имеют проводимость 52.5 пСм, внутриклеточная АТФ в концентрации 1 мМ ингибирует, а Mg-АДФ в той же концентрации увеличивает активность каналов (Baukrowitz T., Fakler B., 2000). Вероятность открытия каналов не зависит от внутриклеточного кальция и блокируется 100 мкМ толбудамида. Активность каналов блокируется ТЭА в высоких концентрациях и глибенкламидом (Deist M., Repp H., Dreyer F., 1992). К активаторам каналов относятся кромакалим и диазоксид (Stanford T.M., Lacey M.G., 1997). Обнаружено также, что некоторые мембранные фосфолипиды связываются с K_{ATP} -каналами, что приводит к увеличению вероятности их открытия и уменьшению чувствительности к АТФ (Baukrowitz T., Fakler B., 2000). K_{ATP} -каналы вовлекаются в поддержание МП покоя, когда содержание энергии в клетке снижено, например, при ишемии, гипоксии, гипогликемии (Babenko A.P., Aguilar-Bryan L., Bryan J., 1998).

Роль K_{ATP} -каналов в качестве метаболического сенсора можно продемонстрировать на примере секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы в ответ на поглощение глюкозы. Метаболизм глюкозы ведет к увеличению внутриклеточной АТФ и уменьшению АДФ, что приводит к закрытию K_{ATP} -каналов, деполяризации мембраны, активации потенциал-активируемых Са-каналов, входу в клетку ионов Са и секреции инсулина. Сульфонилуреа, такие как глибенкламид и толбудамид, которые ингибируют K_{ATP} -каналы, используют для лечения диабета 2 типа, так как они стимулируют секрецию инсулина (Edwards G., Weston A.H., 1993). Другой пример - связанная с ишемией гиперполяризация кардиомиоцитов сердца, где при уменьшении внутриклеточной концентрации АТФ происходит увеличение АТФ-зависимого К-тока и укорочение ПД. Последующее уменьшение возбудимости и сократимости сердечной мышцы уменьшает потребление энергии и способствует выживанию кардиомиоцитов в период метаболического повреждения (Aguilar-Bryan L., Clement J.P.I., Gonzalez G. et al., 1998). K_{ATP} -

каналы ограничивают секрецию медиатора в центральной и периферической нервной системе за счет гиперполяризации мембраны, когда содержание энергии в нервной клетки низкое, например, при ишемии, гипоксии, гипогликемии.

Канал формируется из АТФ-связывающего белка - рецептора сульфониуреа (SUR) и К-канала входящего выпрямления (Kir 6.1 или Kir 6.2) (Baukrowitz T., Fakler B., 2000) (рис. 21, 22). SUR состоит из 17 трансмембранных сегментов и 2 нуклеотид-связывающих участков. Функционально K_{ATP} -канал представляет собой гетерооктамер, состоящий из Kir 6.x и SUR субъединиц в стоихиометрии 1 : 1. Четыре Kir 6.x образуют пору, определяют проводимость канала и блокируются ионами Mg и полиаминами. Четыре SUR группируются симметрично вокруг центральной поры и являются регуляторными (рис. 22).

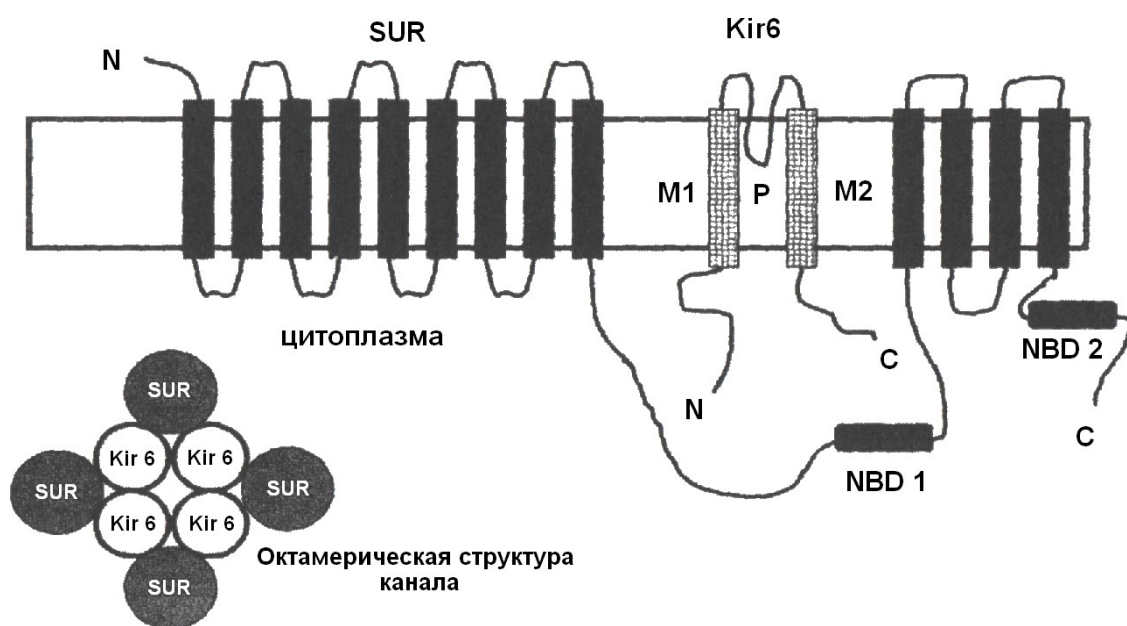


Рис. 22. Структура K_{ATP} -канала.

Топологическая модель Kir 6.x и SUR субъединиц. Kir 6.x имеет два трансмембранных сегмента, связанных петлей (P), образующей пору. SUR имеет 17 трансмембранных домена и два домена (NBD1 и NBD2), связывающих нуклеотиды. Из этих двух субъединиц формируется K_{ATP} -канал в виде октомера

(показано внизу слева). (Из Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside, 2000 с изменениями).

Различные изоформы Kir 6.x (Kir 6.1 или Kir 6.2) и SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) обеспечивают экспрессию разных типов K_{ATP} -каналов в различных тканях, различающихся фармакологией и чувствительностью к ингибированию АТФ (Baukrowitz T., Fakler B., 2000).

Роль K_{ATP} -каналов в нормальных метаболических условиях неясна. Было обнаружено, что в двигательных нервных окончаниях мышцы K_{ATP} -каналы вносят небольшой (~8%) вклад в общий K-ток (Baukrowitz T., Fakler B., 2000). Однако, имеются данные, что часть K_{ATP} -каналов активны в покое и могут играть определенную роль в регуляции секреции медиатора в нормальных условиях. По всей видимости, K_{ATP} -каналы вовлекаются в поддержание МП покоя и регуляцию освобождения медиатора, когда содержание энергии в нервной терминали снижено, например, при гипоксии, гипогликемии. Так, гипоксия вызывает уменьшение вызванного освобождения норадреналина в срезах коры (Takata Y., Shimada F., Kato H., 1993) и субстанции nigra крысы (Watts A.E., Hicks G.A., Henderson G, 1995) за счет активация K_{ATP} -каналов и последующей гиперполяризации мембраны.

K-каналы утечки. Токи утечки были описаны более 50 лет назад (Hodgkin A.L., Huxley A.F., 1952 a). Ток утечки может формироваться либо за счет одновременного движения через мембрану ионов K, Na и Cl, либо за счет перемещения только ионов K. Токи утечки контролируют возбудимость клеток, влияют на длительность, частоту и амплитуду ПД (Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols, 1994). K-каналы утечки постоянно открыты при нормальных значениях МП покоя и проявляют взрывы активности при сдвигах МП, которые длятся несколько минут и наблюдаются при всех значениях потенциала. Усиление K-токов утечки ведет к гиперполяризации мембраны, тогда как их подавление - к деполяризации. Активность каналов зависит от влияния протеинкиназ A, C и G, арахидоновой кислоты, растяжения мембраны, внешнего pH и температуры (Siegelbaum S. A., Camardo J. S., Kandel E. R., 1982). Ингибирование K-каналов утечки в покое является широко распространенным механизмом действия серотонина, норадреналина, вещества P, ГАМК, глутамата, тиреотропного гормона, АХ, которые увеличивают нейрональную возбудимость (Nicoll R.A., Malenka R.C., Kauer J.A., 1990). Однако, существование канального механизма, ответственного за токи утечки, долгое время оставалось под

вопросом. Только сейчас стало ясно, что калиевая утечка это ток через специальные К-каналы (Goldstein S.A.N., Bockenhauer D., O'Kelly I., Zilberberg N., 2001). Исследования молекулярной структуры К-каналов утечки показали, что каждая из субъединиц нового семейства К-каналов имеет по два домена, формирующих пору, в отличие от семейств Kv- и Kir-каналов, и четыре трансмембранных сегмента (Рис. 21). Идентифицировано более 50 генов данного семейства каналов, а 14 из них клонировано и исследовано. Клонированные К-каналы с двумя порами можно разделить на четыре различных класса: TWIK-1 и TWIK-2, TREK-1 и TRAAK – каналы, чувствительные к механическим стимулам и активируемые полиненасыщенными жирными кислотами; TASK-1 и TASK-2 – каналы, чувствительные к закислению среды; KCNK6 и KCNK7 – молчащие каналы, вероятно, требующие дополнительной субъединицы для активации.

β -субъединицы К-каналов. Известны β 1-субъединица, кодируемая геном KCNA1B, ответственная за N-тип инактивацию, и β 2-субъединица, кодируемая геном KCNA2B, увеличивающая скорость экспрессии целого канального комплекса (Retig J., Heinemann S.H., Wunder F. et al, 1994). hsl β -структурно отличная β -субъединица, содержащая 2 трансмембранных фрагмента, связана с K_{Ca}-каналом и увеличивает его чувствительность к харибдотоксину и внутриклеточной концентрации ионов Ca. Обнаружен также белок MinK, кодируемый KCNE1 и содержащий одиночный трансмембранный домен, который проводит медленно активирующиеся К-токи при экспрессии в ооциты. Регистрируемые токи сходны с токами в сердечных и некоторых эпителиальных клетках и модулируются активацией различных систем внутриклеточных посредников. Предполагают, что MinK действует как β -субъединица с неизвестной пока стоихиометрией. Предположено, что COOH-конец MinK связан с областью поры KCNQ К-каналов, что определяет более длительное время открытия и меньшую проводимость одиночного канала. Другие тканеспецифичные трансмембранные β -субъединицы идентифицированы и для Kir-каналов.

3.3. Хлорные каналы

Ионы Cl являются наиболее распространенными вне- и внутриклеточными анионами. Cl-каналы присутствуют в плазматической мембране большинства клеток, играя важную роль в регуляции клеточного объема, трансэпителиального транспорта, секреции секреторных желез, стабилизации МП (Hofmann E. K., Dunham P. B., 1995, Brown C. D. A., Dudley A. J, 1996, Albertson T. E., Walby W.F., Stark L.G., Joy R. M., 1996). В клетках животных концентрация Cl в цитоплазме ниже, чем во внеклеточной среде, а равновесный хлорный потенциал находится вблизи МП покоя. Вклад Cl-каналов в МП покоя зависит от их относительного количества и проводимости. Обычно, активация Cl-каналов уменьшает нормальную возбудимость и способствует реполяризации клетки во время ПД (Holz G.G.T., Kream R.M., Spiegel A., Dunlap K., 1989). Cl-каналы регулируют электрическую возбудимость скелетной мышцы. Cl-каналы могут активироваться внеклеточными лигандами, внутриклеточными ионами Ca, цАМФ, G-белками, механическим растяжением, потенциалом. Так как механизмы их активации могут перекрываться, экспрессия определенного типа канала не ограничивается одним типом клетки.

Cl-каналы могут определять количество окончаний разветвлений аксона одного нейрона, активируемых в каждый момент времени (Wall P., 1995). При увеличении хлорной проводимости, например при активации рецепторов ГАМК, происходит снижение возбудимости и блок проведения ПД в узле ветвления. Следовательно, изменения хлорной проводимости могут регулировать количество функционирующих нервных окончаний (Zhang S.J., Jackson M.B, 1993). Выделяют три суперсемейства Cl-каналов: лиганд-активируемые, кальций-активируемые и потенциал-активируемые.

Лиганд-активируемые Cl-каналы. Лиганд-активируемые Cl-каналы относятся к большому семейству рецепторных канальных молекул (Betz H., 1990). Канал, состоящий из 5 гомологичных мембранных субъединиц, содержит внеклеточные лиганд-связывающие и цитоплазматические модуляторные участки (Nayeem N., Green T.P., Martin I.L., Barnard E.A., 1994). Установление аминокислотных последовательностей выявило значительную гомологичность внутри членов семейства (20-30%). Более того, структурные характеристики

субъединиц очень похожи. Каждая субъединица состоит из внеклеточного аминотерминального домена, состоящего из около 200 аминокислот, 4 трансмембранных доменов (ТМ) и короткого внеклеточного карбоксильного конца. Аминотерминальный домен содержит консервативный мотив, называемый Cys петля. Домены ТМ3 и ТМ4 связаны цитозольной петлей. Пять ТМ2 доменов из каждой субъединицы изгибаются к центру мембраны и формируют ворота ионного канала. Эти каналы преимущественно экспрессируются в нервной ткани и делятся на ГАМК- и глицин-активируемые. Функция всех лиганд-активируемых Cl-каналов одинакова, они играют центральную роль в механизмах пре- и постсинаптического торможения (Dudel J., Kuffler W., 1961).

ГАМК-активируемые Cl-каналы. ГАМК является основным тормозным медиатором в ЦНС (Головко А.И., Бурякова Л.В., Куценко Ц.А., Свидерский О.А., 1999, Зефиоров А.Л., Хазипов Р.Н., Бен-Ари Е, 1998, Vormann J., Hamill O P., Sakmann B, 1987). Ее роль была впервые описана в нервной системе беспозвоночных (Iversen L.L., Kravitz E A., Otsuka M., 1967). Эффекты ГАМК реализуются через ГАМК_A, ГАМК_B и ГАМК_C – рецепторы, из которых ГАМК_A и ГАМК_C являются ионотропными, то есть формирующие ионный канал. Время открытого состояния ГАМК_A канала составляет 25 мс, проводимость 10-30 пСм, рецептор характеризуется быстрой десенситизацией (Vormann J., Hamill O.P., Sakmann B, 1987). К настоящему времени у млекопитающих изолировано 19 субъединиц ГАМК_A-рецепторов: $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 4$, $\gamma 1$ - $\gamma 4$, δ , ϵ , π , θ , некоторые из них имеют сплайс-варианты (Whitting P.J., Mckernan R.M., Wafford K.A., 1995). ГАМК_A-рецептор – это мультимерный комплекс с молекулярной массой 230-270 кДа. По-видимому, это пентамер, однако неясно какие субъединицы образуют физиологически активный канал в различных областях мозга. Один из распространенных рецепторов в мозге содержит $\alpha 1$, $\beta 2$ и $\gamma 2$ - субъединицы (рис. 23 А). Активность ГАМК_A-каналов может модулироваться оксидом азота (NO) (Dzoljic M., Erdmann W., Dzoljic M.R., 1996), фосфорилированием протеинкиназой А (Schneggnburger R., Konnerth A., 1992) и кальций/фосфолипид зависимой протеинкиназой С (Browning M.D., Bureau M., Dudek E.M., Olsen R.W., 1990). На работу ГАМК_A-каналов могут влиять также натуральные и синтетические соединения, включающие бензодиазепины,

стероиды, барбитураты, этанол, общие анестетики, пикротоксин, цинк, лантаниды, пестициды и нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты (Whitting P.J., Mckernan R.M., Wafford K.A., 1995, Sharonova N.I. et al., 2005) (рис. 23 А). Классическим антагонистом ГАМК_A-рецепторов является бикикулин, вызывающий конвульсии. Эффект бикикулина связан со снижением токов через ГАМК_A-канал за счет уменьшения вероятности открытия и времени открытого состояния.

Рецепторно-канальный комплекс ГАМК_C Cl-канала был впервые описан в 1975 году (Johnston G.A.R., Curtis D.R., Beart P. M et al., 1975), а его принадлежность к типу ГАМК-каналов была определена только в последние годы. Канальные и фармакологические свойства отличаются от свойств семейства ГАМК_A-каналов (Bormann J., Feigenspan A., 1995). Время открытого состояния ГАМК_C-канала составляет 150-200 мс, проводимость 3-7 пСм, рецептор характеризуется очень медленной десенситизацией (Bormann J., Hamill O.P., Sakmann B., 1987).

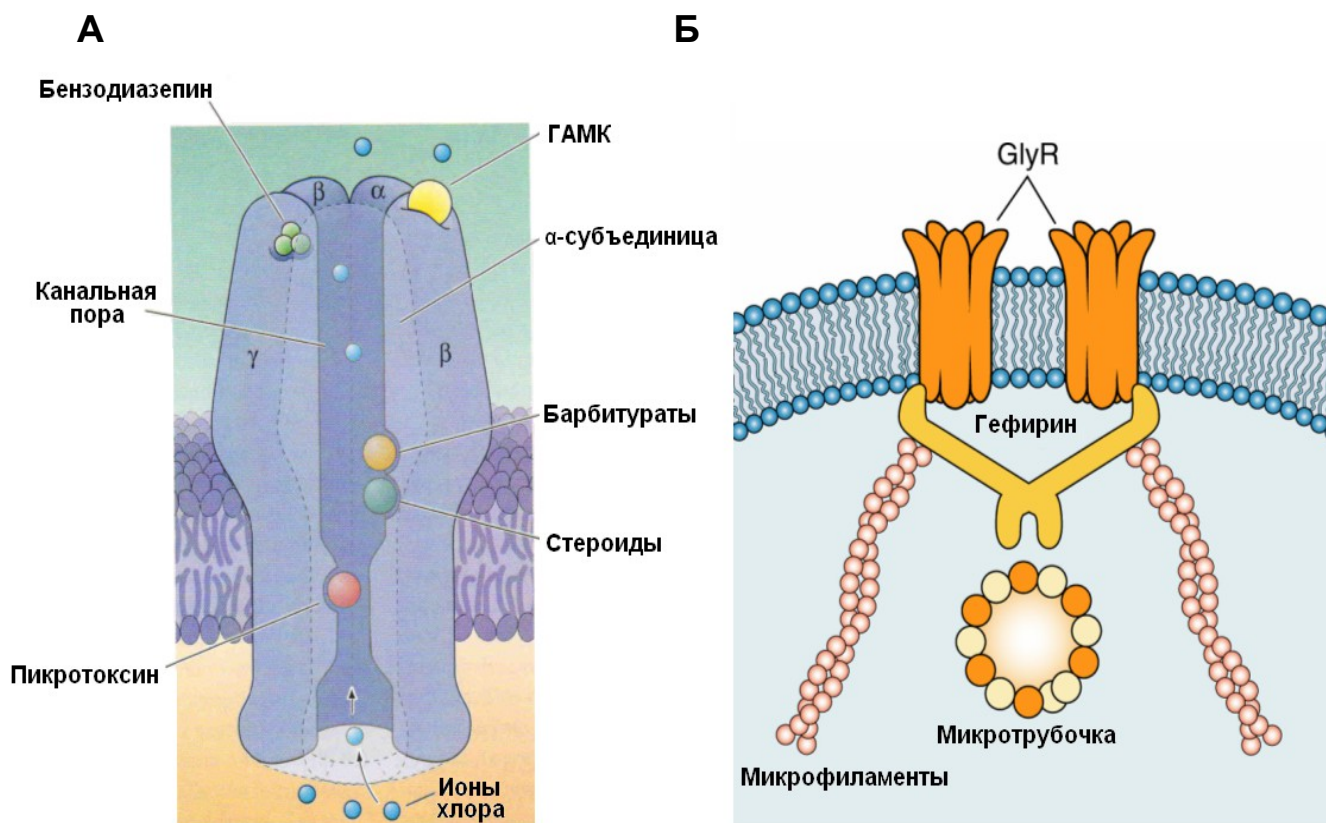


Рис. 23. ГАМК- и глицин- активируемые Cl-каналы

А – показан вертикальный срез ГАМК_A рецептора, состоящий из двух α -, двух β - и одной γ -субъединиц. ГАМК и барбитураты связываются с α - и β -субъединицами, а бензодиазепины – с γ -субъединицей (Из Neuroscience, ed. Purves D. et al, 2001 с изменениями), Б – Взаимодействие глициновых рецепторов (GlyR) и их связь с внутриклеточным цитоскелетом с помощью белка гефирина. (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006 с изменениями).

ГАМКс-каналы были обнаружены в пресинаптических нервных окончаниях сетчатки позвоночных (Lukasiewicz P.D., Maple B.R., Werblin F.S., 1994, Qian H., Dowling J.E, 1993, Qian H., Dowling J.E., 1995), и, по-видимому, участвуют в процессах обработки зрительной информации, модулируя секрецию медиатора в биполярных клетках (Lukasiewicz P.D, 1996). ГАМКс-каналы были также обнаружены в передней доле гипофиза (Boue Grabot E., Dufy B., Garret M., 1995) и грудном ганглии омапа (Jackel C., Krenz W.D., Nagy F., 1994).

Три различные субъединицы ГАМКс-канала, названные ρ_{1-3} , были клонированы из разных тканей (Enz R., Branstatter J.H., Wassle H., Bormann J., 1996). Оказалось, что только две из них участвуют в функционировании канала – ρ_1 и ρ_2 . Третья субъединица была локализована в мозге иммуногистохимическими методами, но ее функции остаются неясными (Enz R., Branstatter J.H., Wassle H., Bormann J., 1996). ρ_1 и ρ_2 субъединицы могут формировать функционирующий канал, будучи экспрессированными в ооциты *Xenopus*. (Lukasiewicz P.D., 1996).

Большая часть фармакологических исследований ГАМКс-каналов проведена на препаратах сетчатки крысы или ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих рекомбинантные субъединицы ρ_1 и ρ_2 . ГАМКс-каналы чувствительны к пикротоксину (Qian H., Dowling J.E, 1995), аналогам ГАМК и нечувствительны к бикикуллину и баклофену, селективному агонисту ГАМК_B-рецепторов (Bormann J., Hamill O.P., Sakmann B., 1987). Показано, что в биполярных клетках сетчатки крысы регуляция ГАМКс-канала включает фосфорилирование при помощи протеинкиназы C через G-белок. Показано также, что дофамин и активаторы аденилатциклазы (форсколин) селективно уменьшают токи через ГАМКс-каналы. Предположено, что дофамин модулирует функцию ГАМКс-каналов в нервной системе позвоночных животных (Dong C.J., Werblin F.S., 1994).

Глицин-активируемые Cl-каналы. Известно, что глицин присутствует в ЦНС, являясь тормозным медиатором. Было показано, что глицин ингибирует освобождение медиатора в культуре гранулярных клеток мозжечка (Engblom A.C., Eriksson K.S., Akerman K.E, 1996). Глицин-активируемые Cl-каналы были продемонстрированы в синаптонейросомах различных отделов мозга крысы

(Engblom A.C., Eriksson K.S., Akerman K.E, 1996), где аппликация глицина вызывает вход Cl , который блокируется стрихнином – ингибитором постсинаптических глицин-активируемых каналов. Эффекты стрихнина и пикротоксина, специфического ингибитора ГАМК_A-каналов, являются аддитивными, что указывает на сосуществование глицин-активируемых и ГАМК_A-каналов в мозге крысы. Глициновый рецептор был первым рецептором, изолированным из ЦНС млекопитающих (Pfeiffer F., Betz H., 1981). Он был первоначально очищен с использованием алкалоида стрихнина, к которому проявлял высокое сродство. Одновременно был очищен гефирин - протеин массой 93 кДа, который соединяет глициновый рецептор белками цитоскелета в постсинаптической области (Prior P. et al., 1992). Гефирин также колокализуется с ГАМК_A-рецепторами (Sassoe-Pongnetto M. et al., 1995). Структура субъединиц глицин-активируемых Cl -каналов имеет те же основные характеристики, что и субъединиц ГАМК_A-каналов (рис. 23 Б). Используя стрихнин – селективный агонист каналов, были выделены несколько полипептидов молекулярной массой 50-60 кДа. Масса рецепторного комплекса составляет 250 кДа. Канал состоит из α и β субъединиц в пропорции 3/2. Для открытия канала необходимо связывание двух молекул глицина, проводимость канала составляет 45 пСм (Wahl P., Elster L., Schouboe A, 1994). Было показано, что в спинном мозге амфибий также, как и у млекопитающих имеются рецепторы глицина и ГАМК_A, проявляющие свойства перекрестного ингибирования агонистами, что свидетельствует о взаимосвязи этих двух рецепторных комплексов (Kalinina N.I., Kurchavyi G.G., Amakhin D.V., Veselkin N.P., 2009).

Кальций-активируемые Cl -каналы (Cl_{Ca} -каналы). Cl -каналы, активируемые внутриклеточным кальцием, обнаружены во многих клеточных типах, включая эпителиальные, нервные, гладкомышечные, кардиальные (Jentsch T.J., Thomas J., 2002). Cl_{Ca} -каналы участвуют в регуляции клеточного объема многих клетках (Hoffmann E.K., Simonsen L.O., 1989). В нейронах и мышечных клетках Cl_{Ca} -каналы могут модулировать возбудимость, за счет генерации следовых потенциалов. В обонятельных нейронах Cl_{Ca} -каналы участвуют в трансдукции, так как активируются ионами Ca , входящими через α ГМФ-активируемые каналы (Lowe G., Gold G.H., 1993).

В некоторых нейронах активация этих каналов ведет к уменьшению возбудимости аксона и нервных окончаний, вследствие чего снижается освобождение медиатора и ингибируется ритмическая активность. Активация Cl_{Ca} -каналов может вызываться фосфорилированием Ca/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II. При детальном изучении Cl_{Ca} -каналов в эмбриональной культуре нейронов спинного мозга Xenopus было обнаружено два типа каналов: макси- и мини Cl-каналы (Hussy N., 1992). Макси-каналы имеют проводимость 310 пСм и обладают потенциал-зависимой инактивацией. Мини-каналы имеют проводимость от 3 до 70 пСм и не инактивируются потенциалом. Предполагается, что функциональный канал представляет собой тетрамер из субъединиц массой 38 кДа, связанных дисульфидными мостиками. При встраивании в липидный бислой протеин образует анионный канал с проводимостью 25-30 пСм. Активность канала увеличивается при действии Ca и Ca/ кальмодулин-зависимой киназы II.

Потенциал-активируемые Cl-каналы (ClC). Каналы присутствуют в возбудимых и эпителиальных клетках. В зависимости от их распределения в тканях они выполняют ряд функций – таких как стабилизация МП покоя, регуляция клеточного объема (Jentsch T.J., Steinmeyer K., Pusch M., Schwappach, 1995). Каналы обнаружены как в плазматической мембране, так и во внутриклеточных органеллах. В аксонах потенциал-зависимая хлорная проводимость настолько мала, что ей обычно пренебрегают, тогда как в скелетных мышцах она даже больше, чем калиевая проводимость в покое. Каналы, ответственные за эту хлорную проводимость, были открыты сравнительно недавно.

Семейство потенциал-активируемых Cl-каналов (ClC) включает 10 различных представителей. Первый член этого семейства (ClC-0) был клонирован из эритроцитов Torpedo, где он стабилизирует МП на одной из сторон электрических клеток, что и позволяет клеткам работать как электрическая батарея. Остальные 9 представителей потенциал-активируемых Cl-каналов, имеющих различное тканевое распределение, обнаружены у млекопитающих. Идентифицировано 9 различных генов у человека, кодирующих ClC-каналы - CLCN1-CLCN7, CLCNKA и CLCNKB. Многие ClC каналы (например, ClC-0, ClC-1, ClC-2) демонстрируют значительные токи

при экспрессии основной α -субъединицы, тогда как CIC-КА и CIC-КВ каналы нуждаются в β -субъединице барритине (рис. 24 А).

CIC-1 каналы экспрессируются в скелетных мышцах и обеспечивают 70–80% проводимости мембраны скелетных мышц в покое. Экспрессия CIC-1 в значительной мере зависит от мышечной активности и возрастает в постнатальный период. Каналы не обнаружены в эмбриональной мышце и культуре мышечных клеток, исчезают после денервации зрелых мышечных волокон. Каналы имеют проводимость – 1 пСм (Pusch N., Jentsch T.J., 1994), поэтому ток одиночного канала очень мал – ниже 0.1 пА. CIC-2 повсеместно экспрессируются в различных тканях и могут активироваться гиперполяризацией, набуханием клетки, внеклеточным закислением. Предполагают их роль в трансэпителиальном транспорте. CIC-3 каналы присутствуют в эндосомах и синаптических везикулах. У мышей, нокаутированных по CIC-3, наблюдается дегенерация гиппокампа и сетчатки, при этом нарушается процесс закисления синаптических везикул, что предполагает роль CIC-3 в обеспечении заполнения везикул медиатором. CIC-4 каналы экспрессируются в скелетных мышцах, сердце и почках.

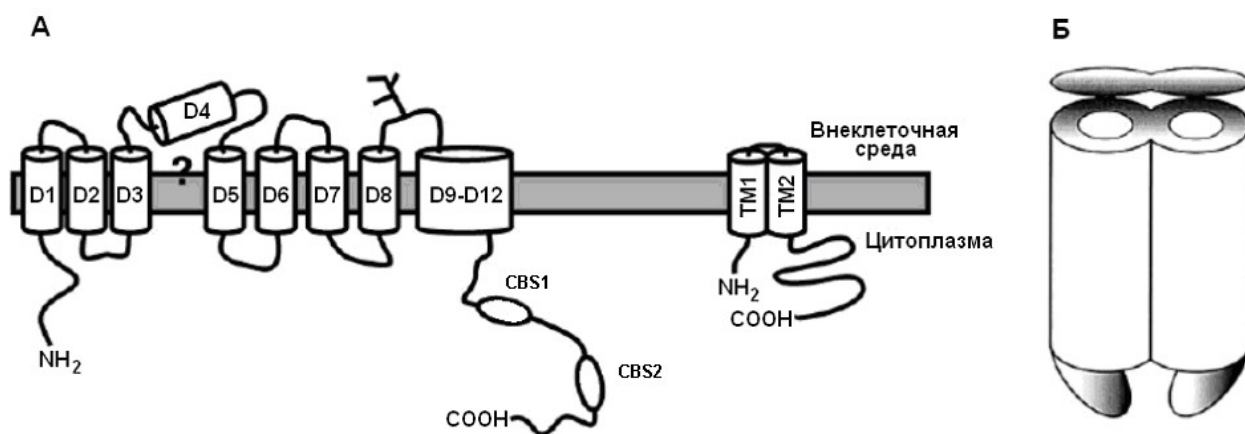


Рис. 24. Топология потенциал-активируемых Cl⁻каналов, основанная на биохимических исследованиях

А – Топология субъединицы Cl⁻канала. Неоднозначные данные получены для области D4/D5. Плохо исследована гидрофобная область между D9 и D12, хотя, ясно, что она имеет нечетное число пересечений мембраны. Карбоксильный конец Cl⁻каналов всех эукариотических клеток имеет два CBS

домена, играющих неспецифическую роль во взаимодействии субъединиц канала. Субъединицы CIC-K каналов связаны с β -субъединицей - барритином, пронизывающую мембрану дважды (на рис.А справа). Б - CIC-канал является димером, каждая субъединица которого имеют пору. Эти две поры могут иметь собственный воротный механизм или один общий у разных типов каналов. (Из Jentsch T.J. et al., 2002 с изменениями).

ClC-5, ClC-КА и ClC-КВ специфичны для почек и формируют анионные каналы в клетках проксимальных трубочек. Два почечных канала ClC-К представляют собой гетеромерный комплекс с барритином и участвуют в трансэпителиальном транспорте в различных сегментах нефрона. Кроме того, ClC-КА/барритин и ClC-КВ/барритин важны для секреции K^+ во внутреннем ухе. Мало изучены ClC-6 и ClC-7, которые были клонированы 7 лет назад и характеризуются внутриклеточной локализацией. ClC-7 канал экспрессируется в остеокластах и его мутации ведут к остеопорозу (Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A., 2002).

Исследования последних лет свидетельствуют, что, по всей видимости, ClC каналы представляют собой димеры с порой в каждой субъединице (Jentsch et al., 2002, Fahlke C., 2001) (рис. 24 Б). Гидропатический анализ белка ClC-0 хлорного канала предположил наличие 13 гидрофобных доменов, пересекающих мембрану, и называемых D1-D12 (Jentsch T.J., 2002) (рис. 24). Для ClC-0 характерны два уровня проводимости 10 и 20 пСм, что отражает открытие одной и двух пор соответственно. Процессы активации ClC-0 происходят независимо для каждой поры (быстрые активационные ворота), тогда как инактивация характерна для обеих пор одновременно (медленные инактивационные ворота). Члены даже одного семейства ClC каналов могут иметь разные электрофизиологические характеристики. Например, ClC-0 и ClC-1 открываются при деполяризации мембраны и закрываются при гиперполяризации, а ClC-2 активируются гиперполяризацией и закрываются при положительных потенциалах (Mindell J.A., Maduke M., 2001). Некоторые из каналов также управляются изменением pH, набуханием клетки и фосфорилированием (Edry-Schiller J., Ginsburg S., Rahamimoff R., 1991).

3.4. Кальциевые каналы

Ca-каналы обеспечивают поступление ионов Ca в цитоплазму клетки и выполняют очень важные и многочисленные функции. Это участие в электрогенезе, поддержание определенной внутриклеточной концентрации ионов Ca, инициация секреции медиаторов и гормонов, формирование кратковременных и долговременных форм синаптической пластичности в ЦНС, регуляция экспрессии генов и т.д. (Костюк П.Г, 1992, Cowan W.M., Sudhof T.C.,

Stevens C.F, 2000). Различают Са-каналы плазматической мембраны и внутриклеточных органелл. Первые - обеспечивают поступление в цитоплазму внеклеточного кальция, вторые - кальция, запасенного во внутриклеточных структурах. К этим структурам относят митохондрии и гладкий ЭПР (в мышце - саркоплазматический ретикулум (СПР)). На мембранах ЭПР и СПР описаны два основных типа лиганд-активируемых Са-каналов: инозитолтрифосфатные и рианодиновые (Балезина О.П., 2002).

Са-каналы плазматической мембраны. Первоначально по порогу активации были выделены высокопороговые, активирующиеся при значительных сдвигах МП, и низкопороговые Са-каналы, открывающиеся при потенциалах близких к МП покоя. Далее на основе чувствительности к дигидропиридинам (ДГП) высокопороговые каналы были разделены на ДГП-чувствительные (L-тип, long lasting) и ДГП-нечувствительные (N-тип, neither T nor L или neuronal). К блокаторам L-типа Са-каналов относятся нимодипин, нифедипин, верапамил, тетрандипин, дилтиазем, D-600, этанол, ионы Cd, токсин морской змеи *Conus Geographus*, называемый ω -конотоксином GVIA. Блокаторами N-типа Са-каналов являются ω -конотоксин GVIA, а также ионы Cd, Ni, Co, La. Другой тип высокопороговых каналов, обнаруженный в клетках Пуркинье мозжечка и названный P-тип (Purkinje) Са-каналов, блокируется ядом воронковых пауков, пептидным токсином FTX, ω -агатоксином IVA и ионами Cd, Co, La. При исследовании Са-каналов, чувствительных к агатоксину, экспрессированных в ооциты, оказалось, что часть каналов имеет низкую чувствительность к агатоксину (200 нМ), тогда как чувствительность P-типа каналов намного выше (20 нМ). Было предположено, что имеется другой тип высокопороговых каналов, который назвали Q-типом. Различия между P- и Q-типами Са-каналов незначительны, поэтому их часто объединяют и обозначают как P/Q-тип Са-каналов. Низкопороговые каналы были названы T-типом каналов (T-transient). Показано, что антигипертензивное вещество мибефрадил селективно блокирует T-тип Са-каналов (Perez-Reyes E., 1999). Поскольку L, N, P/Q, T-типы Са-каналов являются потенциал-активируемыми, заблокировать Са-вход можно длительной деполяризацией, небольшой по величине (для инактивации T-типа Са-каналов), и смесью, содержащей блокаторы Са-каналов - дигидропиридин, ω -конотоксин GVIA и ω -агатоксин IVA в высоких

концентрациях. Однако, и после этого сохраняется остаточный Ca-ток еще через один тип каналов, которые получили название R-каналы. Потенциал активации R-типа Ca-каналов находится между потенциалами активации высоко- и низкопороговых каналов. Активность R-типа каналов блокируется ионами Ni в низкой концентрации (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al, 1999).

Структура Ca-каналов. Гены, кодирующие некоторые типы Ca-каналов, клонированы, определены аминокислотные последовательности основных канальных субъединиц (Witcher D.R., De Waard M., Sakamoto J. et al 1993). Оказалось, что большие участки канала структурно гомологичны как потенциал-активируемым Na-, так и K-каналам. Ca-каналы состоят из 5 субъединиц: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ . $\alpha 2$ и δ субъединицы связаны дисульфидными мостиками и являются единым комплексом (Рис. 25). Поэтому в нервной системе млекопитающих функционирующий Ca-канал образуют 3 отдельные субъединицы – $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β , а $\alpha 1$ субъединица формирует пору канала. Определена первичная структура 10 различных $\alpha 1$ субъединиц, которые были первоначально обозначены от А до I (CACNA-CACNI). S-ген кодирует $\alpha 1$ -субъединицу в скелетной мышце и в нервной системе. Ca-канал L-типа состоит из $\alpha 1C$ или $\alpha 1D$ субъединицы, N-типа - из $\alpha 1B$ – субъединицы, P/Q-типа - из $\alpha 1A$ -субъединицы, T-типа – из $\alpha 1G$ – субъединицы. Если экспрессировать α -субъединицы без других субъединиц, то свойства образованного Ca-канала будут схожи со свойствами T-типа Ca-канала. Предположено также, что R-тип каналов формируется $\alpha 1E$ -субъединицей. Нейрональная $\alpha 1A$ -субъединица экспрессируется в ЦНС, двигательных нервных окончаниях, Шванновских клетках, причем различные ее сплайс-варианты обуславливают различия в электрофизиологических характеристиках канала от быстро инактивирующегося Q-типа канала до медленно инактивирующегося P-типа.

Различные сплайс варианты гена CACNA1C кодируют L-тип Ca-каналов в сердце ($\alpha 1Ca$) и гладкой мышце ($\alpha 1Cb$), тогда как основная субъединица L-типа Ca-канала в скелетной мышце $\alpha 1S$ кодируется другим геном CACNA1S. В физиологических условиях экспрессируется две $\alpha 1S$ изоформы: более редкий белок с молекулярной массой 212 кДа и усеченная форма с массой 190 кДа,

составляющая 95% общей популяции каналов, образуемая в результате посттрансляционного протеолиза (Malouf N.N., McMahon D.K., Heinsworth C., Kay B.K., 1992). Показаны также функциональные изменения канала, например, посредством фосфорилирования, однако, физиологическое значение этих влияний не определено.

Недавно предложена новая номенклатура Ca-каналов, которая разделяет их на три структурно и функционально связанных семейства (Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3). L-тип Ca-тока опосредуется Ca_v1 семейством $\alpha1$ -субъединиц. Ca_v2 каналы формируют отдельное семейство, в котором клонированы $Ca_v2.1$ субъединицы, проводящие P или Q- тип Ca-тока, $Ca_v2.2$ субъединицы, проводящие N-тип Ca-тока и $Ca_v2.3$ субъединицы, проводящие R-тип Ca-тока. T-тип Ca-тока обеспечивается Ca_v3 каналами. Значительные структурные особенности среди трех классов $\alpha1$ -субъединиц приводят к существенным различиям в их регуляции. Семейство Ca_v1 Ca-каналов регулируется фосфорилированием через систему протеинкиназ. Ca_v2 семейство каналов регулируется прямым связыванием с G-белками. Для каналов Ca_v3 типа модуляция G-белками и фосфорилированием менее существенна и плохо изучена (Catterol W.A., 2000).

Разнообразие структуры и функции Ca-каналов увеличивается множественностью β -субъединиц, которые связаны с $\alpha1$ -субъединицей с внутриклеточной стороны мембраны и влияют на инактивацию канала (Witcher D.R., De Waard M., Sakamoto J. et al., 1993). Было обнаружено 4 гена, кодирующие β -субъединицу. Путем альтернативного сплайсинга каждый из генов производит больше одного белка. Различные изоформы β -субъединиц определяют кинетику и потенциал-зависимость воротного механизма, поэтому связь с различными β -субъединицами может существенно изменить свойства $\alpha1$ -субъединицы. Идентифицированы также гены, кодирующие $\alpha2\delta$ -субъединицы, которые имеют относительно небольшой функциональный эффект на воротный механизм каналов. Недавно была описана γ -субъединица, которая оказывает влияние на потенциал-зависимость воротного механизма Ca-канала. γ -субъединица состоит из 4 трансмембранных сегментов и экспрессируется в мышце и мозге (рис. 25).

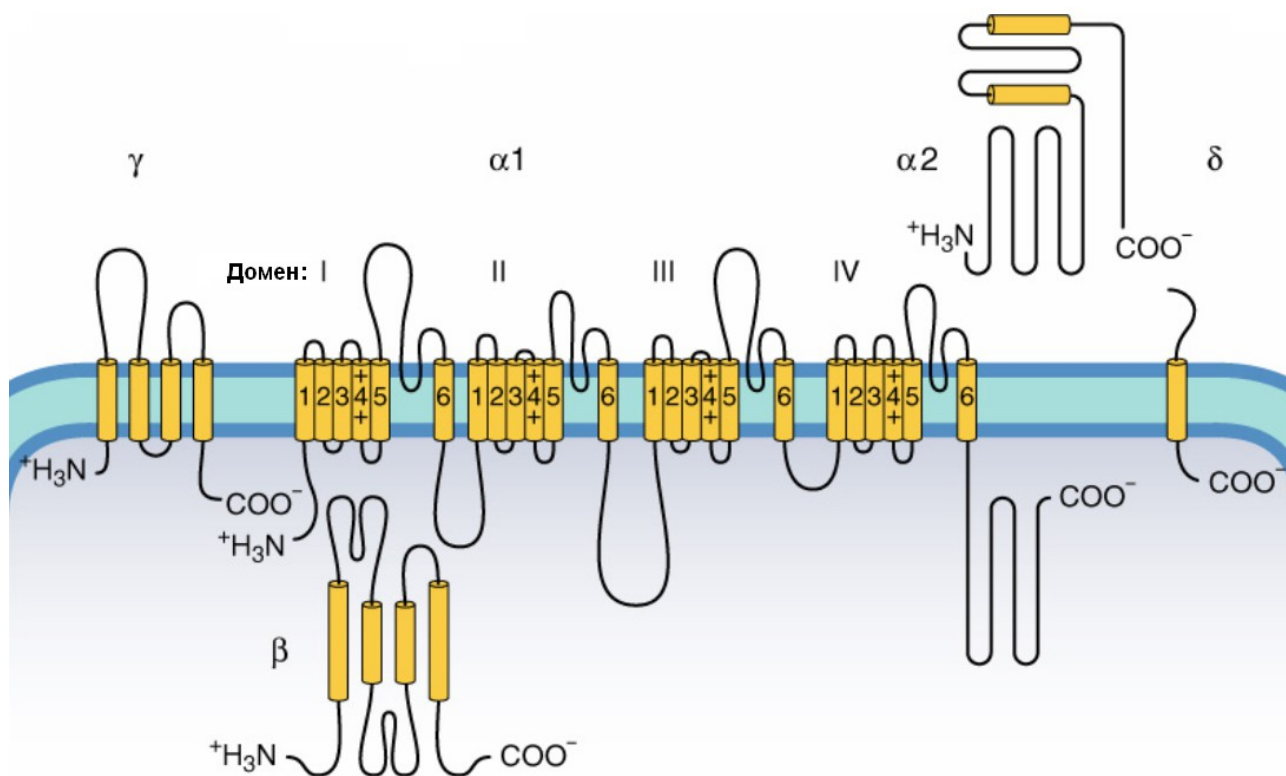


Рис.25. Первичная структура субъединиц Са-канала.

Представлены субъединицы, образующие Са-канал: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ . $\alpha 1$ субъединица формирует пору канала. $\alpha 2$ и δ субъединицы связаны дисульфидными мостиками и являются единым комплексом. (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006 с изменениями).

Внутриклеточные Са-каналы. Хотя цитоплазматическая концентрация свободных ионов Са мала, значительное количество Са находится во внутриклеточных структурах. Запасенный в них Са может высвобождаться в ответ на адекватные стимулы через Са-каналы. В различных клетках описано большое количество структур, которые утилизируют внутриклеточный кальций (Pozzan T., Rizzuto R., Volpre P., Meldolesi J., 1994, Kaznacheeva E.V., Zubov A., Gusev K. et al., 2001, Балезина О.П., 2002), главными из которых являются гладкий ЭПР.

На мембране гладкого ЭПР нервных клеток описаны, по крайней мере, два основных типа лиганд-активируемых Са-каналов: рианодиновые (Ри) и инозитолтрифосфатные (ИФ₃). В последние годы быстро растет число

свидетельств существования и других разновидностей внутриклеточных Са-каналов, избирательно активируемых внутриклеточными метаболитами (НАД⁺, НАДФ⁺, циклическая АДФ-рибоза и др.), однако, их свойства пока мало изучены (Kiselev K., Muallem S., 1999, Балезина О.П., 2002).

Показано, что аккумулирующие ионы Са цистерны и трубочки, являющиеся продолжением гладкого ЭПР, встречаются не только в телах нейронов, но и в их отростках, включая дендриты и терминали (Henzi V., MacDermott A.V., 1992). В нервных окончаниях имеется пул мембранных структур, аналогичных цистернам гладкого ЭПР. Их количество не превышает 1-2% от объема терминали. В отличие от мышечных клеток, в нейронах и нервных окончаниях полная реконструкция геометрии Са-содержащих цистерн пока еще не сделана (Pozzan T., Rizzuto R., Volpre P., Meldolesi J., 1994). Показано, что каналы Ри- и ИФ₃-рецепторов присутствуют в гиппокампе, таламусе, мозжечке и других отделах ЦНС. С помощью иммуноцитохимического маркирования каналы ИФ₃-рецепторов обнаружены в пресинаптических нервных окончаниях фоторецепторных и биполярных клеток сетчатки, а также в синаптических бутонах таламических нейронов (Sharp A.H., McPherson P.S., Dawson T.M. et al., 1993).

Са-каналы Ри-рецепторов. Этот тип внутриклеточных Са-каналов активируется ионами Са и вызывает кальций-вызванное освобождение кальция из гладкого ЭПР и СПР в нервных клетках, скелетной, гладкой и сердечной мышцах. Внутриклеточные Са-каналы обеспечивают длительное поддержание высокой внутриклеточной концентрации ионов Са, обеспечивают сокращение мышц и возникновение Са-волн. Ри-рецепторы были обнаружены во многих тканях, в каждой из которых может экспрессироваться более одной изоформы. В составе внутриклеточных мембран молекулы Ри-рецепторов группируются в тетрамерные комплексы (рис. 26). Мономер мышечного Ри-рецептора это трансмембранный полипептид с молекулярной массой ~ 565 кДа, имеющий гидрофильный сегмент, формирующий цитоплазматический домен, который соединяет щель между мембранами Т-трубочки и СПР. При взаимодействии с Са (0.5-5.0 мкМ) или Mg-АТФ (1-5 мМ) он способен образовывать Са-канал, по которому ионы Са поступают из полости ретикулума в цитоплазму. Проводимость канала Ри-рецептора, встроенного в искусственный липидный

бислой, составляет 200-400 пСм (Рубцов А.М., Батрукова М.А., 1997). Повышение уровня Са выше 10-50 мкМ – приводит к инактивации канала. Тетрамер Ри-рецептора находится в тесном взаимодействии с целым рядом белковых молекул таких, как кальсеквестрин и кальмодулин (Балезина О.П., 2002, Dulhunty A.F., Pouliquin P., 2003).

В настоящее время охарактеризованы три разновидности молекул Ри-рецепторов (Балезина О.П., 2002), все они имеются в нервной ткани, но наиболее распространенным в ЦНС является второй тип (Henzi V., MacDermott A.V., 1992). Первый и второй типы Ри-рецепторов активируются (помимо Са и АТФ) рианодином и кофеином, однако, различаются чувствительностью к дантролену, который инактивирует лишь первый тип (Znao F., Li P., Chen S.R. et al., 2001). Третий тип Ри-рецепторов активируется ионами Са, рианодином (в наномолярных концентрациях), не чувствителен к действию кофеина и блокируется дантроленом (Балезина О.П., Букия А.Н., Лаптева В.И., 2001, Znao F., Li P., Chen S.R. et al., 2001). Растительный алкалоид рианодин может оказывать разнонаправленное действие на молекулу Ри-рецептора. Связываясь с ней в участке с высоким сродством (5-10 нМ), рианодин приводит к удержанию Са-канала в открытом, но низкопроводящем состоянии. При взаимодействии с молекулой Ри-рецептора в высоких концентрациях (5-30 мкМ), рианодин вызывает блокаду канала (Ehrlich V., Kaftan E., Besprozvannaja S., Besprozvanniy I., 1994, Балезина О.П., Сурова Н.В., Лаптева В.И., 2001). Кофеин при связывании с Ри-рецептором, во-первых, сенсibiliзирует молекулу Ри-рецептора к ионам Са, а, во-вторых, способен сам открывать Са-канал (Ehrlich V., Kaftan E., Besprozvannaja S., Besprozvanniy I., 1994). К числу блокаторов Са-каналов Ри-рецепторов относятся ионы магния, рианодин (в концентрациях 10-50 мкМ), прокаин и рутений красный.

Недавно было показано, что Ри-рецепторы в симпатических нервных окончаниях морской свинки и в клетках Пуркинье мозжечка могут участвовать в освобождении медиатора. В нервно-мышечном соединении мышцы рианодин усиливает кальций-зависимое освобождение медиатора (Nishimura M., Tsubaki K., Yagasaki O., Ito K., 1990). В сердце освобождение Са из внутриклеточных депо инициируется Са-входом через быстроактивируемые Са-каналы Т-типа и поддерживается Са-каналами L-типа во время фазы плато ПД. Кальций

активирует Ри-рецепторы 2-типа, экспрессируемые в сердечной и гладкой мышцах.

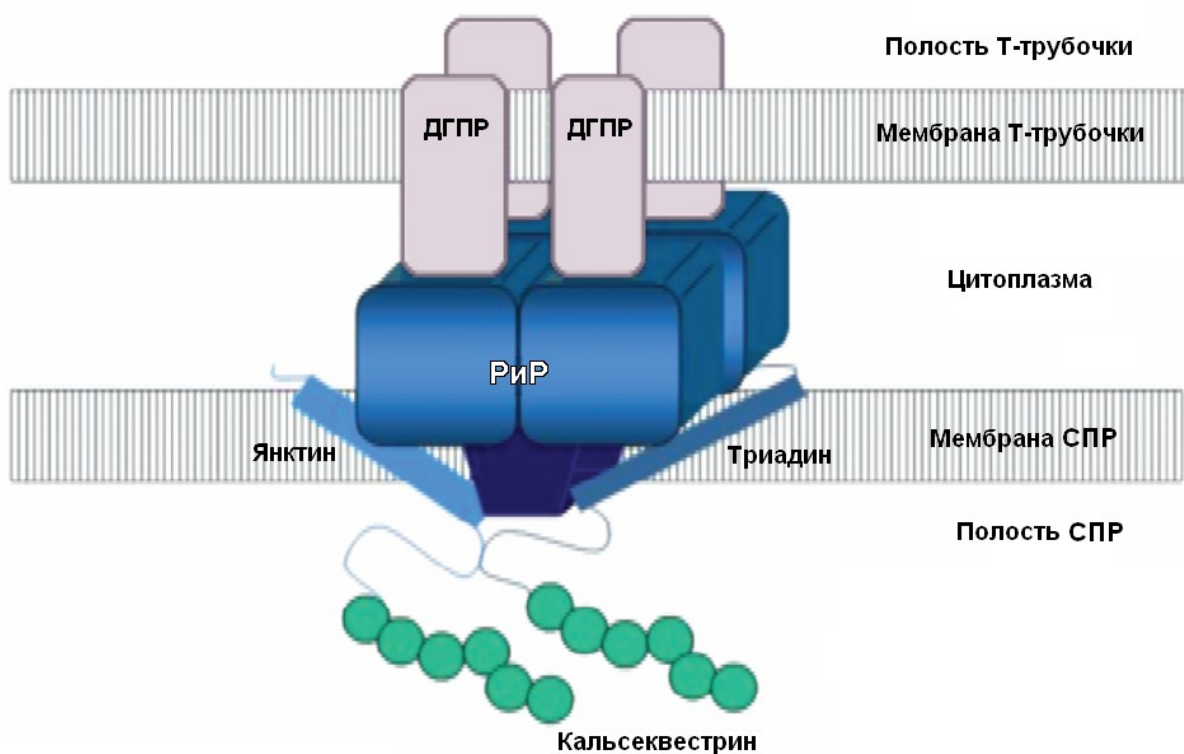


Рис. 26. Схема, показывающая тетрамерную структуру рианодинорецептора, встроенного в мембрану саркоплазматического ретикула скелетной мышцы.

Рианодинорецептор (РиР) имеет трансмембранную часть, содержащую ионный канал и встроенную в мембрану саркоплазматического ретикула (СПР), а также цитоплазматическую гидрофильную часть, которая заполняет пространство между мембранами СПР и Т-трубочки. Четыре молекулы дигидропиридинового рецептора (ДГПР) формируют тетраду, связанную с РиР. Показан также белок, связывающий кальций – кальсеквестрин и белки, заякоривающие РиР в мембране - триадин и янктин. (Из Dulhunty A.F., Pouliquin P., 2003 с изменениями).

В скелетной мышце освобождение кальция опосредуется Ри-рецепторами, которые локализованы в мембране СПР вблизи Т-трубочек и контактируют с потенциал-активируемыми Са-каналами L-типа (ДГП-рецепторами) с помощью доменов, выступающих в цитозоль. Деполяризация

тубулярной мембраны вызывает конформационные изменения рецептора, что ведет к активации Ри-рецепторов. Этот сигнал, передающийся между Т-тубулярной системой и саркоплазматической мембраной, опосредует связь возбуждение-сокращение в мышце.

Каналы рецептора инозитолтрифосфата (ИФ₃-рецепторы). ИФ₃ относится к вторичным посредникам, образующимся при активации фосфолипазы С гормонами и нейромедиаторами, расщепляющей фосфатидилинозитолдифосфат мембраны (Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D., 2007). ИФ₃ стимулирует высвобождение кальция из ЭПР путем активации ИФ₃-рецепторов, что обеспечивает запуск целого ряда внутриклеточных Са-зависимых процессов: активацию Са-кальмодулин-зависимых протеинкиназ, сокращение гладких мышц, секрецию медиатора и др. Общие принципы строения и функционирования ИФ₃-рецептора во многом сходны с таковыми у Ри-рецептора. ИФ₃-рецептор представляет собой тетрамер, образованный мономерами с молекулярными массами порядка 300-350 кДа (рис. 27). Ионный канал ИФ₃-рецептора имеет проводимость порядка 45 пСм (Henzi V., MacDermott A.B., 1992, Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D., 2007). Описаны три изоформы молекул ИФ₃-рецепторов, которые различаются степенью чувствительности к ИФ₃. Все три формы представлены в ЦНС. Молекула ИФ₃-рецептора имеет высокоаффинный (нМ) сайт связывания ИФ₃, которого нет в молекуле Ри-рецептора. Активность ИФ₃-рецептора также зависит от концентрации ионов Са в цитоплазме. Поэтому иногда кальций называют коактиватором ИФ₃-рецептора. Конкурентным ингибитором связывания ИФ₃ с молекулой рецептора является гепарин (Ehrlich B., Kaftan E., Vesprozvannaja S., Vesprozvanniy I., 1994). Показано, что ИФ₃ активирует также Са-каналы в плазматической мембране нервных окончаний мозга (Ueda H., Tamura S., Fukushima N. et al., 1996), вызывая Са-вход через поверхностную мембрану и освобождение Са из внутриклеточных депо (Finch E.A., Turner T.J., Goldin S.M., 1991, Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D., 2007).

На срезах гиппокампа показано, что в центральных глутаматергических синапсах опустошение внутриклеточных Са-депо терминалей циклопиазоновой кислотой приводит к быстрому развитию специального Са-тока через каналы

наружной мембраны, называемые "**CRAC-каналы**" (Ca-Release-Activated Ca-channels). Этот ток значительно увеличивает частоту миниатюрных постсинаптических сигналов и может быть прекращен с помощью ионов лантана, блокирующих CRAC-каналы, либо заменой наружного раствора на бескальциевый. В последние годы появляются данные о том, что CRAC-каналы принимают участие в регуляции спонтанного и/или вызванного выброса медиатора, в частности, из синаптических бутонов гиппокампа и PC12-клеток (Emptage N.J., Reid C. A., Fine A., 2001)

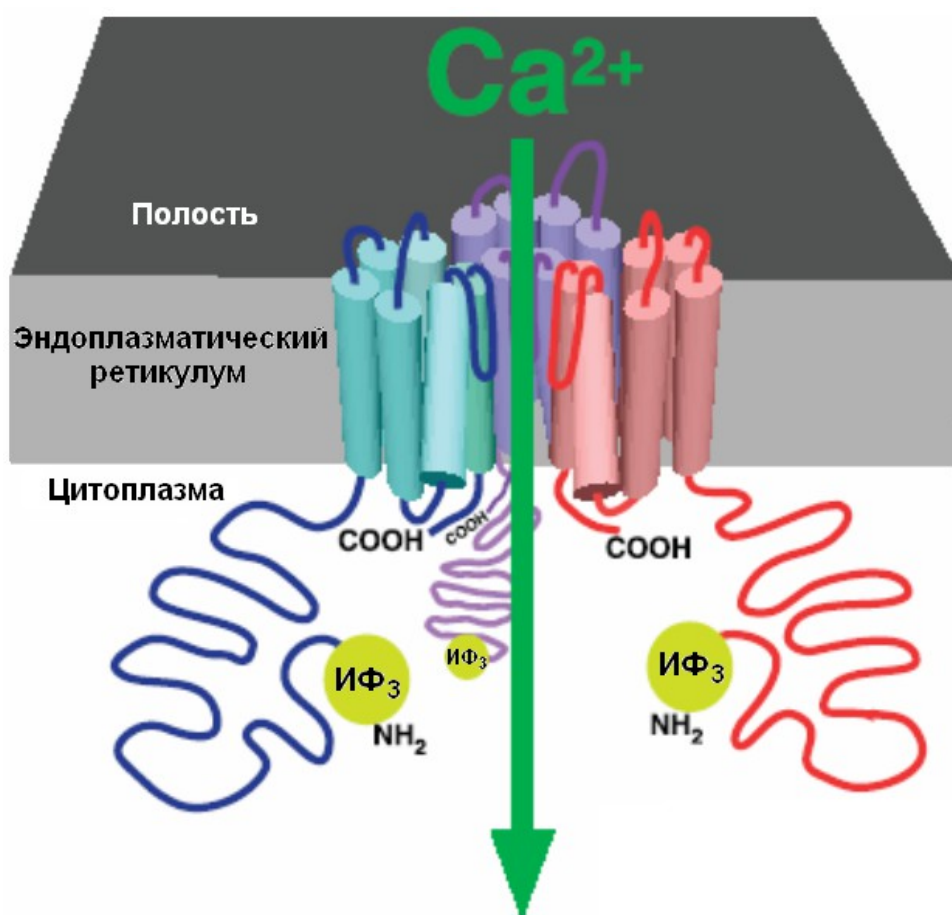


Рис. 27. Рецептор инозитол-3-фосфата.

На схеме изображены три из четырех субъединиц инозитол-3-фосфатного рецептора (ИФ₃), образующих единый тетрамерный канал. Петля, соединяющая 5 и 6 трансмембранный сегменты каждой субъединицы, образуют канал для ионов Ca при связывании цитоплазматических участков N-конца рецептора с инозитол-3-фосфатом. (Из Foskett J.K. et al., 2007 с изменениями).

3.5. Каналы синаптических везикул

В синаптических везикулах, изолированных из нервных окончаний электрического органа Torpedo (Woodbury D.J., 1993, Yakir N., Rahamimoff R., 1995) и нейросекреторных терминалей гипофиза (Lee C.J., Dayanithi G., Nordmann J.J., Lemos J.R., 1992), были идентифицированы несколько типов ионных каналов. Большая часть каналов везикул неселективны (Woodbury D.J., 1993, Yakir N., Rahamimoff R., 1995). Некоторые каналы являются потенциал-активируемыми (Yakir N., Rahamimoff R., 1995) или Ca-активируемыми (Lee C.J., Dayanithi G., Nordmann J.J., Lemos J.R., 1992). В мембране синаптических везикул обнаружены Cl-каналы низкой проводимости (Yakir N., Rahamimoff R., 1995) и неселективные каналы, проводящие ионы K и Cl и активирующиеся при изменении МП и повышении Ca (Rahamimoff R., DeRiemer S.A., Ginsburg S. et al., 1990, Rahamimoff R., DeRiemer S.A., Sakmann B. et al., 1988, Rahamimoff R., Fernandez J.M., 1997). Проводимость канала составляет 246 пСм, он открывается при потенциале около 0 мВ и не активируется при гиперполяризации мембраны (Thomas L., Hartung K., Landgosh D. et al., 1988). Синаптические везикулы имеют сложный жизненный цикл, который включает образование, заполнение классическим медиатором (или пептидами), движение к пресинаптической мембране, докирование и прайминг в активной зоне, экзоцитоз с освобождением медиатора и последующий эндоцитоз с восстановлением везикулы. Вероятно, ионные каналы играют определенную роль на каждом этапе жизненного цикла синаптической везикулы, а при встраивании в плазматическую мембрану могут обеспечивать дополнительную проводимость (Meir A., Rahamimoff R., 1999, Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al. 1999, Rahamimoff R., Fernandez J. M., 1997, Zimmermann H., Volkhardt W., Wittich B., Hausinger A., 1993).

3.6. Лиганд-активируемые неселективные ионные каналы

Каналы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (Н-АХ-рецепторов). Ацетилхолин будучи медиатором центральной и периферической нервной системы взаимодействует с двумя видами холинорецепторов: мускариновыми и никотиновыми (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price

D.L., 2006). Эти подтипы отличаются по специфичности взаимодействия с рядом агонистов и антагонистов АХ. Мускариновые АХ-рецепторы избирательно возбуждаются мускарином и являются метаботропными рецепторами. Никотиновые рецепторы возбуждаются в ответ на аппликацию никотина и являются неселективными лиганд-активируемыми ионными каналами, способными пропускать ионы Na и K. Н-АХ-рецепторы являются наиболее изученными лиганд-активируемыми каналами благодаря наличию специфического нейротоксина, способного связываться с рецептором и блокировать его функцию, и обнаружению большого количества этих рецепторов в электрических органах рыб. Н-АХ-рецепторы, присутствующие на постсинаптической мембране мышечных и нервных клеток, участвуют в реализации синаптической передачи. Электрическая стимуляция нервных окончаний приводит к освобождению АХ в синаптическую щель, который связывается с Н-АХ-рецепторами. Открытие каналов рецепторов приводит к деполяризации мембраны, возникновению постсинаптического потенциала и ПД (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price D.L., 2006).

Мышечные Н-АХ-рецепторы представляют собой пентамерную структуру, состоящую из двух α и по одной β , γ и δ -субъединиц (Рис. 28). Для связывания с АХ необходимо присутствие α -субъединицы. В эмбриональной мышце экспрессируется комплекс $\alpha_2\beta\gamma\delta$, в процессе развития γ -субъединица замещается на ε -субъединицу. Это замещение ведет к увеличению проводимости и уменьшению времени открытого состояния канала. Диаметр Н-АХ-рецептора в самой широкой внеклеточной части составляет 8.5 нм, а длина АХ-рецептора – 11 нм. Внеклеточная часть АХ-рецептора выдается над поверхностью мембраны на 5 нм. Диаметр центральной поры составляет примерно 0.7 нм. Связывание молекул АХ с анионными участками α -субъединиц приводит к открытию поры канала диаметром 6.5 нм, селективно пропускающего катионы. С учетом анализа гидрофобности субъединиц, данных электронной микроскопии и кристаллографии были предложены модели топологии пептидных цепей и организации субъединиц. α -субъединица содержит четыре трансмембранных домена (M1-M4) с длинным N-терминальным и коротким C-терминальным доменами с внеклеточной стороны мембраны. Эта конфигурация предполагает наличие двух цитоплазматических петель – короткой между M1 и

M2 и более длинной, содержащих сайты фосфорилирования - между M3 и M4 (рис. 28). Несколько остатков N-терминального домена участвуют в формировании участка связывания с АХ и определяют связь между субъединицами при сборке пентамера. Для открытия канала необходимо связывание с двумя молекулами АХ, при этом возникает движение ионов Na и K через канал (Siegel G.J.; Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006).

Нейрональные Н-АХ-рецепторы можно разделить на 2 класса: чувствительные к никотину и чувствительные к антагонисту мышечных Н-АХ-рецепторов α -бунгаротоксину (Sakmann B., 1978). Нейрональные Н-АХ-рецепторы состоят из 5 субъединиц. Это, в основном, α и β субъединицы в пропорции 2:3. Обнаружено, по крайней мере, 13 генов, кодирующих субъединицы нейрональных Н-АХ-рецепторов (α_{2-10} и β_{2-5}) в центральной и периферической нервной системе (Cooper E., Couturier S., Ballivet M., 1991, Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999). Некоторые субъединицы были клонированы ($\alpha_{4,5,7}$ и $\beta_{2,4}$). Учитывая возможные комбинации субъединиц, количество изоформ рецепторов в нервной системе может достигать нескольких тысяч. Большинство нейрональных Н-АХ-рецепторов, содержащих α_2 - α_6 -субъединицы, нечувствительны к α -бунгаротоксину и другим змеиным α -токсинам. α -субъединицы имеют сходные последовательности с мышечной α_1 -субъединицей и образуют участки связывания с лигандом. β -субъединицы выполняют роль γ и δ -субъединиц в мышечном рецепторе. Наиболее распространенной комбинацией в ЦНС является комбинация субъединиц $\alpha_4\beta_2$. Рецепторы, содержащие α_7 субъединицы, имеют высокую проницаемость для ионов Ca. Н-АХ-рецепторы в ЦНС, располагаясь пресинаптически, модулируют освобождение ряда медиаторов. Показано, что глутаматергические, дофаминергические, серотонинергические, пептидергические и холинергические пути в ЦНС находятся под контролем Н-АХ-рецепторов. При открытии каналов нескольких десятков активированных пресинаптических рецепторов может возникнуть значительная деполяризация мембраны нервного окончания с резким увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca (Steinbach J.H., 1990), что должно приводить к усилению секреции медиатора.

Фармакологическая активация пресинаптических рецепторов АХ стимулирует освобождение дофамина в стриатуме крысы, норадреналина и АХ в гиппокампе крысы, ГАМК в таламусе мыши, АХ в коре крысы и человека (Clarke P.V., Reuben M., 1996, De Sarno P., Giacobini E., 1989, Rowell P.P., 1995). В периферической нервной системе пресинаптические Н-АХ-рецепторы расположены на холинергических нервных окончаниях и являются ауторецепторами. На основе эффектов специфических активаторов и блокаторов было предположено, что эти рецепторы в нервно-мышечном соединении крысы, мыши и морской свинки вовлечены в положительную обратную связь регуляции освобождения медиатора (Correia De Sa. P., Ribeiro J. A., 1994, Vizi E.S., Somogyi G.T., 1989, Wessler I., Apel C., Garmsen M., Klein A., 1992). Различные соединения могут модулировать активность пресинаптических Н-АХ-рецепторов. Активаторами являются никотин лобелин, карбамилхолин, суберилдихолин, (+)-анатоксин и др. К ингибиторам относятся D-тубокурарин, панкуроний, гексаметоний, мекамиламин, α -бунгаротоксин, триметафан и др. (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al ., 1999). Показано, что при заболевании Альцгеймера, болезни Паркинсона и шизофрении происходит уменьшении количества нейрональных Н-АХ-рецепторов в коре мозга, которое предшествует дегенерации холинергических и дофаминергических нейронов.

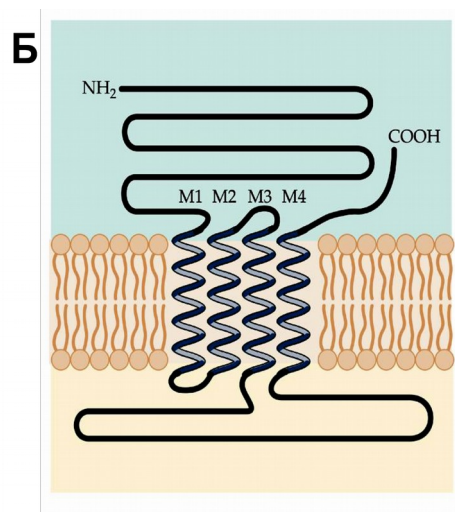
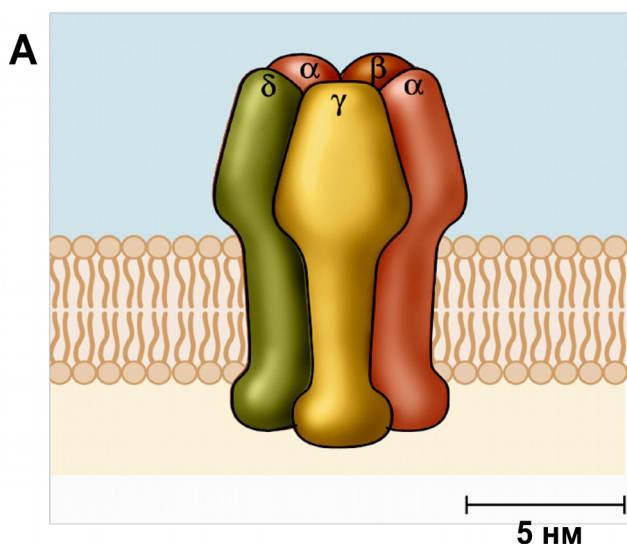


Рис. 28. Структура никотинового холинорецептора

А – Н-АХ-рецептор состоит из пяти субъединиц (2 α , β , γ и δ), расположенных радиально с углом около 72° вокруг центра, что обеспечивает формирование центральной поры. Б – топология α -субъединицы Н-АХ-рецептора. Аминокислотная последовательность имеет 4 трансмембранных спирали (M1-M4), а COOH- и NH₂-концы обращены во внеклеточное пространство. (Из Nicholls J.G. et al., 2003).

Каналы глутаматных рецепторов. Глутамат является самым распространенным в мозге медиатором и активирует шесть различных классов рецепторов (рис. 29), три из которых являются ионотропными рецепторами (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006). Каждый класс имеет собственные фармакологические и функциональные особенности. Существенных различий в фармакологических свойствах пре- и постсинаптических глутаматных рецепторов выявлено не было (Greenamyre J.T., Porter R.H., 1994). По названиям агонистов, вызывающих специфические физиологические ответы, выделяют рецепторы N-метил-D-аспартата (**НМДА**), α -амино-3-гидроксил-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты (**АМПА**) и **каината**. Все три класса глутаматных рецепторов обнаружены в ЦНС, причем во многих отделах мозга рецепторы сосуществуют (Raiteri M., Garrone B., Pittaluga A., 1992).

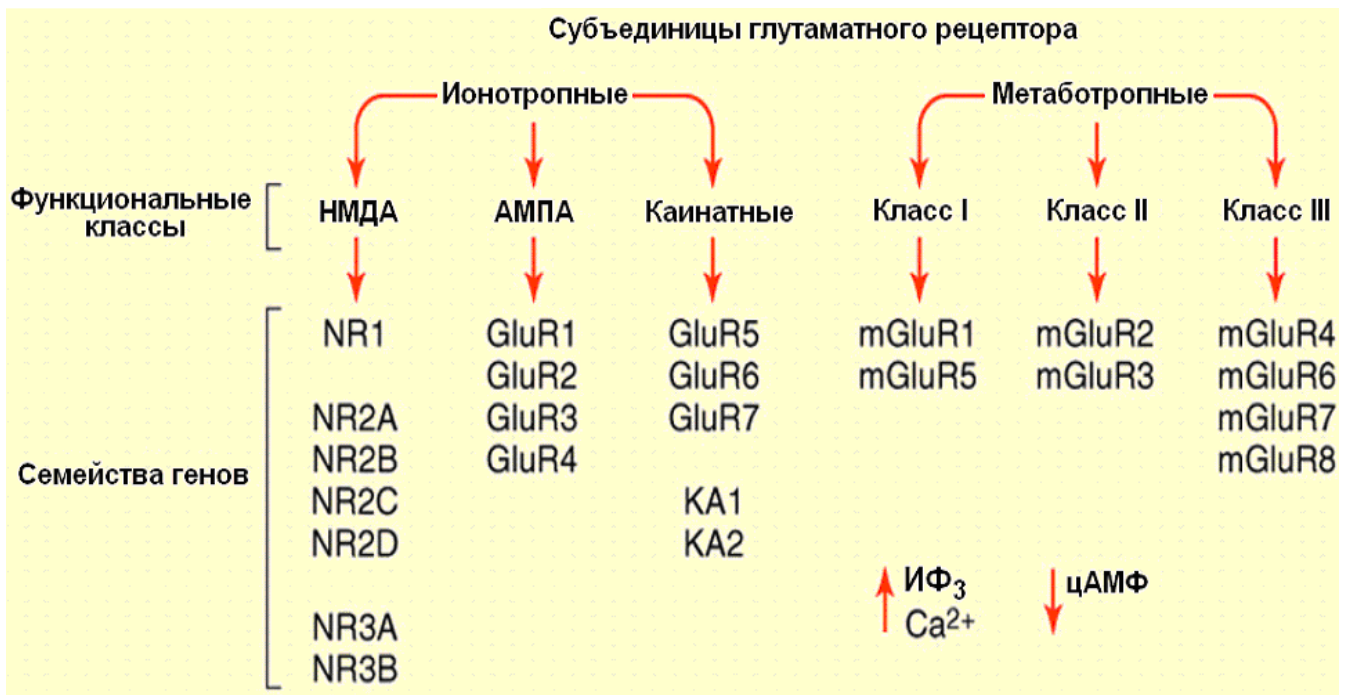


Рис. 29. Функциональные и молекулярные разновидности рецепторов глутамата.

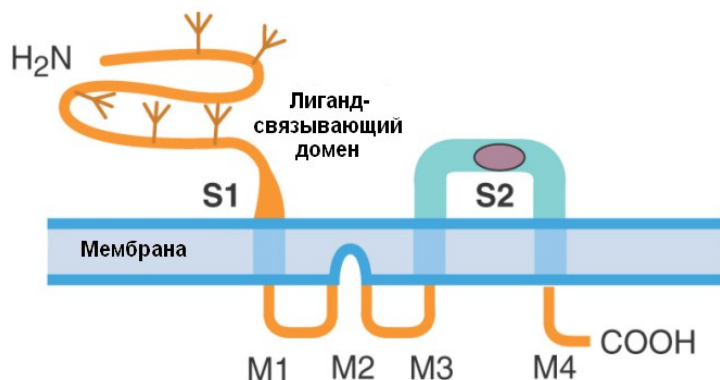
Два основных типа глутаматных рецепторов (ионотропные и метаботропные) включают по три функционально различные класса рецепторов. Каждый из рецепторов в классе состоит из отдельных субъединиц, кодирующихся различными генами. Субъединицы ионотропных рецепторов глутамата образуют ионные каналы, проницаемые для катионов. Метаботропные рецепторы глутамата - это G-белок-связанные рецепторы, активация которых регулирует синтез или деградацию внутриклеточных вторичных посредников. (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006 с изменениями).

Рецепторы различаются по составу субъединиц и аффинности к глутамату - для НМДА - это 1 мкМ, для АМПА – 400 мкМ. Функциональное значение постсинаптических глутаматных рецепторов состоит в передаче возбуждения между нейронами, тогда как пресинаптические рецепторы модулируют освобождение глутамата и других медиаторов ЦНС. Идентифицировано более 16 генов млекопитающих, кодирующих субъединицы глутаматных рецепторов. В настоящее время описано шесть семейств субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов, обладающих около 80% гомологией. Лиганд-активируемый канал представляет собой тетрамерный комплекс, различные комбинации субъединиц образуют функционально различные рецепторы (рис. 30). Трансмембранная топология глутаматного рецептора отличается от таковой никотинового рецептора. Полипептид содержит три трансмембранных домена M_1 , M_2 и M_4 (Bennet J. A., Dingledine R., 1995, Магазаник Л.Г, Большаков К.В., Булдакова С.Л. и др., 2000, 2001). NH_2 -конец направлен внеклеточно, $COOH$ -конец – внутриклеточно. M_2 домен формирует петлю-шпильку, образующую внутреннюю пору канала (рис. 30 А). Конфигурация сходна с К-каналами, что предполагает общее происхождение двух классов ионных каналов (Wood M.W., Vandongen H.M.A., Vandongen A.M.J., 1995). Ионные каналы глутаматных рецепторов проницаемы для ионов Na и Ca, но ионная селективность зависит от субъединичной композиции рецептора (рис. 30 Б) (Магазаник Л.Г. и др., 2001, Tikhonov D.B, Magazanik L.G., 2009).

Идентифицировано три семейства генов, кодирующих субъединицы **НМДА-рецепторов**, первое - образовано одним геном NR1, кодирующим полипептид длиной около 900 аминокислот, второе – четырьмя генами – NR2A-NR2D, кодирующих субъединицы длиной около 1450 аминокислот и третье – двумя генами – NR3A-NR3B, кодирующих субъединицы длиной около 100 аминокислот. НМДА-рецепторы в мозге образуют гетеромерный комплекс. НМДА-рецептор - один из наиболее тонко регулируемых рецепторов: имеются не менее шести мест связывания для эндогенных лигандов, влияющих на вероятность открытия ионного канала. К ним относятся активирующие сайты связывания с двумя различными агонистами – глутаматом и глицином, сайт связывания с полиаминами, сайты связывания с ионами Mg, Zn, H. Окислительно-восстановительный статус рецептора также влияет на

проводимость. Одна из трех пар цистеиновых остатков может быть как восстановлена (что усиливает токи через канал), так и окислена с формированием дисульфидных мостиков (что снижает токи).

А



Б

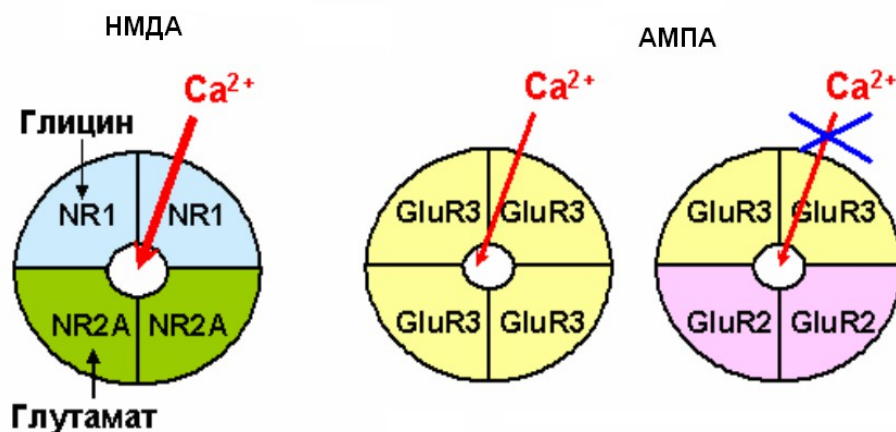


Рис. 30. Структура глутаматного рецептора

А - Трансмембранная топология глутаматного рецептора. Субъединица глутаматного рецептора имеет два домена, содержащих агонист-связывающие участки (S1 и S2). Б - Субъединичная организация НМДА и АМПА рецепторов и их проницаемость для кальция. НМДА-рецепторы состоят из двух разных пар субъединиц, связывающих глутамат (NR2A) и глицин (NR1) и обладают значительной проницаемостью для ионов Ca. АМПА-рецепторы в зависимости от субъединичного состава либо умеренно проницаемы, либо непроницаемы для Ca. При этом все ионотропные глутаматные рецепторы пропускают моновалентные катионы. (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006 с изменениями).

Уникальность НМДА-рецептора заключается в том, что для его активации требуется одновременное связывания двух различных агонистов, поэтому глутамат и глицин называют «коагонистами» НМДА-рецептора. Низкомолекулярные аналоги глицина, включая серин и аланин, также действуют в качестве агонистов глицинового сайта. В обоих случаях D-изомеры более эффективны по сравнению с L-формами. Так D-серин, образующийся сериновой рацемазой, является сильным эндогенным агонистом глицинового сайта. Внеклеточные ионы Mg блокируют ток через канал НМДА-рецептора. Магний снимается при деполяризации мембраны. Протоны снижают частоту открытия канала, и при pH~6.0 активация рецептора полностью подавлена. Связывание полиаминов – спермина или спермидина – снимают протонный блок и, таким образом, усиливают активацию рецептора. В высоких концентрациях полиамины, однако, также вызывают потенциал-зависимый блок ионного канала.

АМПА-рецепторы широко распространены в ЦНС и служат рецепторами быстрой возбуждающей синаптической передачи. Субъединицы GluR1-GluR4 образуют тетрамер с фармакологическим профилем АМПА-рецепторов. Субъединица GluR имеет длину около 900 аминокислот. Такая необычная длина связана с большим N-терминальным внеклеточным доменом. Существует два вида АМПА-рецепторов, имеющих различную кальциевую проницаемость: один из них непроницаем для кальция, а другой обладает умеренной проводимостью (рис. 30 Б). Проницаемость для Ca определяется субъединичным составом рецептора, однако, в любом случае, она будет значительно ниже чем, для НМДА-рецепторов. Ионный канал АМПА-рецептора нечувствителен к магнию, открыт всего несколько миллисекунд и быстро переходит в состояние нечувствительности к активирующему действию глутамата. Этой относительно короткой деполяризации достаточно для того, чтобы снять магний блок НМДА-рецепторов. Субъединицы GluR1-GluR4 соединяясь с KA1 или KA2 также могут образовать **каинатные рецепторы** (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006, Магазанник Л.Г., 2007).

Пресинаптические глутаматные рецепторы модулируют освобождение глутамата или других медиаторов. Обнаружено, что активация НМДА-рецепторов увеличивает секрецию АХ в срезах мозга мыши, норадреналина в

синапсосамах и срезах гиппокампа крысы, норадреналина и глутамата в синапсосамах коры морской свинки (Montague P.R., Gancayco C.D., Winn M.J. et al., 1994, Raiteri M., Garrone B., Pittaluga A., 1992). Пресинаптические АМПА и каинатные рецепторы также могут модулировать освобождение медиатора. АМПА-рецепторы вызывают увеличение освобождения норадреналина в синапсосамах гиппокампа крысы (Pittaluga A., Thellung S., Maura G., Raiteri M., 1994) и ГАМК в культуре клеток сетчатки (Carvalho C.M., Ferreira I.L., Duarte C.V. et al., 1990). Каинатные рецепторы в гиппокампе, по-видимому, играют двойную роль в регуляции секреции медиатора. Начальная их активация приводит к кратковременному увеличению освобождения глутамата, которое сменяется депрессией.

Каналы пуриновых рецепторов (P-рецепторы). Показано, что АТФ и другие нуклеотиды могут функционировать как внеклеточные сигнальные молекулы (Giniatullin R.A., Sokolova E.M., 1998, Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., 2009). Они действуют на большое и разнообразное семейство P_2 -рецепторов, из которых только P_{2x} -рецепторы являются лиганд-активируемыми ионными каналами (Chen Z.P., Levy A., Lightman S. L., 1995). Идентифицировано семь генов, кодирующих субъединицы P_{2x} -рецепторов – P_{2x1-7} . Субъединица P_{2x} -рецепторов имеет два трансмембранных домена с внутриклеточными N- и C-концами, разделенными большой внеклеточной петлей (Рис. 10 и 31). P_{2x} -рецептор это гетеромультимерный протеин, образованный несколькими субъединицами, образующих гомо- или гетеротримерный функциональный ионный канал (Khakh BS, Burnstock G., Kennedy C., et al., 2001, North R.A., 2002). Все P_{2x} -рецепторы проницаемы для мелких моновалентных катионов, некоторые также имеют значительную проводимость для ионов Ca и анионов. Возбуждающие эффекты АТФ в ЦНС показаны в клиновидном ядре, клетках Пуркинье мозжечка, в нейронах вестибулярных и тройничного ядер. На срезах гиппокампа крысы антагонист P_{2x} -рецепторов - пиридоксал-фосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфониловая кислота, действуя пресинаптически, уменьшал амплитуду вызванных возбуждающих постсинаптических токов (Motin L., Bennet M.R., 1995). P_{2x} -рецепторы, обнаруженные в цилиарном ганглии цыпленка, блокировались сурамином, проводимость канала составила 17 пСм (Sun X.P., Stanley E.F.,

1996). Активация пресинаптических P_{2x} -рецепторов не только модулирует освобождение медиатора, но также инициирует сенсорные сигналы без периферического входа (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999). Показана важная роль P_{2x} -рецепторов в модуляции респираторных ответов при гипоксии и гиперкапнии. P_{2x} -рецепторы присутствуют в ноцицептивных нейронах и могут участвовать в передаче боли. Кроме того, АТФ может освобождаться из спинальных интернейронов или терминалей первичных афферентов в спинном мозге и модулировать спинальную ноцицептивную передачу, действуя как на пресинаптические P_{2x} -рецепторы, облегчая освобождение глутамата, так и на постсинаптические P_{2x} -рецепторы, стимулируя быструю возбуждающую передачу (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999).

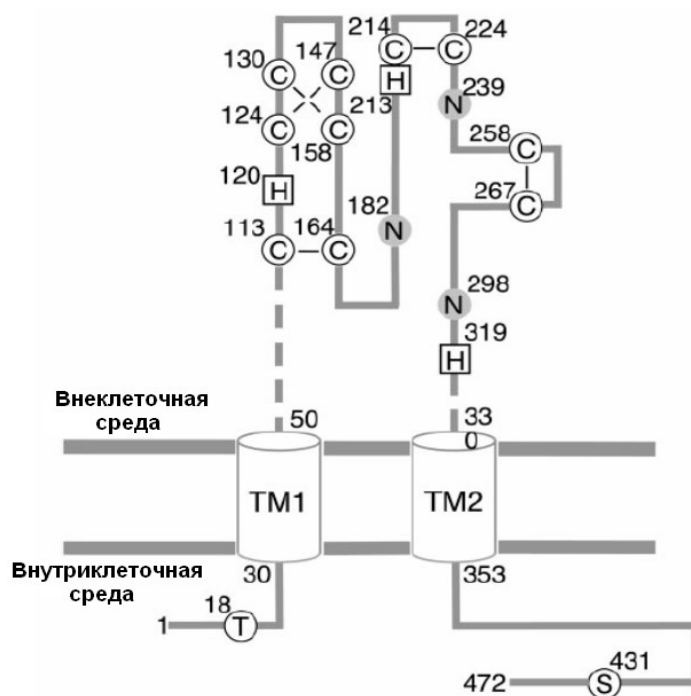


Рис. 31. Трансмембранная топология субъединицы P_{2x} -рецептора.

Субъединица P_{2x} -рецептора имеет два трансмембранных домена (TM1 и TM2). Серые кружочки (N) указывают на сайты гликозилирования, а белые кружочки (T, S) - на положение треонина, фосфорилируемого протеинкиназой С и серина, фосфорилируемого протеинкиназой А. Кружочки С указывают на 10 консервативных цистеинов, образующих дисульфидные связи, а квадратики

H - на остатки гистидина, связывающие цинк (H-120, H-213) и протоны (H-319). (Из North R.A., 2002 с изменениями).

Каналы серотониновых рецепторов (5-НТ-рецепторов). Описано 7 типов 5-НТ-рецепторов (Gyermek L., 1997, Thompson A. J., Lummis S., 2006, 2007). Большинство из них связаны с G-белками, и только один тип (5-НТ₃-рецептор) является катионным неселективным каналом. Основная субъединица рецептора представляет собой полипептид из 487 аминокислот с молекулярной массой ~56 кДа. Последовательность аминокислот гомологична никотиновым, ГАМК_A и глициновым рецепторам (Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J. et al., 1991). 5-НТ₃-рецептор состоит из пяти субъединиц, окружающих центральную ион-проводящую пору (рис. 32).

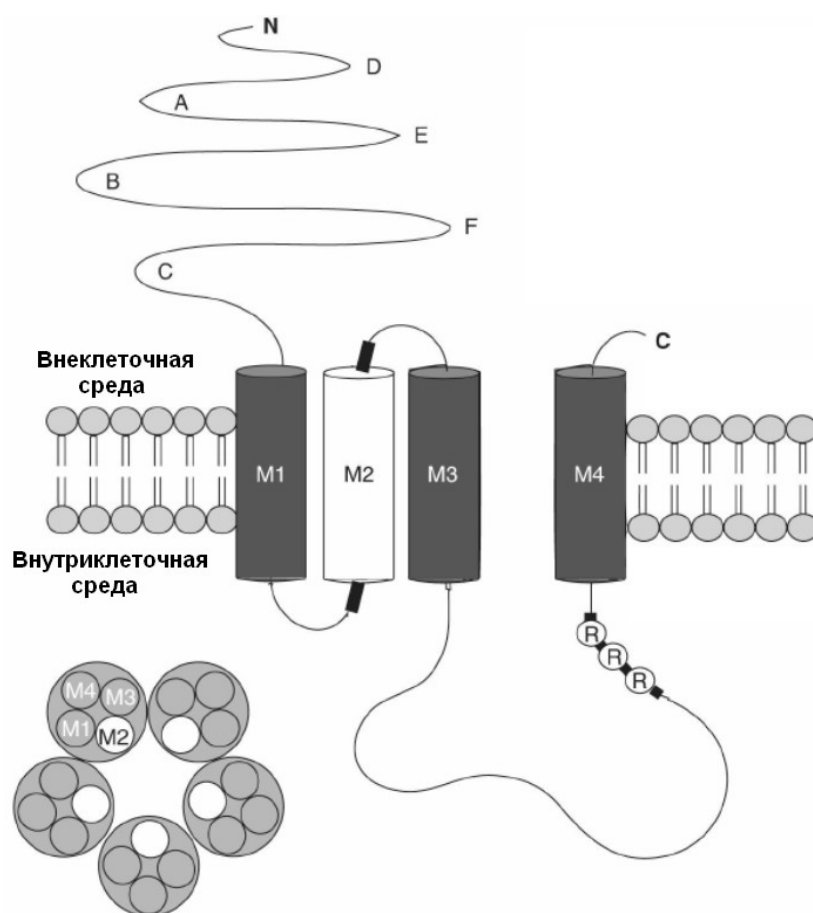


Рис. 32. Схематическое изображение 5-НТ₃-рецептора

Субъединица 5-НТ₃-рецептора состоит из четырех трансмембранных доменов (M1–M4) (вверху). Область A–F каждой субъединицы образует лиганд-связывающий сайт, утолщения с каждой стороны сегмента M2 связаны с ион-селективностью, а область R–R–R влияет на проводимость канала. Внизу представлен поперечный срез трансмембранной области рецептора. Пять субъединиц рецептора формируют центральную ион-проводящую пору,

высланную сегментами M2. (Из Thompson A.J., Lummis S., 2007 с изменениями).

Субъединица 5-HT₃-рецептора состоит из четырех трансмембранных доменов (M1–M4). Внеклеточный N-терминальный домен содержит лиганд-связывающий сайт. M2 домен каждой из субъединиц формирует внутреннее кольцо, непосредственно контактирующее с ионами, внешнее кольцо образовано доменами M1, M3 и M4 (рис. 32). Воротную часть канала образует M2 домен. Связывание 5-HT с рецептором приводит к движению внеклеточного домена, которое передается на M2-домен и открывает ворота (Barnes M., Hales T.G., Lummis S.C.R., Peters J.A., 2009, Thompson A.J., Lummis S., 2006, 2007). Клонированы два типа субъединиц 5-HT₃-рецепторов – 5-HT_{3A} и 5-HT_{3B}. Проводимость канала в разных препаратах варьирует от 0.31 до 16.5 пСм (Jackson M.B., Yakel J.L., 1995). 5-HT₃-рецепторы локализованы постсинаптически и пресинаптически. Пресинаптическая локализация 5-HT₃ рецепторов была показана в различных отделах ЦНС, а именно, в коре и стриатуме крысы, коре человека (Crespi D., Gobbi M., Mennini T., 1997, Maura G., Andrioli G. C., Cavazzani P., Raiteri M., 1992, Nichols R. A., Mollard P., 1996).

В спинном мозге серотонин модулирует ноцицепцию через 5-HT₃-рецепторы. Функция пресинаптических 5-HT₃-рецепторов пока неясна. Возможно, они работают как гетерорецепторы, модулирующие освобождение медиатора. В некоторых объектах фармакологическая активация рецепторов может вызывать увеличение уровня внутриклеточного Ca и усиление секреции (Nichols R.A., Mollard P, 1996), тогда как в других - ингибирование секреции медиатора (Maura G., Andrioli G.C., Cavazzani P., Raiteri M., 1992).

Каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами (ЦН-каналы). ЦН-каналы представляют собой класс ионных каналов, активируемых непосредственно при связывании с цГМФ или цАМФ. В большинстве случаев связывание приводит к входу ионов Ca в клетку, увеличению его цитозольной концентрации и модуляции Ca-зависимых процессов, ведущих к физиологическому ответу клетки. ЦН-каналы являются одним из ключевых звеньев механизмов сенсорной трансдукции в фоторецепторных, обонятельных и слуховых клетках (Каламкаров Г.Р., Лунгина О.Г., 2001). Обычно ЦН-каналы являются неселективными и проницаемы для ионов Na, Ca, K. Они были обнаружены и в некоторых других органах - печени, сердца, мозга, предстательной железы (Kraus-Friedmann N., 2000). ЦН-канал формирует

гетеротетрамёрный комплекс, состоящий из четырех разных, хотя и гомологичных субъединиц, разделяемых обычно на два типа - α и β . Канал структурно относится к семейству потенциал-активируемых каналов. α -субъединица состоит из шести трансмембранных сегментов, имеет участок, образующий ионную пору, а также участки связывания циклических нуклеотидов и Са/кальмодулина (рис. 33). Хотя эти каналы содержат S4 сегмент с положительными остатками, как и потенциал-активируемые К-каналы, они не активируются при деполяризации. В последнее время появились данные, свидетельствующие о широком распространении ЦН-каналов в ЦНС, которые вместе с Са-каналами обеспечивают поступление ионов Са и играют важную роль в нейрональной пластичности и процессах секреции медиатора (Каламкарров Г.Р., Лунгина О.Г., 2001, Zufall F., Firestein S., Shepherd G.M., 1997). Фоторецепторы сетчатки содержат цГМФ-зависимые каналы, которые опосредуют входящий темновой ток во внешнем сегменте фоторецептора.

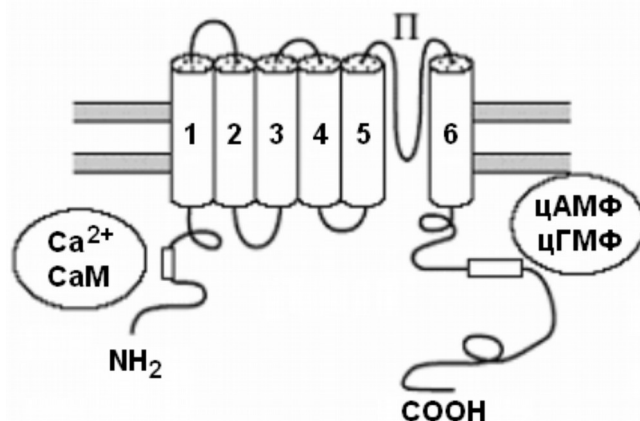


Рис. 33. Структура субъединицы ЦН- канала.

Субъединица ЦН- канала состоит из 6 трансмембранных сегментов, NH₂- и СООН- концы направлены внутриклеточно и содержат участки связывания с Са/кальмодулином и циклическими нуклеотидами (цАМФ или цГМФ). Петля между 5 и 6 сегментами образует пору (П).

Нуклеотид-зависимые каналы, активируемые гиперполяризацией (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated - HCN). Ток ионов через нуклеотид-зависимые каналы, активируемые гиперполяризацией, лежащий в

основе автоматии пейсмекерных клеток миокарда, был обнаружен около 30 лет назад и был назван If-током (f-funny) или Ih-током (h-hyperpolarization activated) (DiFrancesco D., 1981, Brown H.F., DiFrancesco D., Noble S.J., 1979). Этот ток переносится ионами Na и K. Следовательно, активация If-тока во время фазы следовой гиперполяризации вызывает медленную деполяризацию в сторону порогового уровня активации Ca-каналов. Активация HCN-каналов зависит от уровня циклических нуклеотидов. Например, симпатическая стимуляция ведет к активации β -адренорецепторов, что в свою очередь активирует аденилатциклазу. Увеличение внутриклеточного уровня цАМФ сдвигает потенциалзависимость If-тока в положительную сторону примерно на 10 мВ и в результате усиливает входящий ток при более отрицательном МП. Этот механизм ответственен за учащение сердечного ритма (рис. 45). Стимуляция мускариновых рецепторов ацетилхолина замедляет сердечный ритм благодаря активации G-белок управляемых K-каналов, а также вследствие уменьшения внутриклеточного уровня цАМФ и снижения If-токов. Таким образом, каналы, лежащие в основе If-токов, сочетают в себе свойства потенциал-активируемых и лиганд-активируемых каналов (Biel M., Schneider A., Wahl C., 2002).

If-токи были также обнаружены в ЦНС, где они контролируют частоту ритмических осцилляций одиночных нейронов и нейрональных сетей. Кроме того, эти токи участвуют в поддержании МП покоя нейронов и в формировании ответов нейронов на гиперполяризующие токи. Четыре типа HCN-каналов (HCN 1-4) были изолированы у мыши, кролика и человека, они близки по структуре к нуклеотид-зависимым каналам и относятся к суперсемейству потенциал-активируемых катионных каналов. HCN-канал представляет собой тетрамер. Субъединица HCN-канала состоит из 6 трансмембранных сегментов (S1-S6), включающих положительно заряженный сегмент S4 и ион-проводящую пору между пятым и шестым сегментами. На C-терминальном участке имеется нуклеотид-связывающий домен (CNBD) (Рис. 34) (Ludwig A., Zong X., Hofman F., Biel V., 1999). Все четыре представителя HCN-каналов экспрессируются в мозге, а HCN1, HCN2 и HCN4 определены в сердце. При этом в сердце If-ток имеет два кинетически различных компонента (быстрый и медленный), которые вероятно обусловлены активностью различных типов каналов. Кроме того, If-

токи миокарда желудочков значительно отличаются от таковых синоатриального узла по порогу активации.

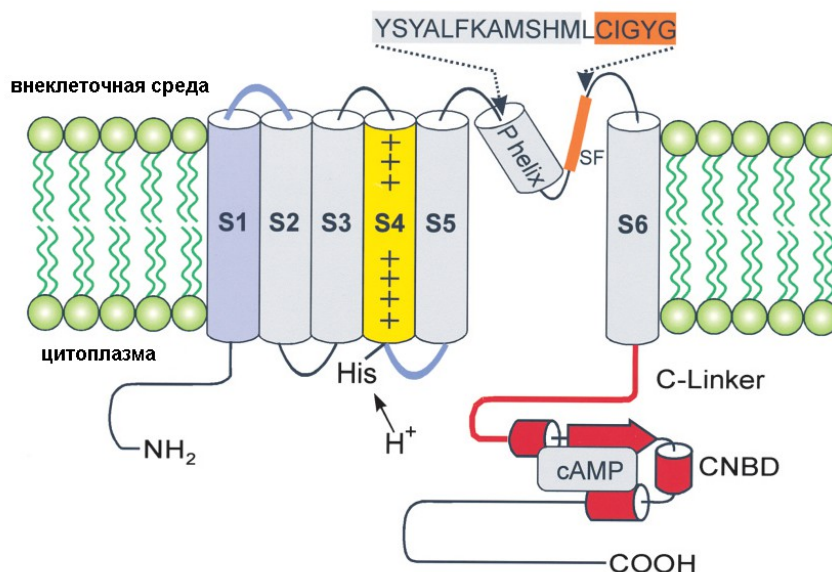


Рис. 34. Структурная модель нуклеотид-зависимых гиперполяризационно-активируемых (HCN) каналов.

Канал состоит из двух функциональных частей. Первая - состоит из трансмембранной (S1–S6) и ион-проводящая области (участок между S5 и S6). Вторая - модуляторная содержит C-linker и нуклеотид-связывающий домен (CNBD). Функция цитозольного N-конца не совсем ясна. Сенсор потенциала канала формируется положительно заряженным S4-сегментом. Указан остаток гистидина (His) между сегментами S4–S5, определяющий чувствительность канала к рН. Пора канала содержит спиральный участок (P helix) и селективный фильтр (SF). (Из Biel M., Schneider A., Wahl C., 2002 с изменениями).

3.7. Стретч-каналы

Каналы, чувствительные к растяжению мембраны (стретч-каналы), обнаружены во многих типах клеток. Это каналы, у которых изменение проводимости является ответом на механическую деформацию мембраны. Механическая энергия передается на канал либо за счет изменения натяжения липидного бислоя, либо через цитоскелет клетки. Выделяют каналы, активируемые или инактивируемые растяжением клетки. Также обнаружены каналы, реагирующие на сжатие клетки. Механочувствительные каналы отвечают на механическую деформацию мембраны изменением вероятности открытия канала. Каналы обнаружены в слуховых клетках, механорецепторах,

мышечных веретенах, сосудистом эндотелии, а также в клетках крови и эпителии. Во многих клетках, были обнаружены как неселективные, так и селективные (для ионов K или Ca^{2+}) стретч-каналы (Sackin H., 1995, Bourque S.W., Oliet S.H., 1997, Ingber D.E., 1997, Ведерникова Е.А., Старущенко А.В., Негуляев Ю.А., 2001, Staruschenko A., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A., 2005, Камкин А.Г., Киселева И.С., Ярыгин В.Н., 2005).

Стретч-каналы могут регулироваться изменениями МП и связыванием с внутриклеточными посредниками (метаболитами арахидоновой кислоты и АТФ) (Morris C.E., 1990). Клонирование механочувствительных каналов началось недавно, один из представителей выделен у *Escherichia coli* – MscL, имеющий проводимость в 3 нСм (Hamill P.O., Martinac B., 2001) (рис.35). Некоторые K-каналы (K_{Ca} -каналы) обладают свойствами стретч-каналов. Хорошо известно, что растяжение нервно-мышечного синапса ведет к увеличению секреции медиатора (Fatt P., Katz B., 1952). Это позволяет считать, что стретч-каналы участвуют в пресинаптических функциях (Hamill O.P., 2006).

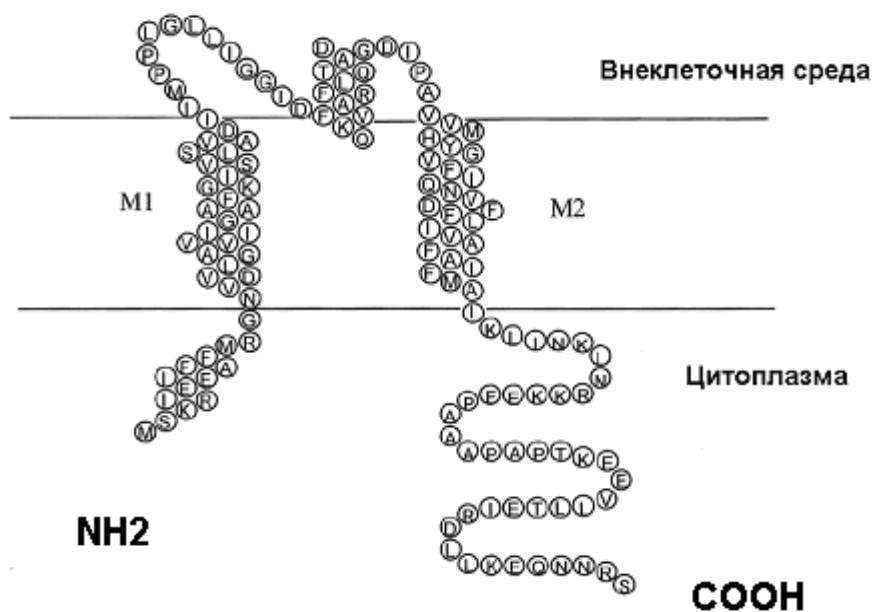


Рис. 35. Топология и аминокислотная последовательность субъединицы механочувствительного канала большой проводимости (MscL) *Escherichia coli*.

Белок имеет в своем составе две мембранопроникающих области (M1 и M2) и одну внеклеточную петлю, N- и C- концы располагаются внутриклеточно. (Из Hamill O.P., Martinac B., 2001 с изменениями).

3.8. Коннексоны

Коннексоны представляют собой каналы, являющиеся морфологической основой щелевого соединения. Щелевое соединение – это участок тесного контакта мембран двух клеток, который обеспечивает сигнализацию и коммуникацию между клетками в нервной системе, а также в сердечной, эпителиальной и гладкомышечных тканях. В нервной системе коннексоны формируют электрические синапсы, осуществляющие межнейрональные, межглиальные и нейрон-глиальные взаимодействия (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002). Коннексон состоит из шести белковых субъединиц-коннексинов, встроенных в мембрану. Выступающая внеклеточная часть способна связываться в межклеточном пространстве с коннексоном соседней клетки так, что образуется непрерывный канал, соединяющий внутреннее пространство двух клеток. В результате между клетками образуется водная пора диаметром 2 нм, пропускающая ионы и мелкие молекулы молекулярной массой до 1.5 кДа (рис. 36 А).

При определенных конформационных изменениях белков канал открывается или закрывается, активируя, либо прекращая передачу информации между клетками через щелевые контакты (Saez J.C., Berthoud V.M., Branes S.C. et al., 2003). Щелевой контакт контролирует проницаемость между взаимодействующими клетками. В некоторых клетках (например, глиальных) подобный механизм имеет значение в регуляции уровня внутриклеточного Ca. Через щелевые контакты проходят низкомолекулярные вещества, регулирующие рост и развитие клеток. Щелевые контакты обеспечивают распространение возбуждения между мышечными клетками миокарда и гладкомышечными клетками. Коннексины - нестабильные белки, живущие несколько часов. Семейство коннексинов кодируется около 20 генами (Cx), экспрессирующимися в различных типах тканей. Все члены семейства коннексинов имеют общую топологию, каждая субъединица имеет четыре трансмембранных домена, внутриклеточные N- и C-концы, одну внутриклеточную и две внеклеточные петли (рис. 36 Б). Проводимость одиночного канала составляет около 100 пСм, вероятность открытого состояния регулируется рН, ионами Ca, Mg, фосфорилированием и другими факторами. Многие клетки образуют несколько видов коннексинов, которые способны

полимеризоваться в различных комбинациях. Объединение шести коннексинов двух типов может образовывать 14 вариантов коннексонов, из которых может образоваться до 196 различных вариантов каналов (Saez J.C., Berthoud V.M., Branes S.C. et al., 2003).

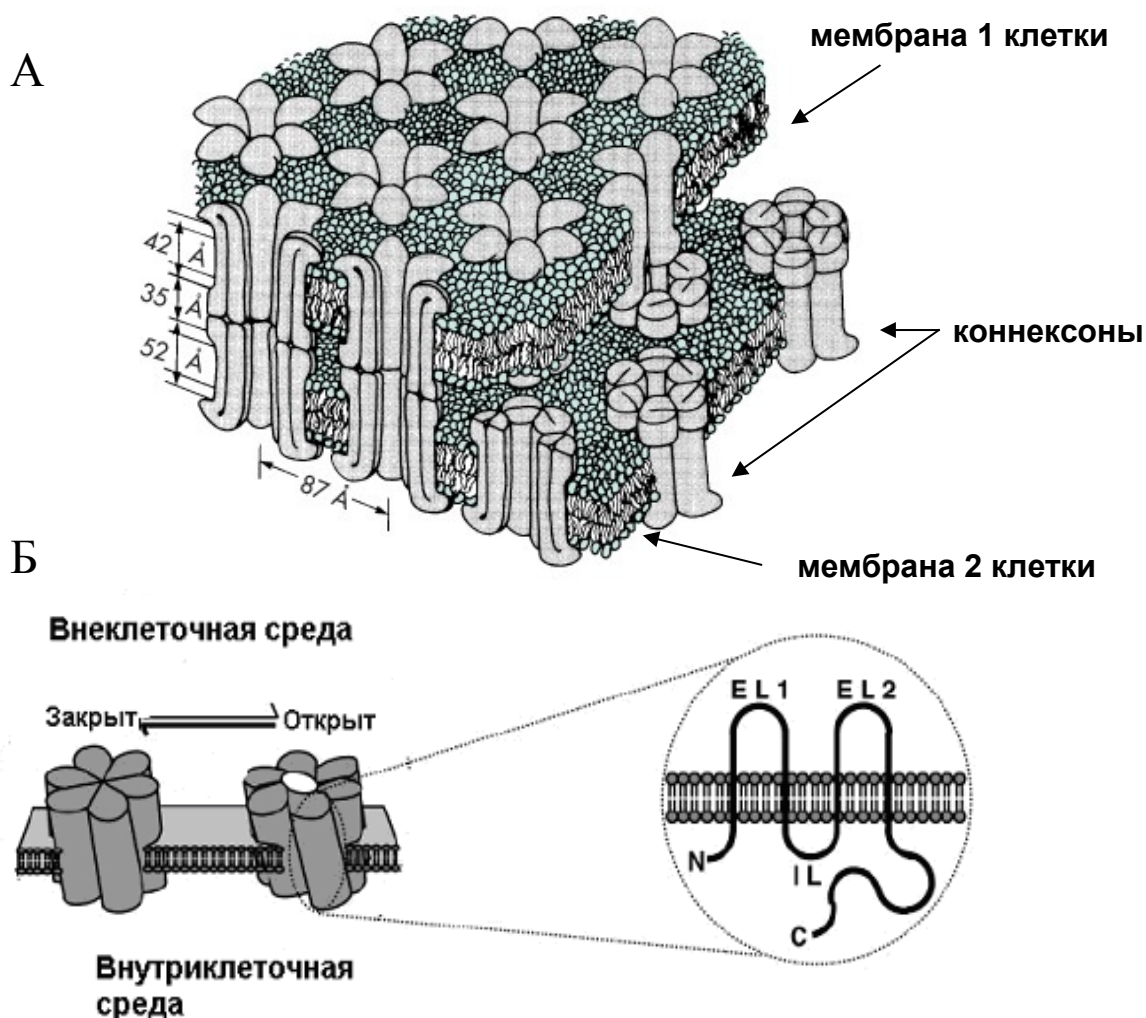


Рис. 36. Локализация и строение коннексонов, образующих щелевой контакт.

А – Щелевой контакт состоит из гексамерных комплексов – коннексонов, присутствующих как на пре-, так и на постсинаптической мембранах. Поры каналов контактируют друг с другом, образуя электрическую связь между клетками. Б – Открытое и закрытое состояние канала коннексона и структура отдельной субъединицы – коннексина. Коннексин четыре раза пронизывает мембрану, имеет внутриклеточные N- и С-концы, две внеклеточные (EL) и одну

внутриклеточную (IL) петлю. (Из Saez J.C., Berthoud V.M., Branes S.C. et al., 2003 с изменениями).

3.9. Протон-активируемые каналы

Протон-активируемые ионные каналы (acid sensitive ion channels - ASICs) впервые были обнаружены в сенсорных нейронах (Krishtal O.A., Pidoplichko V.I., 1980; Krishtal O.A., 2003). Семейство ASIC каналов включает 6 разновидностей: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4 (Waldmann R. et al., 1997 а,б; Chen C.C. et al., 1998; Akopian A.N. et al., 2000). Протон-активируемые каналы, по-видимому, являются тетрамерами, субъединица канала состоит из двух трансмембранных доменов и большой внеклеточной петли (Xiong Z. et al., 2008) (рис. 37). Канал активируется при снижении внеклеточного pH с 7.4 до 6.9 и ниже. Канал типа ASIC1 имеет проводимость ~14 пСм, проницаем для ионов Na и Ca и блокируется амилоридом в концентрациях от 0.1 до 1 мМ.

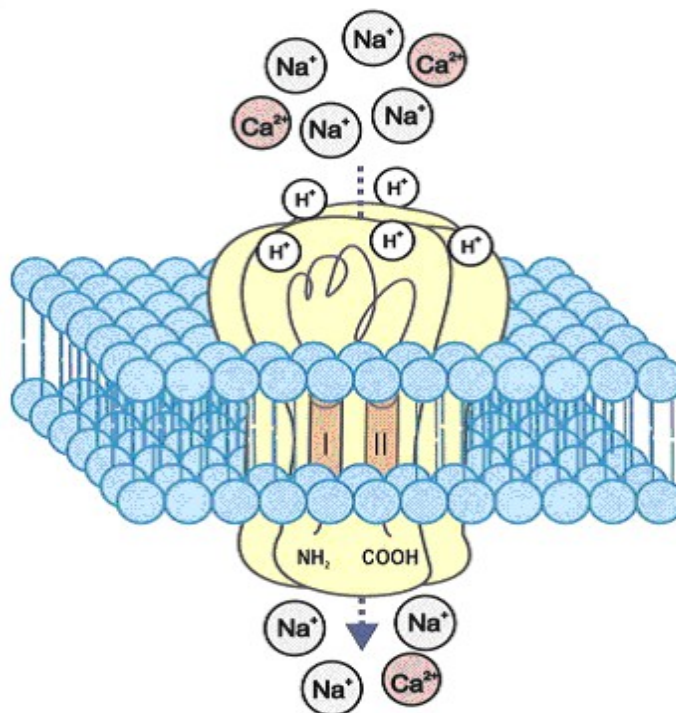


Рис. 37. Тетрамерная структура протон-активируемого ионного канала.

Канал образован четырьмя идентичными или различными субъединицами. Каждая субъединица имеет два трансмембранных домена (I и II), связанных большой внеклеточной петлей, насыщенной цистеинами, с внутриклеточными N- и С- терминальными участками. Для гомомерного канала

ASIC1a активация протонами приводит к току ионов Na and Ca через канал. (Из Xiong Z. et al., 2008).

Считается, что основная функция ASICs – это восприятие боли, вызванной закислением. Некоторые пептиды, а также арахидоновая кислота увеличивают активность ASIC (Smith E.S., Cadiou H., McNaughton P.A., 2007). Протон-активируемые каналы с различной чувствительностью к pH и кинетикой были обнаружены в сенсорных нейронах, а также в нейронах ЦНС, олигодендроцитах (Waldmann R. et al., 1997 а,б, Sharonova I.N., Dvorzhak A.Y., Vorobjov V.S., 2008).

3.10. Аквапорины

Аквапорины (AQP) – семейство мембранных каналов, являющихся селективными для воды во многих тканях и клеточных типах (Venero J L., Vizuete M L., Machado A, Cano J, 2001, Natochin Iu.V., 2002). Аквапорины представляют собой гомотетрамер, в котором каждый мономер состоит из шести мембрано-проникающих доменов с цитоплазматическими С- и N-концами (рис. 38 А). Петли В и Е, соединяющие второй и третий, и пятый и шестой домены, соответственно, частично также являются гидрофобными и необходимы для формирования водной поры. Согласно гипотезы «песочных часов» петли В и Е перекрываются и образуют постоянно открытую узкую пору для молекул воды (рис. 38 Б). (Agre P., 2000). Структура аквапорина-1 была установлена рентгенокристаллографическим методом: определены длина и положение всех спиральных фрагментов и соединяющих их петель, угол, под которым соседние спирали отклоняются друг от друга; определены участки полипептидной цепи, пересекающие мембрану; выяснена роль консервативных аминокислотных остатков и влияние их отдельных боковых групп на стабильность и работу канала. Архитектура канала такова (узкая щель в центре и расширения на противоположных концах), что вода может проникать только в виде тонкой цепочки молекул, соединенных водородными связями. Хотя аквапорины непосредственно не участвуют в формировании трансмембранных ионных токов, но играют важную роль в обеспечении осмотического давления клетки. Аквапорины вовлечены в реабсорбцию воды в почках, секрецию и реабсорбцию цереброспинальной жидкости, образование дыхательных секретов, слезотечение и множество других физиологических процессов. Аквапорины легко проницаемы для воды, но не для ионов (Agre P., Bonhi-

vers M., Borgnia M.J., 1998, Наточин Ю.В., 2007). Плазматическая мембрана всех клеток млекопитающих проницаема для воды, но в разной степени. Идентифицировано 10 типов аквапоринов, каждый из которых имеет собственное распределение в почках, легких, сетчатке, мозге. Первая функциональная группа аквапоринов млекопитающих включает AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 и AQP5, проницаемые только для воды (Agre P., Bonhivers M., Borgnia M.J., 1998). Вторая группа (недавно обозначенная как акваглицеропорины) включает AQP3, AQP7 и AQP8. Эти каналы высокопроницаемы для воды, глицерола и даже более массивных растворенных веществ. Аквапорины могут располагаться не только на плазматических мембранах. Так, AQP6 был впервые идентифицирован как внутриклеточный водный канал, локализованный с H^+ -АТФазой во внутриклеточных везикулах. Это указывает на то, что низкий pH может быть естественным активатором AQP6. Свойство активированных AQP6 пропускать воду оказывает вклад в набухание везикул и слиянии мембран во время экзоцитоза, а также и в других клеточных процессах (Venero J L., Vizquete M L., Machado A, Cano J., 2001). Из известных клонированных аквапоринов только два локализованы в мозге: AQP1 локализован у взрослых животных в хориоидном сплетении, а AQP4 является доминирующим мембранным белком, пропускающим воду в ЦНС (Venero J.L., Vizquete M.L., Machado A., Cano J., 2001).

В ЦНС аквапорины играют важную роль в поддержании гомеостаза воды и ионов калия, что имеет существенное значение во время высокочастотной активности нейронов и в постнатальном периоде, начиная со второй недели, когда пролиферация и рост нейронов сопровождаются уменьшением внеклеточного пространства (Venero J.L., Vizquete M.L., Machado A., Cano J., 2001). AQP4 участвуют в регуляции осмотического равновесия и являются возможными осмосенсорами в нейросекреторных клетках супраоптических ядер гипоталамуса, которые регулируют диурез, выделяя вазопрессин. Аквапорины принимают участие в продукции спинномозговой жидкости и играют ключевую роль в развитии отека мозга (Venero J.L., Vizquete M.L., Machado A., Cano J., 2001).

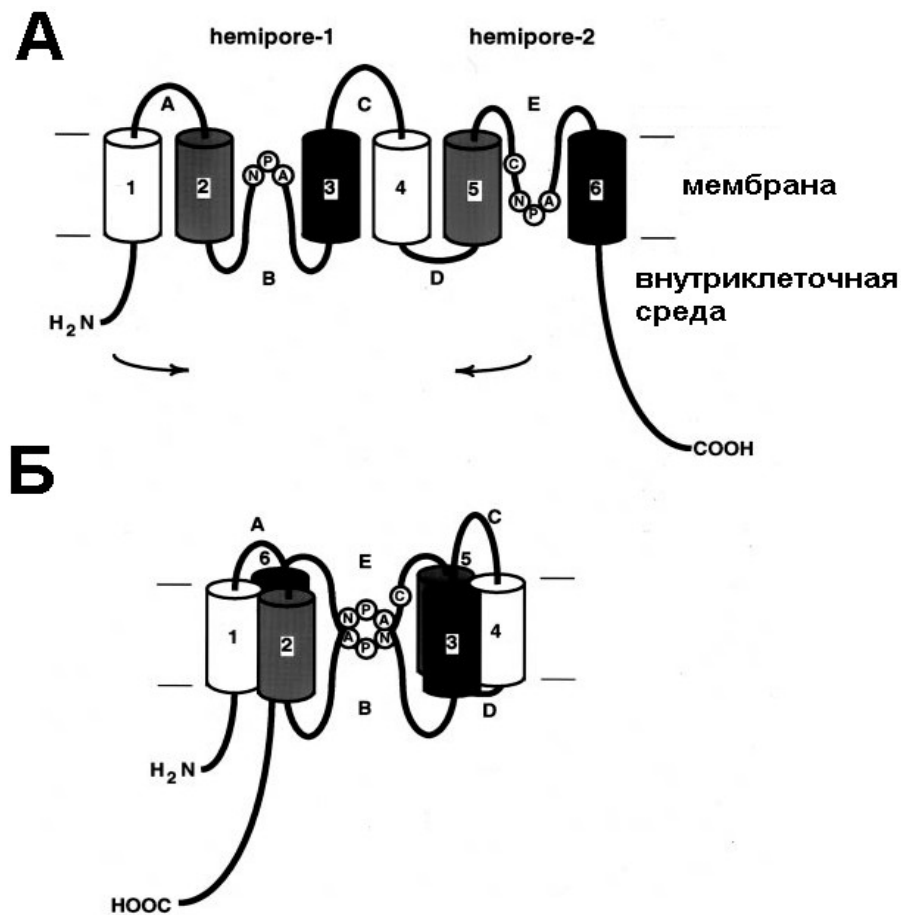


Рис. 38. Мембранная топология субъединицы аквапорина 1.

А – каждая субъединица аквапорина 1 состоит из шести трансмембранных доменов и содержит две симметричные структуры в петлях В и Е (hemipore-1 и hemipore-2). Б - в мембране аминокислотные остатки в петлях В и Е соединяются и образуют водную пору, пронизывающую бислой (гипотеза «песочных часов»). (Из Agre P., 2000 с изменениями).

4. Ионные каналы и межклеточная сигнализация

Нервная система представляет собой непрерывно работающий конгломерат нервных клеток, которые получают информацию, анализируют ее, принимают решения и управляют всеми системами организма. Для передачи информации по мембране клетки, с клетки на клетку и внутри клетки, нейроны используют электрические и химические сигналы.

Электрические сигналы могут быть двух типов. Первый тип - это локальные (не распространяющиеся на большое расстояние), градуальные

(зависящие от силы раздражения), достаточно длительные, низкоамплитудные сигналы. К ним относятся рецепторные и синаптические потенциалы.

1. Сигналы чувствительного нейрона 2. Сигналы двигательного нейрона 3. Сигналы мышцы

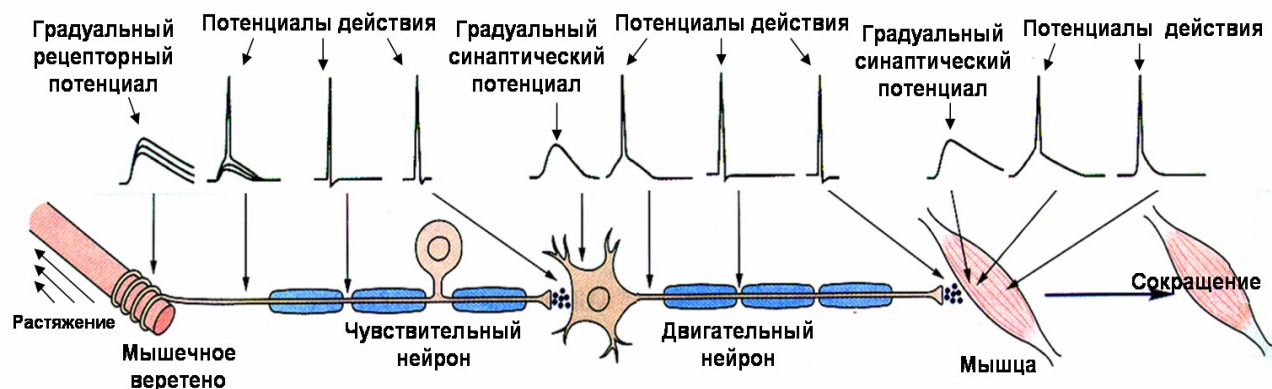


Рис.39. Последовательность сигналов при осуществлении двигательного сухожильного рефлекса. В рефлексе участвуют два нейрона (чувствительный и двигательный), а также группа мышечных волокон скелетной мышцы.

1. Растяжение мышцы вызывает раздражение рецептора, образованного чувствительным нейроном, и возникновение градуального рецепторного потенциала. Амплитуда рецепторного потенциала пропорциональна интенсивности растяжения. Если рецепторный потенциал достаточно большой, в дендрите чувствительного нейрона возникает ПД, который распространяется до синапса (место контакта аксона чувствительного нейрона и мембраны двигательного нейрона спинного мозга). В нервных окончаниях аксона ПД вызывает выделение нейромедиатора, который, диффундируя через синаптическую щель, взаимодействует с рецепторными молекулами мембраны двигательного нейрона.

2. Воздействие нейромедиатора инициирует постсинаптический потенциал в двигательном нейроне. Постсинаптический потенциал является градуальным, поскольку его амплитуда зависит от количества выделяемого нейромедиатора. Постсинаптический потенциал вызывает возникновение ПД, который по аксону распространяется до нервно-мышечного синапса (место контакта нервного окончания аксона с мышечным волокном скелетной мышцы), где он стимулирует выброс нейромедиатора.

3. Присоединение молекул нейромедиатора к рецепторам мышечного волокна инициирует постсинаптический потенциал на мембране мышечного волокна. Этот сигнал вызывает распространяющийся ПД на мембране мышечного волокна, что приводит к сокращению мышцы. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

Второй тип - высокоамплитудные, короткие, быстро распространяющиеся на большие расстояния сигналы, ПД. Они неизменны по амплитуде и длительности. В качестве примера покажем сигналы, обеспечивающие возникновение классического сухожильного рефлекса, который выражается в сокращении скелетной мышцы при ее растяжении (рис. 39) (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Все электрические сигналы являются результатом временного изменения электрических токов, текущих в клетку и из клетки. Эти токи изменяют электрический потенциал на клеточной мембране, образованный движением ионов ионные каналы. Рассмотрим роль ионных каналов в возникновении различных электрических сигналов возбудимых структур - в формировании МП покоя, генерации ПД, пре- и постсинаптических сигналов, в регуляции секреции нейромедиатора и возникновении рецепторных потенциалов.

4.1. Мембранный потенциал покоя

МП покоя это результат разделения зарядов относительно клеточной мембраны. При этом положительные заряды концентрируются на наружной поверхности мембраны, а отрицательные заряды - на внутренней поверхности. Мембранно-ионную теорию происхождения МП покоя предложил Юлиус Бернштейн, ученик Дюбуа-Реймона, в начале прошлого века (1902 г). МП покоя широко колеблется в различных клетках (от -5 до -100 мВ). Наибольшие значения МП покоя зарегистрированы в возбудимых клетках - нервных, мышечных и секреторных, в которых его величина составляет от -60 до -90 мВ (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Чайлахян Л.М., Балежина О.П., 2009).

Формирование МП происходит в результате движения ионов по концентрационному градиенту через каналы, открывающиеся в покое. Возникновение МП является пассивным процессом, который не требует затрат энергии. Однако, энергия нужна на этапе создания градиента концентрации для ионов при работе транспортных систем. В различных живых клетках МП покоя формируется по-разному. В глиальных клетках в его формировании принимают участие только ионы К, которые двигаются через К-каналы утечки.

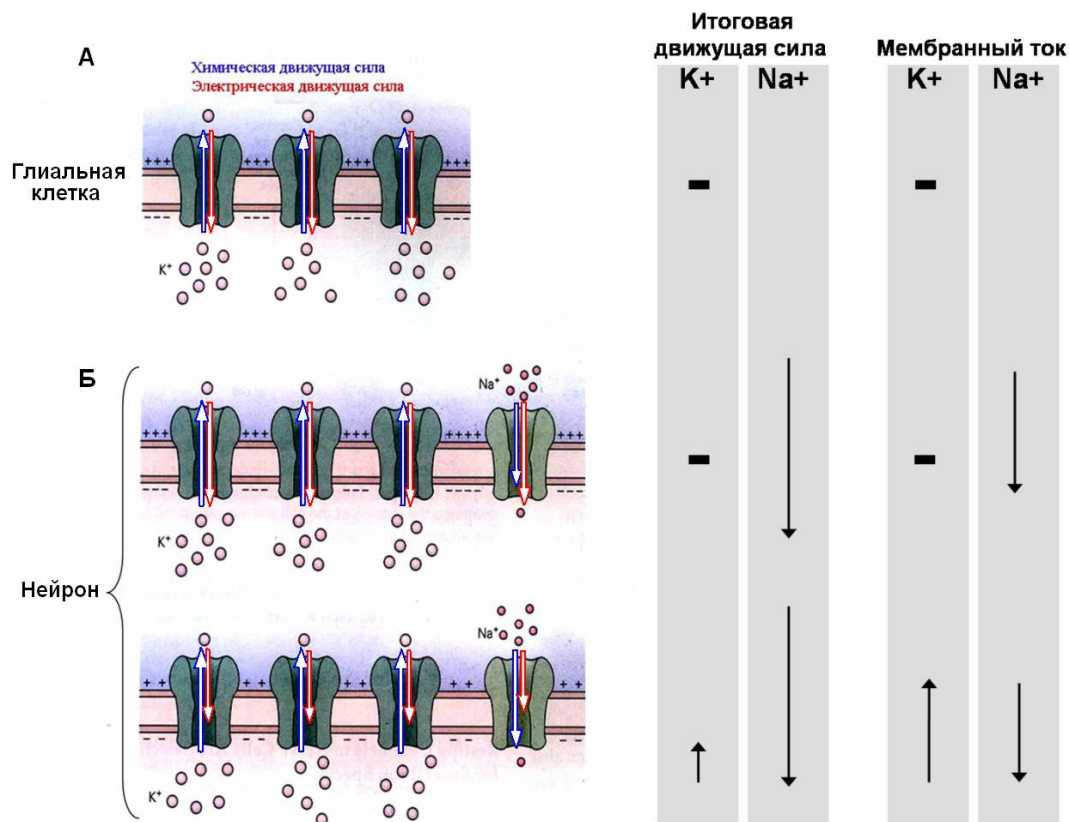


Рис. 40. Ионные механизмы возникновения мембранного потенциала покоя

В левой части рисунка схематически показаны K- и Na-каналы покоя. Левая стрелка внутри канала указывает на химическую движущую силу, правая стрелка – на электрическую. Длина стрелки отражает относительную величину движущей силы. В правой части рисунка показаны итоговые движущие силы и мембранные токи для K⁺ и Na⁺. **А - Глиальные клетки.** В покое открыты только K-каналы. Химическая и электрическая силы уравновешены, K-ток отсутствует, МП равен равновесному потенциалу для ионов K, $V_m = E_K$. **Б - Нейроны.** В покое наряду с K-каналами открыто небольшое количество Na-каналов. На фоне сформированного K-каналами МП возникают электрическая и химическая движущие силы для Na⁺ и появляется входящий Na-ток, который деполяризует клетку (верхняя схема). Деполяризация вызывает появление движущей силы для K⁺ наружу и возникновение выходящего K-тока. Постепенно МП перемещается на новый уровень, при котором $I_{Na} = I_K$ (нижняя схема). Поскольку суммарная проводимость K-каналов больше, чем Na, сравнительно небольшая итоговая движущая сила для K обеспечивает ток такой же величины, но противоположный по направлению, что большая итоговая движущая сила - для Na. В этом состоянии ионы Na и K не находятся в равновесии, однако, итоговый поток зарядов через мембрану равняется нулю. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

В большинстве нервных клеток МП возникает при движении ионов К и Na. Очень редко в формировании МП покоя принимают участие и ионы Cl. В глиальных клетках в состоянии покоя открыты только **К-каналы утечки** (рис. 40 А). В этом случае, ионы К двигаются благодаря химической движущей силе из цитоплазмы в окружающую среду и концентрируются около наружной поверхности мембраны, формируя положительный заряд. Внутри отрицательный заряд формируется вследствие потери клеткой ионов К, за счет внутриклеточных органических анионов, непроникающих через мембрану, и за счет приближения ионов Cl к внутренней поверхности мембраны.

Как только сформировался заряд на мембране, появляется электрическая движущая сила, заставляющая ионы К входить внутрь клетки. В конце концов, устанавливается равновесие этих сил, и ток ионов К через каналы прекращается. Возникающий МП будет соответствовать калиевому равновесному потенциалу (примерно -80 мВ). К-ток через мембрану можно представить следующим образом: $I_K = g_K(V_m - E_K)$, где V_m – МП, g_K – проводимость мембраны для ионов К (сумма проводимостей всех открытых К-каналов), E_K – равновесный потенциал для иона К. Поскольку в условиях равновесия К-ток равен нулю, то $V_m = E_K$ (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

В нервных клетках в состоянии покоя мембрана хорошо проницаема для К и в небольшой степени – для Na, поэтому в формирование МП покоя оказывают вклад ионы Na (рис. 40Б). Поскольку на мембране имеется значительный концентрационный градиент для ионов Na и уже существует разность потенциалов, возникают химическая и электрическая движущие силы направленные внутрь, заставляющие ионы Na входить в клетку, то есть появляется входящий Na-ток через открытые Na-каналы. В результате через мембрану начинают течь два разнонаправленных тока – входящий, деполаризующий, натриевый $I_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na})$ и выходящий, гиперполяризующий, калиевый $I_K = g_K(V_m - E_K)$. g_K , g_{Na} – проводимости мембраны для ионов К и Na E_K , E_{Na} – равновесные потенциалы для иона К и Na. В конечном итоге, возникнет равновесие, когда эти два тока становятся равны и противоположны по направлению $I_K = -I_{Na}$. При этом установится новое значение МП покоя (V_m) на более низком уровне:

$$V_m = \frac{g_K \cdot E_K + g_{Na} \cdot E_{Na}}{g_K + g_{Na}}.$$

Отсюда, в нервных клетках, по сравнению с глиальными, МП покоя несколько ниже (примерно, -60 мВ) и меньше калиевого равновесного потенциала.

Роль ионов Cl в формировании МП покоя неоднозначна в различных клетках. В большинстве клеток ионы хлора пассивно распределяются по обе стороны мембраны, токи через Cl-каналы в покое отсутствуют, а имеющийся МП равен потенциалу равновесия для хлора. Если же ионы Cl активно транспортируются из клетки, то появление Cl-тока через потенциал-активируемые Cl-каналы делает МП покоя более негативным:

$$V_m = \frac{g_K \cdot E_K + g_{Na} \cdot E_{Na} + g_{Cl} \cdot E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}}.$$

Кроме этого, в величину МП покоя вносит свой вклад Na/K насос. Насос является электрогенным, так как при каждом цикле работы насоса три иона Na выводятся из клетки и два иона K поступают в клетку. Клетка постоянно теряет положительные заряды и разность потенциалов на мембране увеличивается на 6-12 мВ.

Итак, МП покоя представляет собой разность потенциалов между наружной и внутренней поверхностью мембраны клетки. Он является результатом разделения зарядов относительно клеточной мембраны, которое возникает за счет движения заряженных ионов по концентрационным градиентам через ионные каналы, открывающиеся в покое. Наличие потенциала на мембране возбудимой клетки лежит в основе механизмов возникновения в ней электрических распространяющихся сигналов – ПД.

4.2. Потенциал действия

Потенциал действия – универсальный, высокоамплитудный, быстро распространяющийся по мембране нервной клетки сигнал, обеспечивающий передачу информации в центральной и периферической нервной системе (от рецептора к телу нейрона, от нейрона к нейрону или от нейрона к мышечной или секреторной клетке). ПД возникают в мышечных клетках (поперечно-полосатые, гладкомышечные клетки и кардиомиоциты), где обеспечивают связь возбуждения и сокращения, а также в некоторых ненейрональных клетках. ПД представляет собой быстрое колебание МП клетки в ответ на раздражение,

сопровождающееся изменением знака заряда на мембране и возникающее в результате открытия потенциал-активируемых ионных каналов и появления трансмембранных ионных токов. На рис. 41 представлен ПД нервной клетки, зарегистрированный с помощью внутриклеточного электрода.



Рис. 41. Потенциал действия

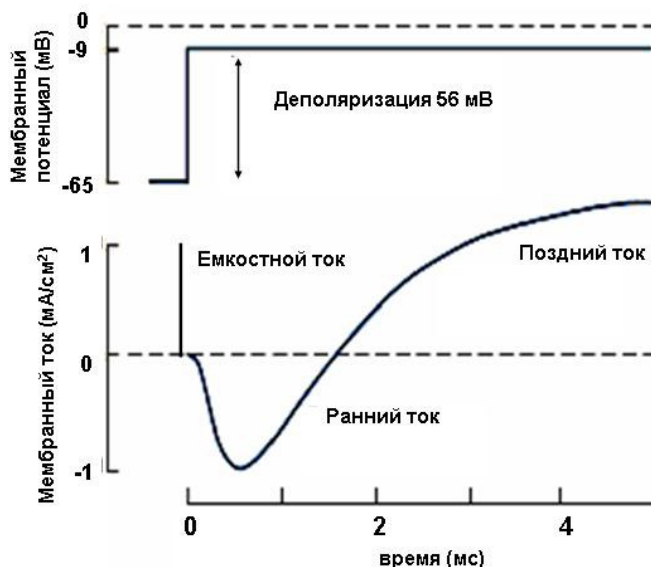
ПД можно зарегистрировать, используя схему внутриклеточного отведения, представленную на рис. 12. При этом один внутриклеточный отводящий микроэлектрод регистрирует МП покоя (-70 мВ). Другой внутриклеточный микроэлектрод служит для раздражения постепенно нарастающими по силе толчками тока (показаны внизу). При слабых толчках раздражающего тока (тонкие линии) регистрируются небольшие депполяризационные электротонические потенциалы. Если амплитуда электротонического потенциала достигает определенной величины (порогового потенциала), а величина депполяризации критического уровня депполяризации в клетке возникает быстрое колебание МП - ПД. Подробнее в тексте. Двойными стрелками показаны исходные значения порогового потенциала и его изменения во время следовой депполяризации и гиперполяризации.

При малых толчках раздражающего тока, возникают пассивные деполяризационные изменения МП - электротонические потенциалы, амплитуда которых зависит от силы раздражения. Когда сила раздражения достигает пороговой величины, в клетке возникает быстрое кратковременное и значительное по величине колебание МП, которое и является ПД. Уменьшение МП носит название **фазы деполяризации** ПД, а возвращение МП к исходному состоянию - **фазы реполяризации**. Кратковременная перезарядка мембраны носит название – **овершут**, при этом МП достигает положительных значений (+50 мВ). Иногда в конце ПД наблюдаются **следовые** деполяризационные или гиперполяризационные **потенциалы** (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Молекулярные механизмы возникновения ПД были исследованы А.Ходжкиным и Э.Хаксли на гигантском аксоне кальмара. Крупные размеры позволяли менять внутриклеточный ионный состав аксоплазмы и вводить внутрь аксона один или несколько электродов для отведения ПД и раздражения аксона. Были проведены исследования по влиянию изменений вне- и внутриклеточной концентрации ионов и природных токсинов, блокирующих различные ионные каналы на форму ПД. Использование метода фиксации потенциала позволило выявить ионные механизмы формирования ПД (Hodgkin, A. L., Huxley A. F., 1952 а, б). На рис. 42 показан эксперимент, когда МП аксона кальмара искусственно сдвигался на 56 мВ и поддерживался на этом уровне. В этом случае сначала регистрируется кратковременный емкостной ток (рис. 42 А), обусловленный изменением заряда на мембране в результате изменения МП, длящийся около 20 мксек, за которым следует небольшой, но устойчивый выходящий ток, называемый током утечки. Ток утечки переносится, в основном, ионами К и Cl через каналы, открытыми при потенциале покоя. Однако, этот ток замаскирован другими, гораздо большими по величине ионными токами – ранним входящим и поздним выходящим (рис. 42 А). Использование фармакологических подходов показало, что быстрый входящий ток блокируется тетродотоксином, а поздний ток исчезает при действии ТЭА (рис. 42 Б). На основе этих изящных экспериментов, были сделаны следующие выводы. Входящий ток переносится ионами Na, а выходящий - ионами К, Na-

ток быстро нарастает и быстро заканчивается, а калиевый ток – медленно нарастает и не изменяется в

А



Б

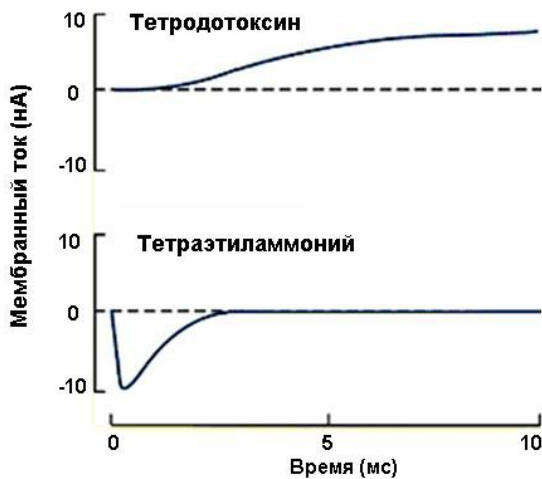


Рис. 42. Регистрация натриевых и калиевых ионных токов в гигантском аксоне кальмара.

Метод фиксации потенциала (рис 13, А). А - МП быстро смещается с -65 до -9 мВ и поддерживается на этом уровне. При этом регистрируются кратковременный емкостной ток, затем входящий ранний ток, сопровождаемый длительным выходящим током. Б - Эффекты тетродотоксина и

тетраэтиламмония на ионные токи. Видно, что поздний ток обусловлен выходящим K-током, а ранний – входящим Na. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

процессе деполяризации. Было предположено, что различная динамика этих токов связана с быстрой инактивацией Na-каналов и отсутствием быстрой инактивации у K-каналов (Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003). На основе этих экспериментов Ходжкин и Хаксли создали систему дифференциальных уравнений, которая позволила описать трансмембранные ионные токи и рассчитать их динамику во время ПД (Hodgkin A. L., Huxley A.F., 1952 б). Расчеты по эмпирически полученным формулам, отражающим зависимость натриевой и калиевой проводимостей от потенциала и времени, с точностью повторили форму реального ПД. На рис. 43 представлена рассчитанная динамика Na и K-токов, а также изменение МП во время ПД.

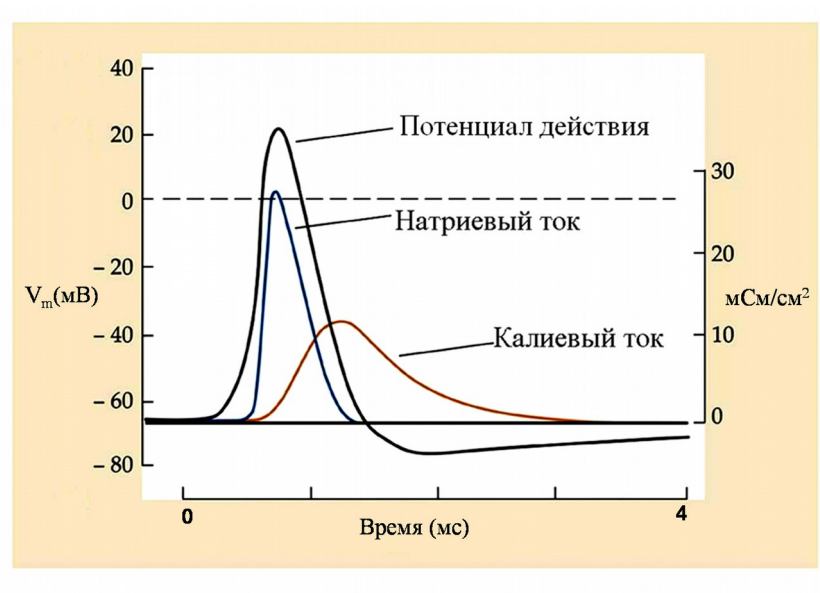


Рис 43. Кинетика ионных токов при формировании потенциала действия

Реконструкция ПД и кинетика ионных токов, лежащих в его основе, с помощью системы дифференциальных уравнений по модели Ходжкина-Хаксли (Hodgkin A. L., Huxley A.F., 1952 б). Видно, что фаза деполяризации ПД формируется за счет быстро развивающегося входящего Na-тока, который быстро инактивируется. Фаза реполяризации обеспечивается медленно нарастающим выходящим K-током. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Естественно, вход ионов Na и выход ионов K во время ПД приводит к изменению концентрации этих ионов в цитоплазме (концентрация ионов K уменьшается, а ионов Na - возрастает). Расчеты показали, что величина этих

изменений зависит от размеров клетки и составляет от тысячных до десятых долей процента. В тоже время, повышение внутриклеточной концентрации ионов Na увеличивает активность Na/K насоса так, что внутриклеточные концентрации ионов быстро возвращаются к начальному уровню (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Инактивация Na-каналов во время ПД приводит к развитию **рефрактерности** - невозбудимости клетки. Поэтому во время ПД клетка теряет способность возбуждаться в течение всей фазы деполяризации и части фазы реполяризации - состояние **абсолютной рефрактерности**. Постепенно Na-каналы выходят из состояния инактивации и возбудимость нервной клетки медленно восстанавливается. Но для того, чтобы возбудить клетку в этот период необходима более значительная, чем в норме сила раздражения. Этот период времени носит название **относительной рефрактерности**.

В формировании ПД могут участвовать и другие ионы, например, ионы Ca. В некоторых мышечных клетках и нейронах плотность потенциал-активируемых Ca-каналов очень высока и Ca-токи достигают такой величины, что могут сильно влиять на форму и длительность ПД, либо полностью формировать фазу деполяризации. Кальциевые ПД описаны в сердечной мышце, в целом ряде нейронов беспозвоночных, а также в нейронах вегетативной и ЦНС позвоночных. Наличие кальциевых ПД также показано и в ненейрональных типах клеток, таких как эндокринные и некоторые яйцеклетки беспозвоночных. Поразительным примером сосуществования натриевых и кальциевых ПД в одном типе клеток является клетка Пуркинье в мозжечке млекопитающих. Натриевые ПД генерируются в теле клетки Пуркинье, в то время как кальциевые - в дендритах (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Ионные каналы и ПД сердца. Как было описано выше ПД нервных волокон формируются, главным образом, двумя типами ионных токов – Na и K, текущих через достаточно однородные популяции потенциал-активируемых Na- и K-каналов. Это, по всей видимости, связано, с тем, что главной функцией нервных волокон является быстрое проведение неизменного по амплитуде и длительности ПД от одной возбудимой клетки к другой. В то же время в

некоторых возбудимых клетках (кардиомиоциты, гладкомышечные клетки) ПД формируется за счет большого количества разнообразных каналов. Модуляция работы этих каналов внутриклеточными регуляторными механизмами, запускаемыми гормонами и нейромедиаторами, позволяет в значительной степени изменять амплитуду и особенно длительность ПД. В результате изменяется поступление ионов Са в цитоплазму, необходимых для инициации сокращения, и, соответственно, сила и длительность сокращения. Следует отметить, что мощный Са-ток в этих клетках принимает непосредственное участие в формировании ПД.

На рис. 44 представлены ионные токи в рабочем кардиомиоците, участвующие в формировании ПД. Деполяризация (фаза 0) рабочего кардиомиоцита обусловлена входящими потенциал-активируемыми Na-токами. Фаза быстрой реполяризации (фаза 1) обусловлена инактивацией Na-каналов и активацией быстрых потенциал-активируемых K-токов ($I_{to,f}$). Деполяризация мембраны активирует потенциал-активируемые Са-каналы L-типа, вход кальция через которые во время фазы 2 – плато является основным триггером для сопряжения процесса возбуждения-сокращения в рабочем миокарде. Движущая сила для ионов K во время фазы плато очень высокая и вследствие инактивации Са-каналов выходящий K-ток становится преобладающим, что приводит к реполяризации (фаза 3) мембраны до уровня МП покоя.

В мембране кардиомиоцитов присутствует множество типов потенциал-активируемых K-каналов, каналов утечки и K-каналов входящего выпрямления, участвующих в реполяризации ПД (Nerbonne J. M., Kass R.S., 2005, Розенштраух Л.В., 2007). Наибольшие функциональные различия характерны для потенциал-активируемых K-каналов (K_v). Имеется, по крайней мере, два быстрых выходящих тока $I_{to,f}$ (transient outward, fast) и $I_{to,s}$ (transient outward, slow) и несколько компонентов токов задержанного выпрямления - I_{Kr} [$I_{K(rapid)}$], I_{Ks} [$I_{K(slow)}$], and I_{Kur} [$I_{K(ultrarapid)}$]. При этом экспрессия различных типов потенциал-активируемых K-каналов различается в различных областях сердца, что вносит вклад в региональные различия формы ПД кардиомиоцитов. Кроме того, обнаружены токи задержанного выпрямления, отличающиеся по кинетическим свойствам от выше перечисленных, и названные $I_{K,slow1}$, $I_{K,slow2}$ и I_{ss} . В кардиомиоцитах человека обнаружен постоянный неинактивирующийся

ток I_{ss} (steady-state), впервые выявленный у грызунов. Кроме того, в кардиомиоцитах присутствуют каналы, образованные субъединицами семейства $Kir2$, обуславливающие K-токи входящего выпрямления I_{KI} . В сердце токи входящего выпрямления I_{KATP} через АТФ-зависимые K-каналы играют важную роль в условиях ишемии и preconditionирования миокарда (Nerbonne J. M., Kass R.S., 2005, Розенштраух Л.В., 2007) (рис. 44).

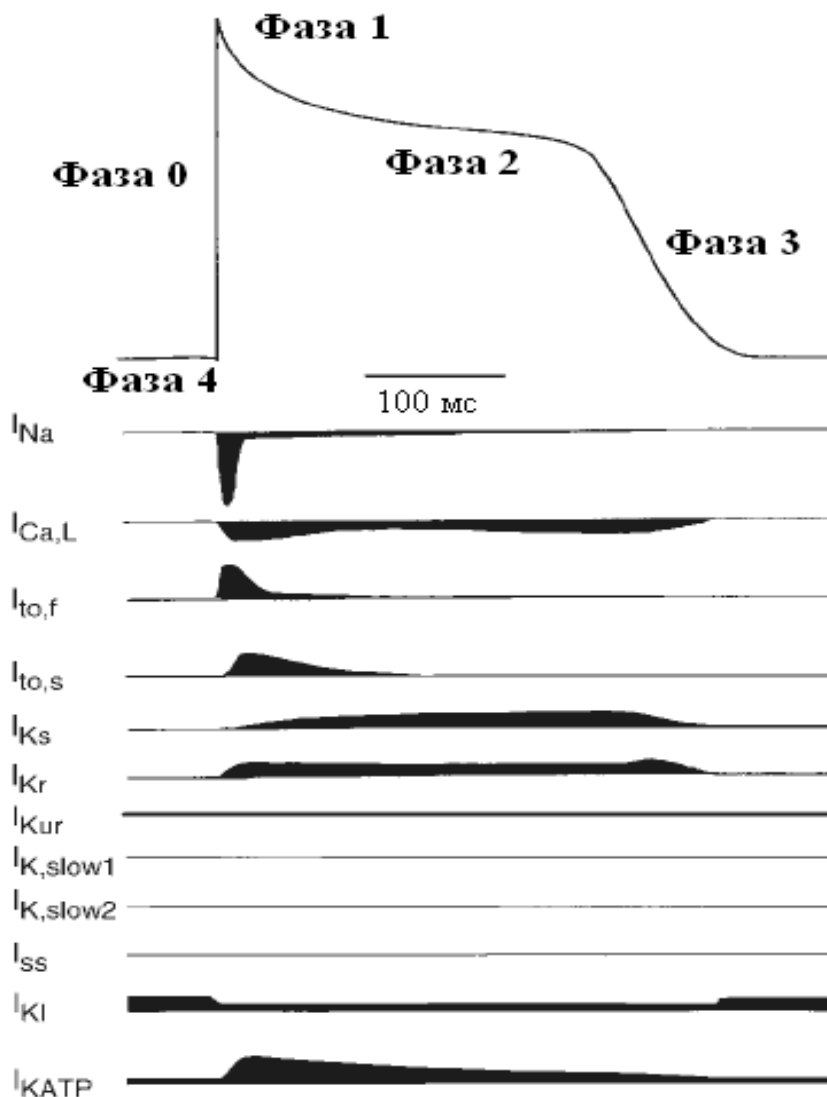


Рис. 44. Потенциал действия кардиомиоцита желудочка и ионные токи, лежащие в его основе.

Представлены временной ход входящих потенциал-активируемых натриевых (I_{Na}) и кальциевых (I_{Ca}) токов, имеющих сходные свойства в различных отделах миокарда. Свойства K-токов, оказывающих вклад в реполяризацию кардиомиоцитов, могут значительно различаться в различных отделах сердца. (Из Nerbonne J. M., Kass R.S., 2005 с изменениями).

Разнообразие ионных каналов в возбудимых мышечных клетках сердца и некоторых сосудов связано с одним из важных свойств - автоматией. Долгое время было непонятно, какие ионные токи принимают участие в автоматической генерации ПД. На рис. 45 показаны основные токи, принимающие участие в формировании автоматии клеток синусно-предсердного узла сердца. Са-ток большой проводимости (I_{CaL}) формирует передний фронт ПД, а также имеет большое значение в конце фазы медленной диастолической деполяризации (МДД), создавая плавный переход от МДД к переднему фронту ПД. Транзиторный Са-ток малой проводимости (I_{CaT}) отвечает за завершение МДД. Существует гипотеза, что именно I_{CaT} запускает локальные выбросы Са из СПР, которые в свою очередь активируют ток Na-Ca обменника, обеспечивающий завершение МДД и переход к переднему фронту ПД (Huser J., Blatter L.A., Lipsius S.L., 2000). Ток, активируемый гиперполяризацией (I_f), по-видимому, вносит большой вклад в поддержание автоматии синоатриального узла. Этот ток возникает при потенциале, отрицательнее -60 мВ, а при $-85-90$ мВ достигается активация этого тока наполовину от максимально возможной. Фазу реполяризации ПД создают в основном К-токи (I_K) задержанного выпрямления. Изменения функционирования каналов, формирующих эти токи, влияют на автоматию сердца теплокровного животного и могут приводить к изменению крутизны диастолической деполяризации и порогового потенциала (Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В., 2009, Sharifov O.F. et al., 2004, Розенштраух Л.В., 2007, Abramochkin D.V., Kuzmin V.S., Sukhova G.S., Rosenshtraukh L.V., 2009, Ziyatdinova N.I., Giniatullin R.A., Svyatova N.V., Zefirov T.L., 2001, Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L., Sitdikov F.G., Zefirov T.L., 2003).

На рис. 45 показан пример такого изменения при действии норадреналина. Активация β -адренорецепторов при действии норадреналина приводит к увеличению внутриклеточного уровня цАМФ, что сдвигает потенциалзависимость I_f в положительную сторону. В результате усиливает входящий ток при более отрицательном значении МП, что приводит к учащению ритма. На частоту генерации ПД оказывают влияние и другие каналы, определяющие его длительность (Biel M., Schneider A., Wahl C., 2002).

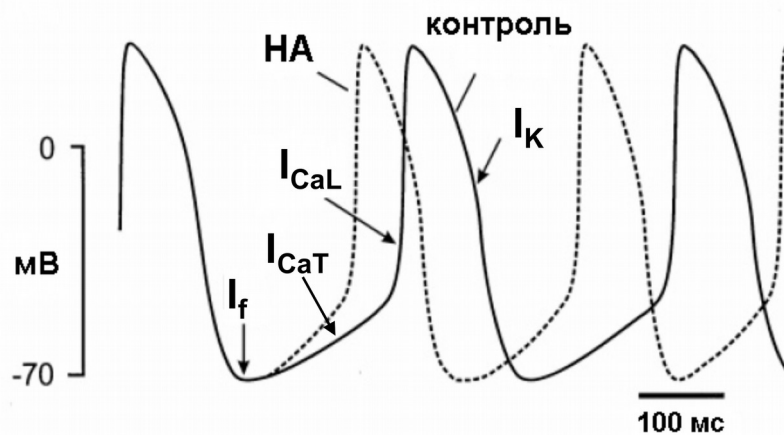


Рис. 45. Ионные токи, лежащие в основе генерации пейсмекерных потенциалов в синоатриальном узле.

Пейсмекерный потенциал в контроле и при стимуляции β -адренорецепторов норадреналином (НА). Указаны четыре основных типа токов, участвующих в генерации пейсмекерного потенциала: I_f ток (через HCN-каналы), T-тип (I_{CaT}) и L-type (I_{CaL}) кальциевых токов и реполяризующие K-токи (I_K). При действии НА наблюдается учащение ритма генерации ПД. (Из Biel M., Schneider A., Wahl C., 2002 с изменениями).

Распространение потенциала действия. В нервной системе передача информации на длинные расстояния возможна благодаря тому, что ПД распространяется вдоль аксона нервной клетки равномерно и без потери амплитуды. При этом в соседних (неактивных) от места возникновения ПД участках нервного или мышечного волокна возникают локальные выходящие токи, вызывающие перераспределение зарядов на мембране и деполяризацию в этих участках. Как только деполяризация в неактивных участках достигает порогового уровня, в них открываются потенциал-активируемые Na-каналы, ПД возникает по соседству от первоначального места возникновения, и волна возбуждения продвигается дальше. Другими словами, проведение ПД связано с его постоянным возникновением в соседних участках мембраны. В естественных условиях ПД распространяется по нервным волокнам только в одном направлении: от рецептора по дендриту к телу чувствительного нейрона и от тела нервной клетки по аксону к другой возбудимой клетке. Это связано с тем, что участки, расположенные сзади от продвигающегося ПД, находятся в состоянии рефрактерности, и локальные токи не способны вызвать в них возбуждение (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Скорость проведения ПД зависит от того, насколько быстро и насколько далеко от активного участка происходит деполяризация мембраны до порогового уровня при протекании локальных токов. Это, в свою очередь, зависит от величины входящего тока, генерируемого в активном участке, и кабельных свойств волокна. Величина входящего тока зависит от плотности Na-каналов в мембране, а кабельные свойства - от удельного сопротивления мембраны и аксоплазмы, а также от диаметра волокна. Чем толще нервное волокно, тем на большее расстояние будет распространяться деполяризация от активного участка, и тем больше скорость распространения ПД. В гигантском аксоне кальмара, диаметр которого около 1 мм, скорость распространения равна 25 м/с, тогда как в некоторых нервных волокнах млекопитающих с диаметром меньше 2 мкм скорость не превышает 1-2 м/с.

Миелиновая оболочка, образуемая глиальными клетками, увеличивает скорость распространения ПД. Мембрана клетки многократно наматывается на аксон и образует сегмент миелина длиной 1-1.5 мм. Между соседними

сегментами миелина имеются короткие безмиелиновые участки мембраны аксона, носящие название перехватов Ранвье. Сегменты миелина обладают изолирующими свойствами, а мембрана нервного волокна под ними практически не имеет проводимости и почти полностью лишена Na-каналов. Области перехватов Ранвье, наоборот, имеют очень высокую плотность Na-каналов. Поэтому локальные токи могут течь только от одного перехвата к другому, что позволяет деполяризовать мембрану на более длительные расстояния, вызывая в соседних перехватах Ранвье ПД. В миелинизированных аксонах млекопитающих с диаметром всего 10-20 мкм скорость распространения равна 70-120 м/с. Такой способ проведения ПД называется **сальтаторным проведением** и включает «прыжки» ПД через миелиновые сегменты от перехвата к перехвату, что резко ускоряет продвижение ПД по нервным волокнам (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

4.3. Ионные каналы и синаптические сигналы

Прежде чем рассматривать роль ионных каналов в формировании пре- и постсинаптических электрических сигналов рассмотрим принципы строения и функционирования химического синапса.

Термин "**синапс**" был введен выдающимся английским физиологом Чарлзом Шеррингтоном в 1897 году после пионерских морфологических работ Рамон-и-Кахаля, в которых впервые были получены свидетельства о том, что нервная система состоит из изолированных нервных клеток – нейронов. Слово "синапс" переводится с греческого как соединение, связь. В настоящее время под синапсом понимают специфическое место контакта одной возбудимой клетки с другой, в котором происходит процесс передачи информации. Основным в нервной системе является **химический синапс**, названный так, потому что в этом виде соединений в процессе передачи информации участвует **нейромедиатор** (синонимы – нейротрансмиттер, медиатор) (De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001, Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C.F., 2000, Магазанник Л.Г., 2007). Современные представления о синаптических функциях первоначально получены при изучении всего лишь одного синапса – нервно-мышечного соединения скелетных мышц позвоночных животных. Этот

синапс лежит вне пределов мозга, однако, его доступность дает возможным исследовать универсальные процессы синаптической передачи и механизмы ее регуляции. Рассмотрим структурную и молекулярную архитектуру периферического нервно-мышечного синапса.

Структура нервно-мышечного синапса. Скелетные мышцы иннервируются мотонейронами, которые локализованы в спинном мозге или стволе мозга. Каждый из них посылает аксон к определенной мышце, где его веточки иннервируют группу мышечных волокон. Когда аксональная веточка достигает мышечного волокна, она теряет миелиновую оболочку и разделяется на тонкие терминальные веточки или бутоны. Бутоны гнездятся в мелких желобках на поверхности мышечной мембраны и покрыты Шванновскими клетками (рис. 46). У млекопитающих большинство мышечных волокон иннервируются через один синапс одним аксоном. Вследствие этого в нервно-мышечном соединении нет синаптической интеграции, каждый ПД нервной терминали вызывает один ПД в мышечном волокне (Eccles J.C., 1963).



Рис. 46. Схема строения нервно-мышечного синапса лягушки.

Из рисунка видно, что аксон двигательного нерва вблизи мышечного волокна теряет миелиновую оболочку, при этом остается покрытым Шванновской клеткой. Аксон ветвится и образует нервные терминали. Нервно-мышечный синапс лягушки содержит 2-4 терминали. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Электронные микрофотографии нервно-мышечного соединения показали, что и нерв, и мышца высоко специализированы в месте контакта. Нервные терминали заполнены синаптическими пузырьками диаметром около 50 нм, содержащими нейромедиатор АХ. Многие везикулы прикрепляются к плотным частицам на цитоплазматической стороне мембраны. Эти частицы, названные

активными зонами, являются местом, где везикулы сливаются с мембраной для освобождения нейромедиатора – подвергаются экзоцитозу.

Затем из мембраны нервной терминали формируются новые везикулы путем эндоцитоза, в процессе которого образуются покрытые клатрином везикулы в качестве промежуточной формы. В двигательных нервных терминалях имеются также большие, электронно-плотные везикулы, которые содержат нейропептиды такие, как, например, кальцитонин ген-связанный пептид. Нервная терминаль также содержит митохондрии. Область мембраны мышечного волокна, контактирующая с нервными терминалями, называется постсинаптической мембраной или концевой пластинкой. Постсинаптическая мембрана образует складки глубиной 1 мкм, на гребнях которых имеются утолщения мембраны, представляющие собой скопления рецепторов. Устья постсинаптических складок точно соответствуют расположению пресинаптических активных зон. Между терминалью и мышечным волокном находится базальная мембрана, которая простирается на 50 нм ширины синаптической щели и заходит в синаптические складки. Она является частью непрерывной оболочки, которая окружает мышечное волокно и сливается с базальной мембраной Шванновской клетки. Базальная мембрана содержит ацетилхолинэстеразу, инактивирующую АХ, а также компоненты, отвечающие за адгезию и взаимодействие нерва и мышцы (De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001, Heuser J.E., Reese T.S., 1973, Heuser J.E., 1989).

Межнейрональные синапсы. Во многих отношениях синапсы между нейронами сходны с нервно-мышечными соединениями. И в тех, и в других нервная терминаль содержит везикулы, терминали покрыты глиальными отростками, пре- и постсинаптические мембраны утолщены и специализированы на освобождение нейромедиатора и его рецепцию. Особенности центральных синапсов являются малые размеры терминали, значительно меньший запас синаптических везикул, поэтому небольшое количество везикул освобождают медиатор в ответ на пресинаптический ПД. Кроме того, синаптические структуры межнейрональных синапсов не соединены с базальной мембраной, а постсинаптическая мембрана не образует складок. Только небольшая часть межнейрональных синапсов использует АХ в качестве нейромедиатора, соответственно, механизмы биосинтеза, повторного

захвата и инактивации медиатора, а также рецепторы будут другими. Тем не менее в центральных и периферических синапсах есть одинаковые функциональные элементы, и, иногда, наблюдается очевидная гомологичность на белковом уровне (каналов, рецепторов, внутриклеточных регуляторных систем). Структурная и молекулярная схожесть межнейронных и нервно-мышечных синапсов свидетельствует о том, что принципы работы нервно-мышечного синапса могут быть приложимы и к работе межнейронных синапсов (Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C.F., 2000, Магазанник Л.Г., 2007).

Функции химического синапса. Большинство межклеточных связей в нервной системе опосредуются через химические синапсы. Основные этапы передачи в химических синапсах идентичны. Говоря коротко, деполяризация терминали за счет пресинаптического ПД вызывает открытие потенциал-активируемых Ca-каналов и приводит к входу ионов Ca. Увеличение внутриклеточного кальция запускает освобождение нейромедиатора. Освобожденный нейромедиатор диффундирует через синаптическую щель и связывается с рецепторами на постсинаптической мембране, открывая ионные каналы и изменяя электрическую активность постсинаптической клетки. Наконец, нейромедиатор отсоединяется от рецептора и удаляется путем диффузии, подвергается обратному захвату или инактивируется.

В основе современных представлений о передаче возбуждения в нервно-мышечном синапсе лежит **квантовая гипотеза секреции медиатора**. Согласно данной гипотезе, секреция нейромедиатора из нервного окончания происходит определенными порциями - квантами (Del Castillo J., Katz B., 1954, Зефирова А.Л., Черанов С.Ю., 2000). Основанием для формирования этой гипотезы послужил факт открытия миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) (Fatt P.P., Katz B., 1950). В состоянии физиологического покоя наблюдается случайный выход АХ из нервного окончания в виде «порций», в результате чего регистрируются МТКП. Порция АХ, приводящая к генерации одного МТКП, была названа квантом медиатора. Использование метода электронной микроскопии для изучения ультраструктуры синапса позволило в 1954 году Де Робертсу и Беннету выявить в цитоплазме двигательного нервного окончания большое количество синаптических везикул диаметром около 50 нм. Поскольку везикулы имели одинаковые размеры и концентрировались у пресинаптической

мембраны, было предположено, что квант медиатора находится в синаптической везикуле, а освобождение медиатора происходит путем выделения содержимого везикулы в синаптическую щель посредством экзоцитоза. Таким образом возникла **везикулярная гипотеза** секреции медиатора, согласно которой носителем кванта медиатора является везикула (De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001, Del Castillo, Katz B., 1954). С использованием биохимического и физиологического методов показано, что квант медиатора содержит $6-45 \cdot 10^3$ молекул АХ (Potter L.T., 1970, Katz B., Miledi R., 1965 а). В ответ на ПД в нервном окончании происходит высвобождение 100-200 квантов медиатора, что приводит к генерации токов концевой пластинки (ТКП), превосходящих МТКП по амплитуде в десятки и сотни раз (Katz B., Miledi R., 1965 а). **Квантово-везикулярная теория** получила широкое признание во всем мире и подтверждена многочисленными экспериментальными физиологическими и морфологическими исследованиями на всех видах химических синапсов (Katz B., 1971, Ceccarelli B., Hurlbut W.P., Mauro A., 1973, Heuser J.E., Reese T.S., 1973, De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001, Heuser J.E., 1989).

Хотя химическая передача кажется сложной по сравнению с электрической (с помощью щелевого контакта), она имеет важные преимущества. Во-первых, химические синапсы позволяют усиливать электрический сигнал, освобождая нейрональные сети от необходимости, чтобы каждый элемент был меньше, чем его предшественник. Во-вторых, химические синапсы легко превращают возбуждающие сигналы в тормозные, что невозможно в электрических синапсах. Это позволяет сделать передачу информации таким процессом, который невозможен в чисто возбуждающих сетях. В-третьих, передача в химических синапсах может регулироваться на многих уровнях, что изменяет синаптическую эффективность. Таким образом, генетические и регуляторные сложности передачи сигнала в химическом синапсе оправдываются теми сложнейшими операциями, которые эти маленькие машины могут выполнять.

4.3.1. Ионные каналы и ионные токи в пресинаптическом нервном окончании

Нервные окончания, являясь конечными участками аксона, специализированы на освобождении нейромедиатора. Поэтому наряду с каналами, обеспечивающими проведение ПД, они содержат каналы, участвующие в механизмах инициации и регуляции освобождения нейромедиатора. Как уже было сказано ранее распространяющийся по аксону ПД доходит до нервного окончания, вызывает открытие потенциал-активируемых Са-каналов, вход ионов Са в цитоплазму нервного окончания и секрецию медиатора. Следовательно, интенсивность секреции зависит от величины входящего Са-тока, который определяется величиной и длительностью деполяризации пресинаптической мембраны, плотностью и свойствами Са-каналов. Амплитудно-временные параметры ПД, в свою очередь, зависят от динамики ионных токов (преимущественно натриевых и калиевых), которые его формируют. Ионные токи, формирующие ПД, были досконально проанализированы в нервных волокнах, чего нельзя сказать о пресинаптических нервных окончаниях. До последнего времени мы не знали, какие ионные каналы обеспечивают формирование ПД нервного окончания, как ионные каналы распределяются по ходу терминали, как распространяется ПД (пассивно или активно), какова динамика Са-тока, определяющего секрецию медиатора.

Малые размеры большинства нервных окончаний не позволяют применить метод внутриклеточного отведения, тем более, метод фиксации потенциала для регистрации и анализа ионных токов. Получение информации о мембранных токах оказалось возможным на моторных нервных окончаниях позвоночных животных с помощью метода внеклеточного отведения (рис. 14). Впервые внеклеточная регистрация ответов нервной терминали (мембранных токов) и токов концевой пластинки (ТКП) в нервно-мышечном синапсе лягушки была произведена Катцем и Миледи (Katz В., Miledi R., 1967 а). Дальнейшее совершенствование техники внеклеточного фокального отведения вызванных ответов нервных окончаний на препаратах очень тонких мышц (*m. cutaneous pectoris* лягушки, *m. triangularis sterni* и *levator auris longus* мыши, *m. ceratatomandibularis* ящерицы) с использованием высококонтрастной оптики Номарского (Зефиоров А.Л., Халилов И.А., 1985, Konishi T., Sears T.A., 1984, Mallart A., 1984, 1985a; Lindgren C.A., Moore J.W., 1989) позволило визуальное

подводить микроэлектрод к терминальной веточке, что значительно расширило возможности данного метода.

Другим методом регистрации электрических ответов нервного окончания является метод периневрального отведения (Gundersen C.B., Katz B., Miledi R., 1982; Mallart A., 1985 б; Penner R., Dreyer F., 1986), при котором удается зарегистрировать сигналы гораздо большей амплитуды, чем при фокальном отведении (рис. 47).

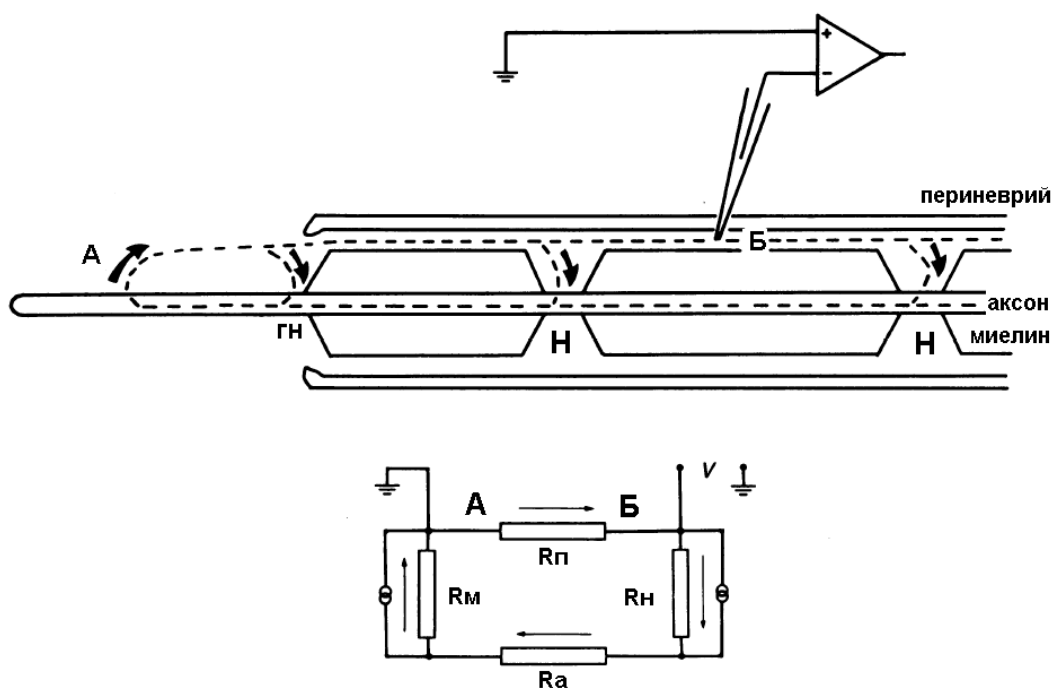


Рис. 47. Метод периневрального отведения.

Сверху – схема конечной части аксона, образующей нервное окончание (слева) и место введения электрода в периневральное пространство. Пунктирными линиями указано распространение тока; гн – геминод (полуперехватный или претерминальный участок), н – нодальные участки (перехваты Ранвье). Внизу представлена эквивалентная электрическая схема метода. R_m – сопротивление мембраны нервного окончания, R_n – сопротивление мембраны в перехвате Ранвье, R_p и R_a – продольное сопротивление периневрального пространства и аксона, соответственно. Стрелками указано направление тока. А – внеклеточное пространство, Б – периневральное пространство. (Из Mallart A., 1985 б с изменениями).

Миелинизированные аксоны собраны в пучки и покрыты тремя оболочками, две из которых эндоневрий и эпиневррий образованы соединительной тканью. Между ними находится третий слой – периневрий, состоящий из нескольких концентрических слоев плоских клеток. Периневральные клетки тесно прилегают друг к другу, поэтому периневрий относительно непроницаем для небольших молекул и даже ионов и обладает высоким электрическим сопротивлением (Bourne G.H., 1968). Таким образом, в периневральном пространстве от перехвата к перехвату, к претерминальному участку и далее вдоль терминали могут циркулировать токи (Mallart A., 1985) (рис. 47). При введении микроэлектрода в периневральное пространство вблизи нервной терминали можно зарегистрировать электрический ответ, который будет отражать электрогенез ближайших перехватов и всего нервного окончания (рис. 47). Рассмотрим особенности и основные виды ионных токов двигательных нервных окончаний холоднокровных и теплокровных животных, выявленные с помощью методов внеклеточного и периневрального отведений.

Внеклеточное отведение.

Потенциал-активируемые Na и K-каналы. Двигательные нервные окончания лягушки. Нервные терминали фазного мышечного волокна лягушки имеют длину 50-200 мкм и располагаются вдоль мышечного волокна (рис. 48). Начальный участок терминали называется геминодом (полуперехватный или претерминальный участок). Для внеклеточной регистрации вызванных ответов нервного окончания используют стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 2-5 мкм (сопротивление-2-5 МОм), обычно заполненные раствором NaCl. Оказалось, что в различных отделах нервной терминали амплитуда и форма внеклеточно регистрируемых вызванных раздражением двигательного нерва, ответов нервного окончания неодинакова (Рис. 48) (Mallart A., Brigant J.L., 1982, Зефиоров А.Л., Халилов И.А., 1985; Зефиоров А.Л. с соавт., 1985). В претерминальном участке (геминод) регистрируется трехфазный ответ, состоящий из первой низкоамплитудной положительной фазы и двух отрицательных фаз. При расположении микроэлектрода в проксимальном участке (3-30 мкм от последнего сегмента миелина) регистрируется трехфазный ответ, состоящий из первой

положительной фазы небольшой амплитуды, второй высокоамплитудной, отрицательной и третьей положительной фазы.

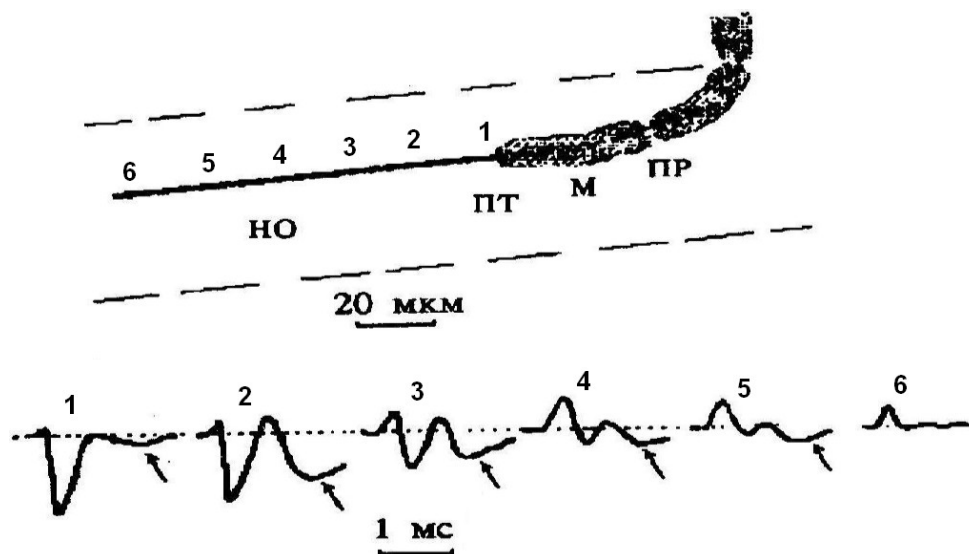


Рис. 48. Электрические ответы нервного окончания в кожно-грудинной мышце лягушки.

Сверху – изображение миелинизированного аксона и нервного окончания (НО), представленного одной терминалью (пунктиром показаны границы мышечного волокна). 1-6 - места подведения внеклеточного микроэлектрода. Внизу - усредненные вызванные ответы в различных участках НО. Стрелкой указан следующий за ответом НО ток концевой пластинки (ТКП). ПР – перехват Ранвье; М – миелиновый сегмент; ПТ – претерминальный участок. Для эксперимента использовался модифицированный раствор Рингера с пониженной концентрацией ионов Са (0.3-0.6 мМ) с добавлением ионов Mg (2-4 мМ). (Из Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш., 1996).

При передвижении электрода от проксимального отдела к центральному участку наблюдается постепенное увеличение первой фазы, снижение амплитуды второй и исчезновение третьей фазы ответа. В центральных участках нервного окончания регистрируемый ответ имеет двухфазную форму. К концу терминали вторая отрицательная фаза начинает выпадать от раздражения к раздражению, а в самом дистальном участке исчезает и сигнал становится монофазным (рис. 48). Положительные фазы сигнала отражают выходящие токи, а отрицательные фазы - входящие токи через мембрану

нервного окончания под электродом. Для идентификации ионных токов, лежащих в основе регистрируемого ответа нервного окончания, были использованы специфические блокаторы ионных каналов. Поскольку двигательные нервные терминалы амфибий имеют довольно большую длину, регистрируемый ответ в значительной степени определяется токами, возникающими в соседних участках терминалы, граничащих с местом отведения. Поэтому был использован метод локальной ионофоретической аппликации блокаторов через второй внеклеточный микроэлектрод к месту отведения на расстоянии 1-2 мкм (Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1985). В качестве блокатора потенциал-активируемых Na-каналов использовали тетродотоксин. При его локальной аппликации к отводящему электроду, подведенному к проксимальному участку нервного окончания, наблюдалось резкое уменьшение второй фазы трехфазного ответа и более позднее ее возникновение. При этом амплитуда первой фазы несколько увеличивалась. Через 2-3 минуты аппликации трехфазный ответ превращался в монофазный, напоминающий сигналы в конечных участках терминалы. Двухфазный ответ нервного окончания в центральных участках под действием тетродотоксина также превращался в монофазный, на однофазные ответы конечных участков терминалы тетродотоксин практически не оказывал влияния (Рис. 49). Локальная аппликация тетродотоксина приводила к угнетению секреции медиатора и исчезновению ТКП. Анализ полученных данных позволил предположить, что первая фаза ответа нервного окончания представляет собой пассивный (емкостной) выходящий ток, генерируемый набегающим ПД, а высокоамплитудная вторая фаза преимущественно отражает входящий Na-ток в месте отведения (Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1985). Оба этих тока являются деполяризующими: первый деполяризует мембрану до порогового уровня, а второй вызывает генераторный пик ПД. Отсутствие эффекта тетродотоксина в дистальных участках терминалы позволил предположить, что в этих участках Na-каналы отсутствуют и ПД распространяется пассивно.

В качестве блокатора K-каналов был использован тетраэтиламмоний (ТЭА) (Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1985). Через 3-4 мин после начала локальной аппликации ТЭА в трехфазном ответе нервного окончания происходило исчезновение третьей положительной фазы и расширение второй

отрицательной фазы (рис. 50). Этот эксперимент свидетельствует о том, что К-ток начинается во время развития Na-тока и поэтому в естественных условиях укорачивает временной ход входящего тока.

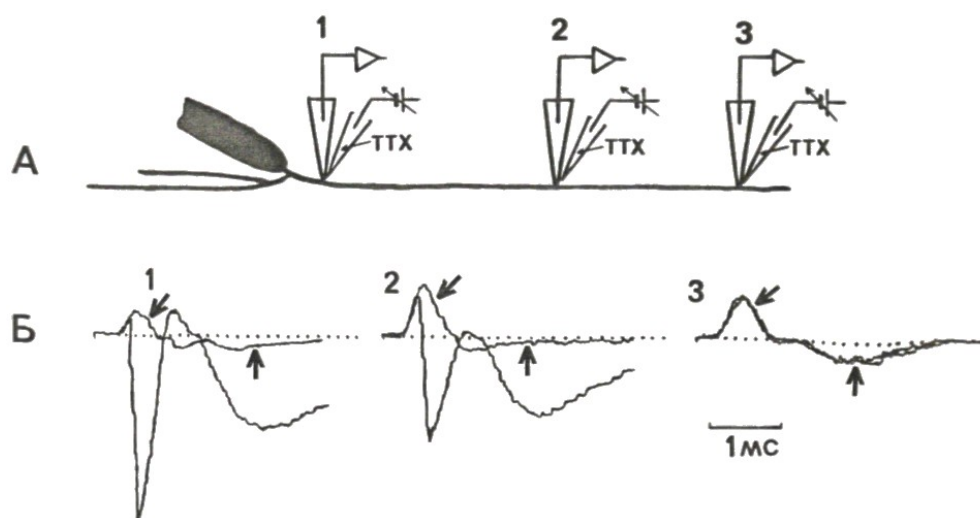


Рис. 49. Эффект локальной аппликации тетродотоксина на электрические ответы нервного окончания и секрецию медиатора.

А - схема эксперимента, Б - суперпозиция усредненных (по 30 реализациям) ответов нервного окончания и ТКП в проксимальном (1), центральном (2), дистальном (3) отделах терминали в контроле и после аппликации тетродотоксина (ТТХ) (показано стрелками). Концентрация ТТХ в апплицирующем электроде - 0.3 мМ. Для эксперимента использовался модифицированный раствор Рингера с пониженной концентрацией ионов Са (0.3-0.6 мМ) и добавлением ионов Mg (2-4 мМ). (Из Зефиоров А.Л., Халилов И.А., 1985).

Аппликация ТЭА приводила также к усилению вызванного освобождения медиатора (увеличение амплитуды ТКП). Возрастание уровня секреции медиатора, очевидно, связано с расширением ПД нервной терминали и, следовательно, увеличением входящего Са-тока (Benoit P.R., Mambrini J., 1970, Tsien R.W., 1983). Локальное подведение ТЭА к отводящему электроду, расположенному в более дистальных участках терминали, приводило к увеличению амплитуды и затягиванию второй отрицательной фазы, а также усилению секреции медиатора (рис. 50). Было предположено, что в этих участках нервного окончания за счет уменьшения натриевой проницаемости мембраны и более позднего возникновения Na-тока натриевые и калиевые токи

развиваются практически одновременно, и К-ток не формирует самостоятельную третью фазу. Поэтому в этих участках терминали наличие К-тока выражается только в уменьшении амплитуды и укорочении отрицательной фазы ответа. На однофазные ответы конечных участков нервного окончания аппликация ТЭА не оказывала заметного эффекта (рис. 50). Полученные данные позволили предположить, что К-каналы располагаются практически по всей длине нервного окончания кроме самых дистальных участков.

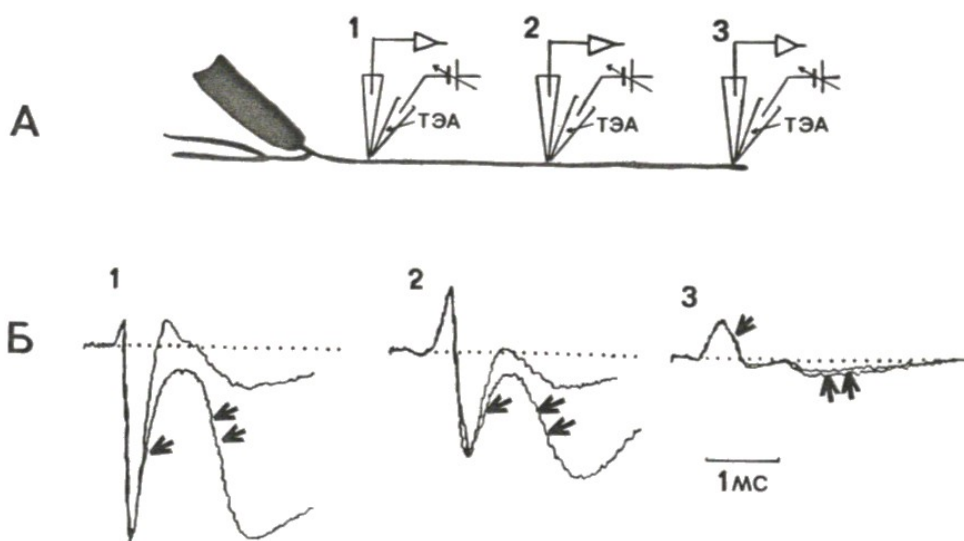


Рис. 50. Эффект локальной аппликации тетраэтиламмония на электрические ответы нервного окончания и секрецию медиатора.

А – схема эксперимента, Б – наложение усредненных ответов в контроле и после аппликации тетраэтиламмония (ТЭА) в проксимальном (1), центральном (2) и дистальном (3) участках нервного окончания (пресинаптические ответы указаны одной стрелкой, а постсинаптические (ТКП) – двумя стрелками). Концентрация ТЭА в электроде 10 мМ. Концентрация ионов Са во внеклеточном растворе – 0.4 мМ. (Из Зефиоров А.Л., Халилов И.А., 1985).

Полученные нами данные позволили предположить, что Na- и К-каналы имеются на большей части двигательной нервной терминали лягушки. Можно считать, что в проксимальных и центральных участках терминали возбуждение распространяется активно, и только в самых конечных участках нервного окончания - пассивно (электротонически) (Зефиоров А.Л., Халилов И.А., 1985, Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш., 1996).

Потенциал-активируемые Na- и K-каналы. Двигательные нервные окончания млекопитающих. Моторные нервные терминалы мышей и крыс организованы в небольшие компактные образования диаметром 20-40 мкм (рис. 51). В претерминальном участке нервного окончания мышцы в ответ на раздражение двигательного нерва регистрируется трехфазный ответ, состоящий из низкоамплитудной положительной и двух высокоамплитудных отрицательных фаз. По ходу терминальных веточек наблюдается увеличение первой положительной фазы, уменьшение второй отрицательной фазы, инвертирование третьей фазы и ответ становится двухфазным положительным. В конце терминали происходит уменьшение второй положительной фазы ответа (рис. 51) (Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш., Шакирьянова Д.М., 1997).

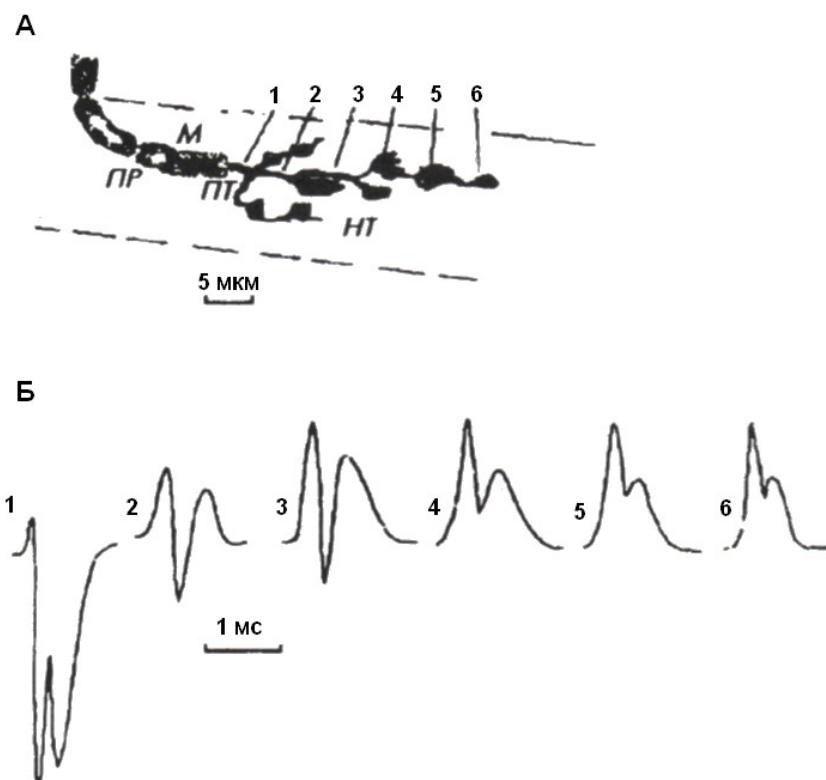


Рис. 51. Электrogenез в нервном окончании в *m. levator auris longus* мышцы.

А – схематическое изображение нервного окончания, стрелками указаны места отведения (1-6). ПР – перехват Ранвье, М – межперехватный миелиновый участок, ПТ - претерминальный участок, НТ – нервная терминаль. Б – электрические ответы регистрируемые в участках НТ, указанных цифрами на

А. Для устранения мышечных сокращений в раствор Кребса добавляли тубокурарин в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ мМ. (Из Зефилов А.Л., Гафуров Б.Ш., Шакирьянова Д.М., 1997).

Природа и распределение ионных каналов в нервных окончаниях теплокровных была выяснена в экспериментах с ионофоретической аппликацией блокаторов Na- и K-каналов в различных участках нервного окончания. Аппликация тетродотоксина в претерминальной части нервного окончания приводила к подавлению второго электроотрицательного пика ответа (рис. 52 А).

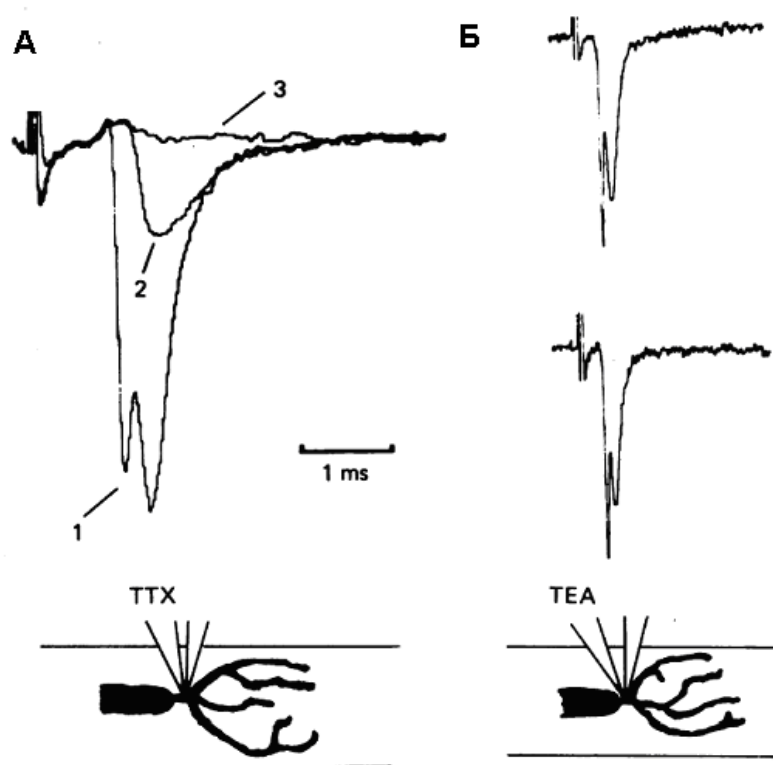


Рис. 52. Выявление ионных токов нервного окончания в *m. triangularis sterni* мышцы.

А – эффекты ионофоретической аппликации тетродотоксина (ТТХ) на форму претерминального ответа. Концентрация ТТХ в пипетке – 0.15 мМ. 1 – контроль, 2 – аппликация ТТХ, 3 – при подаче тетраэтиламмония (ТЭА) в концентрации 1 мМ в перфузируемый раствор; Б - претерминальный ответ в контроле (верхний сигнал) и во время ионофоретической аппликации ТЭА (нижний сигнал). Концентрация ТЭА в пипетке - 1 М. Во внеклеточном растворе присутствует тубокурарин в концентрации 0.02 мМ. (Из Brigant J.L., Mallart A., 1982).

Следовательно, первая положительная фаза претерминального ответа создается деполяризирующими локальными токами из перехватов Ранвье, а второй высокоамплитудный отрицательный компонент отражает входящий Na-ток в месте отведения. Ионофоретическая аппликация ТЭА не оказывала никакого влияния на ответ нервного окончания, что свидетельствует об отсутствии K-токов в претерминальной области. Однако, на фоне действия тетродотоксина (в условиях ионофоретической аппликации) третий отрицательный компонент претерминального ответа исчезал при добавлении ТЭА в окружающий раствор (рис.52 А). Следовательно, третий отрицательный компонент ответа формируется выходящими K-токами в терминали (Brigant J.L., Mallart A., 1982). Эти данные свидетельствуют о том, что Na-каналы сконцентрированы только в претерминальной области, а K - присутствуют практически на всем протяжении терминали.

Если претерминальная область содержит только Na-каналы (Ritchie J.M., 1986), то терминаль, содержащая большое количество K-каналов, начинает реполяризоваться раньше перехвата (Brigant J.L., Mallart A., 1982). Это приводит к появлению разности потенциалов между претерминальным и терминальными участками нервного окончания, которая создает локальный ток, циркулирующий между этими участками. Этот входящий ток и формирует третью отрицательную фазу претерминального ответа. Полученные данные подтверждают положение о том, что терминальные участки нервного окончания содержат только K-каналы, а распространение возбуждения происходит электротонически практически по всей длине терминали.

Са-каналы двигательного нервного окончания. Входящий Са-ток нервного окончания имеет небольшую амплитуду и к тому же маскируется мощным выходящим K-током, поэтому в естественных условиях этот ток невозможно зарегистрировать. Для определения временного хода Са-тока нервной терминали лягушки нами был использован метод внеклеточного отведения с одновременным локальным подведением ионов Са к участку нервного окончания из регистрирующего электрода (рис. 53) (Зефирова А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С., 1985). Для блокирования ТКП использовали бескальциевые растворы с добавлением тубокурарина.

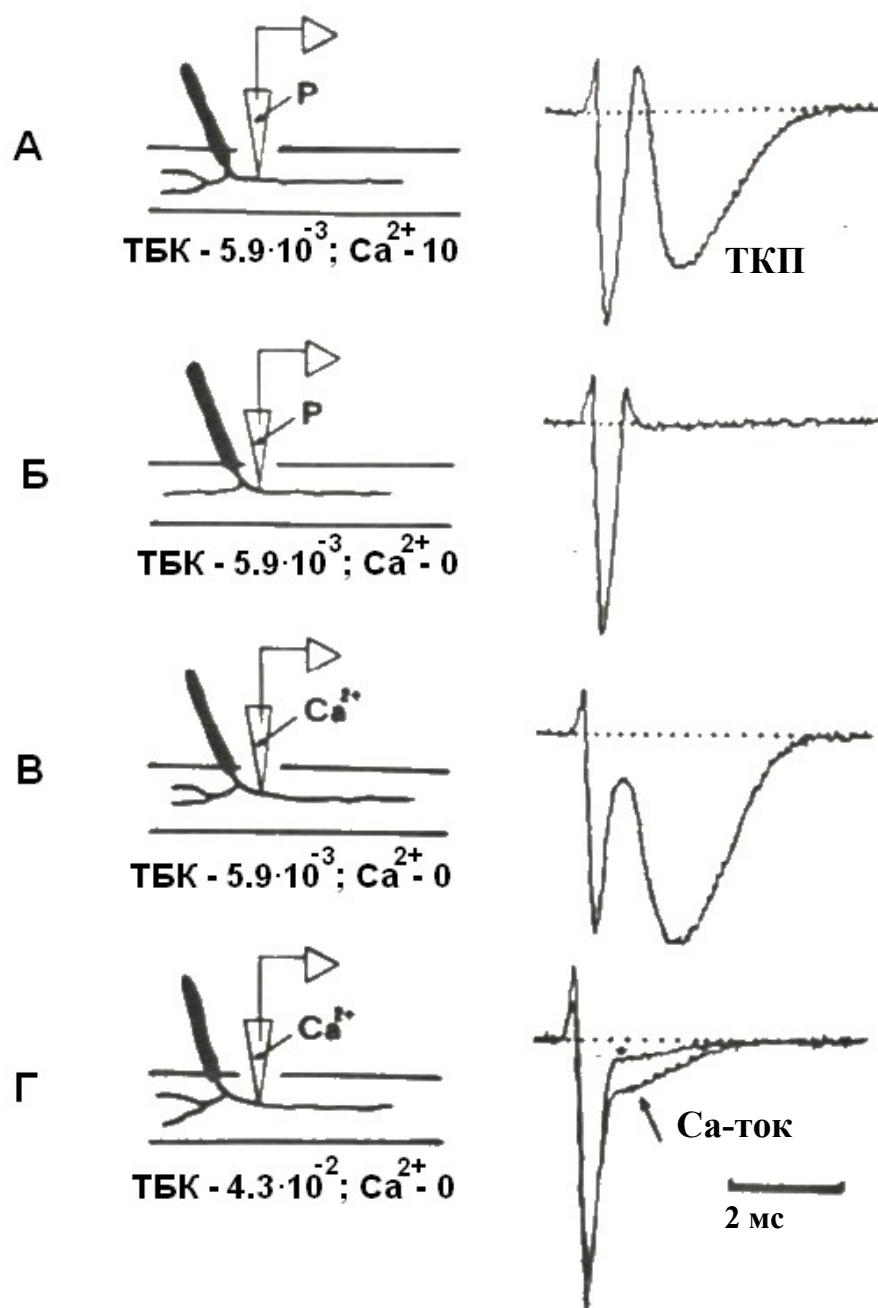


Рис. 53. Выявление Ca-тока в двигательном нервном окончании лягушки.

Слева – схемы экспериментов, указаны концентрации тубокурарина и ионов Ca в перфузируемом растворе (в Молях), справа – усредненные ответы нервного окончания и токи конечной пластинки (ТКП). На А, Б отведение производилось с помощью микроэлектродов, заполненных перфузируемым раствором (Р), на В, Г – заполненных раствором CaCl₂ в концентрации – 1 М (ответ, обозначенный звездочкой на г, получен при 0.2 М). Стрелкой на г отмечен входящий Ca-ток. (Из Зефиоров А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С., 1985).

В этих условиях был зарегистрирован медленный отрицательный компонент, выраженность которого зависела от концентрации ионов Са в месте отведения (рис. 53 Г). Этот ток возникал при замене ионов Са в электроде на ионы Ва и Sr, способных проходить через Са-каналы, и исчезал при использовании ионов Со, блокирующих Са-каналы. Эти данные позволили заключить, что зарегистрированный нами поздний входящий ток и является Са-током нервного окончания. Длительность Са-тока составляла 1.2-2.5 мс.

Са-активируемые К-каналы двигательного нервного окончания. В двигательной нервной терминали лягушки был идентифицирован еще один выходящий К-ток (Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1987). При регистрации трехфазного ответа от проксимального участка нервного окончания электродами, заполненными СаCl₂ в условиях блокирования потенциал-активируемых К-каналов 4-аминопиридином (4-АП), происходило затягивание ПД, и резко увеличивалась амплитуда третьей фазы сигнала (рис. 54).

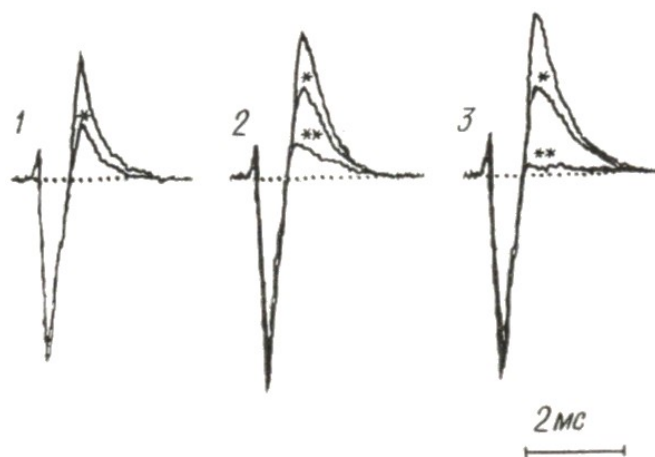


Рис. 54. Выявление Са-активируемого К-тока в двигательном нервном окончании лягушки.

Ответы нервного окончания регистрировались в проксимальном участке терминали в условиях блокирования потенциал-активируемых К-каналов 4-аминопиридином (0.15 мМ), концентрация ионов Са в отводящем электроде 1 М. Третья фаза ответа нервного окончания: 1 – при изменении концентрации Са в отводящем электроде от 1 до 0.25 М (обозначен звездочкой); 2 – при локальной аппликации ионов К на участок отведения (одной звездочкой отмечены ответы через 2, двумя – через 5 мин); 3 – при локальной аппликации ионов Со (одной звездочкой отмечены ответы через 2, двумя – через 5 мин). Во внеклеточном растворе присутствует тубокурарин в концентрации $4.3 \cdot 10^{-2}$ М. (Из Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1987).

По-видимому, удлинение ПД приводит к увеличению входа ионов Са в аксоплазму нервного окончания и активации Са-активируемого К-тока. Действительно, амплитуда тока зависела от концентрации Са у места отведения, снижалась при уменьшении градиента ионов К на мембране и действии ионов Со (блокаторов Са-каналов) (рис.54).

Входящий Са- и выходящие Са-активируемые К-токи тесно взаимосвязаны, по-видимому, Са-активируемые К-токи являются естественными ограничителями длительности Са-тока. Действительно, при большой амплитуде Са-тока поступление значительного количества положительно заряженных ионов Са приводит к резкому замедлению фазы реполяризации ПД (Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K., 1981). В этом случае формируется самоподдерживающийся процесс поступления Са в нервное окончание: вход Са вызывает деполяризацию, а деполяризация – вход Са. Значение Са-активируемых К-токов заключается в укорочении фазы реполяризации ПД и, тем самым, в ограничении длительности входящего Са-тока (Зефилов А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С., 1987).

Моделирование ионных токов и распределения ионных каналов в двигательном нервном окончании холоднокровных и теплокровных животных. Распределение ионных каналов по ходу нервных терминалей было оценено с помощью математического моделирования (Зефилов А.Л., Гафуров Б.Ш., 1996, Зефилов А.Л., Гафуров Б.Ш., Шакирьянова Д.М., 1997).

На основе модели электрического поведения мембраны немиелинизированного нервного волокна Ходжкина-Хаксли (см. выше) была разработана модель электрогенеза нервного окончания. Систему дифференциальных уравнений в частных производных решали в конечных разностях методом Эйлера. Был проведен компьютерный анализ ионных токов при неодинаковой плотности каналов вдоль нервного окончания. Сопоставление полученных данных с результатами электрофизиологических экспериментов (внеклеточно регистрируемые ответы нервного окончания), показало, что наилучшее совпадение модельных и реальных ответов происходит при экспоненциальном уменьшении плотностей потенциал-активируемых Na-, K- и

Ca-активируемых K-каналов по ходу нервного окончания без изменения плотности Ca-каналов (рис. 55).

Нами было установлено, что по ходу двигательной нервной терминали лягушки плотность Na-, K- и Ca-активируемых K-каналов экспоненциально уменьшается с константой длины порядка 30 мкм, а двигательном нервном окончании мыши - 1, 6 и 6 мкм, соответственно, для разных типов каналов

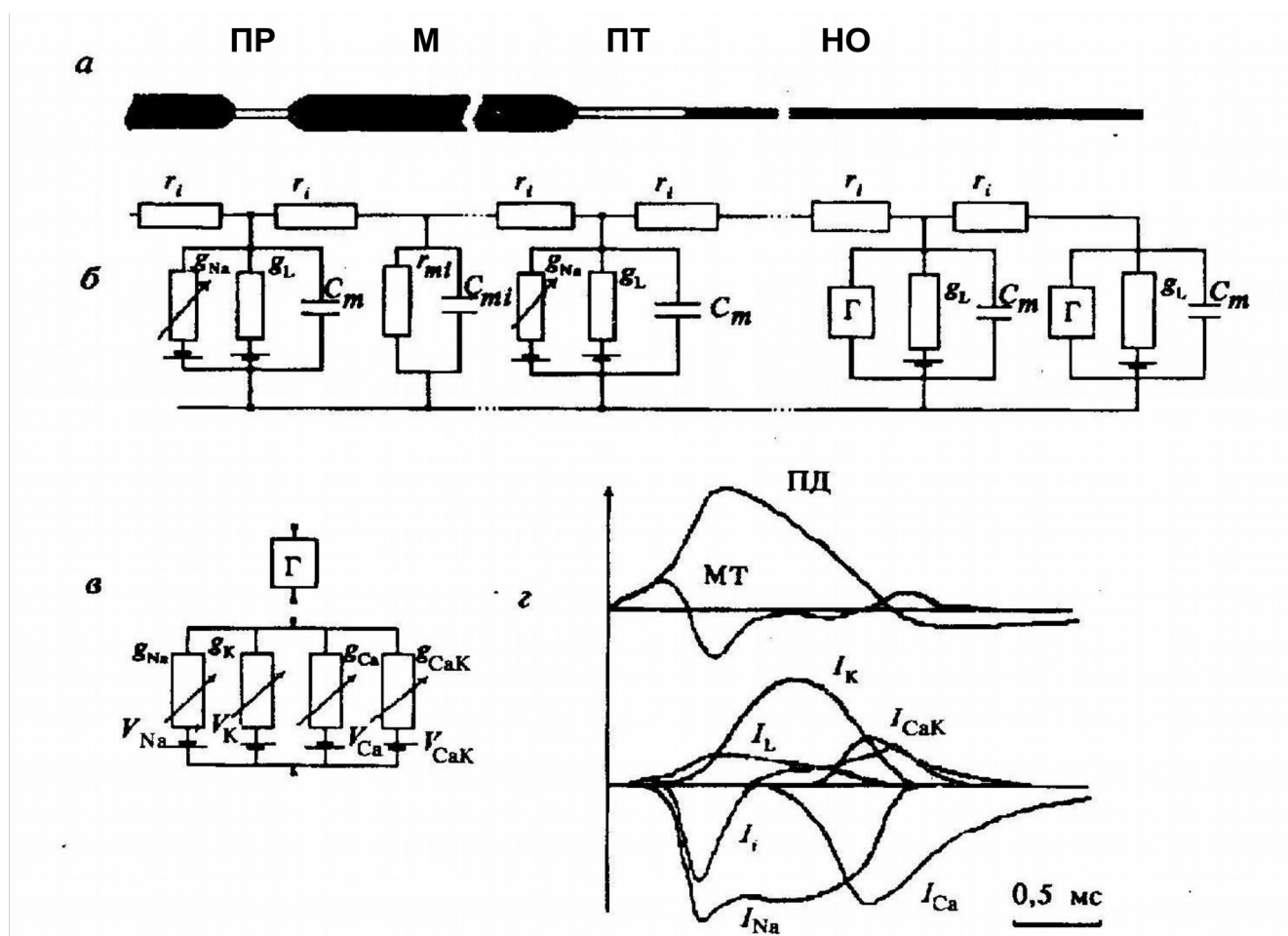


Рис. 55. Моделирование ионных токов в двигательном нервном окончании.

а – структурная и б - электрическая схемы миелинизированного нервного волокна и нервного окончания, в - генератор мембранного тока в нервном окончании; г - рассчитанные по модели мембранные токи (МТ) и потенциал действия (ПД); ПР – перехват Ранвье; М – миелиновый сегмент; ПТ – претерминальный участок; НО – нервное окончание; r_i и r_{mi} – сопротивление аксоплазмы и миелина; $V_{Na,K,Ca,CaK}$ – равновесные потенциалы; $C_{m,mi}$ – ёмкости

мембраны и миелина; $g_{Na,K,Ca,CaK,L}$ – проводимости; $I_{Na,K,Ca,CaK,L}$ – ионные токи. L-ток утечки (Из Зефилов А.Л., Гафуров Б.Ш., 1996).

Сопоставление этих данных позволяет сделать заключение о наличии общих закономерностей встраивания и распределения ионных каналов в двигательных нервных окончаниях пойкило- и гомойотермных животных. Количественные различия в пространственных константах снижения плотности каналов по ходу нервных окончаний обусловлены, по всей видимости, различной протяженностью и формой терминалей у животных указанных групп. Особенности распределения и изменения плотности ионных каналов вдоль терминали хорошо объясняют динамику интенсивности вызванной секреции медиатора по ходу нервного окончания. Нами показано, что наибольшая амплитуда ТКП наблюдается в проксимальном участке терминали, что коррелирует с максимальной амплитудой и длительностью Са-тока. В дистальных участках нервного окончания секреция медиатора снижается. Интересным является то, что снижение Са-токов в конце нервного окончания связано не с уменьшением количества Са-каналов, а с изменениями формы ПД за счет снижения плотности Na- и K-каналов (Зефиоров А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С., 1987, Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш., 1996, Зефиоров А.Л., Гафуров Б.Ш., Шакирьянова Д.М., 1997).

Соотношение ПД и Са-тока. Наши электрофизиологические и модельные исследования показали, что в двигательных нервных окончаниях Са-ток возникает в конце ПД (рис 53 и 55). Это связано с тем, что возникновение и развитие интегрального Са-тока в нервном окончании определяется кинетикой открытия Са-каналов и наличием электродвижущей силы для ионов Са. У пойкилотермных животных при физиологических температурах кинетика открытия N- и P/Q- тип Са-каналов более медленная, чем у потенциал-активируемых Na-каналов, поэтому в фазу деполяризации ПД открыто только несколько Са-каналов. Поэтому своих максимальных значений суммарный Са-ток достигает в фазу реполяризации ПД, что обусловлено также большой электродвижущей силой для ионов Са (Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K. et al., 1981). У теплокровных животных при физиологических температурах кинетика открытия Са-каналов более быстрая, и значительный Са-вход наблюдается уже на фазе роста ПД (Sabatini B. L., Regehr W.G., 1999).

Периневральное отведение.

Ионные токи в двигательных нервных окончаниях холоднокровных и теплокровных животных можно зарегистрировать периневральным способом (рис. 56 А, Б). Ответ двигательного нервного окончания лягушки или мышцы (Mallart A., 1985 б, 1989), регистрируемый периневральным способом, состоит из одного электроположительного пика небольшой амплитуды и двух высокоамплитудных электроотрицательных пиков. Первая положительная фаза (выходящий ток) отражает пассивную деполяризацию мембраны двигательного нерва при распространении ПД. Отрицательная фаза состоит из двух пиков: первый представляет собой входящий Na-ток через тетродотоксин-чувствительные Na-каналы перехватов Ранвье, второй пик, меньший по амплитуде, отражает K-токи нервного окончания. Появление второго пика вызвано тем, что выходящий K-ток в начальной части нервного окончания, имеющий большую величину, чем в перехвате Ранвье, вызывает появление входящих локальных токов в месте отведения (Рис. 56 А, Б а). Использование блокатора потенциал-активируемых K-каналов (3,4-диаминопиридин) приводило к расширению периневрального ответа и появлению Ca-активируемых K-токов (Рис. 56 А, Б б).

Блокирование как потенциал, так и Ca-активируемых K-каналов (3,4-диаминопиридин и ТЭА) приводило к исчезновению второго отрицательного пика и появлению третьей (положительной) фазы, обусловленной Ca-током нервного окончания (рис. 56 А,Б в). Блокирование всех K-каналов при повышении концентрации ТЭА (до 10 мМ) и увеличение наружной концентрации ионов Ca (рис. 56 А, Б г) приводило к появлению длительного плато Ca-тока (до 300 мс и более). Оно связано с тем, что формируется самоподдерживающийся процесс: открытие Ca-каналов - массивное поступление ионов Ca в нервное окончание - сильная деполяризация - открытие Ca-каналов - и т.д. Кальциевые каналы имеют высокую плотность в проксимальной области нервной терминали, поэтому движение ионов, вызванное входящим Ca-током в нервной терминали, регистрируется периневральным микроэлектродом как выходящий ток (Mallart A., 1985 б; 1989;

Redman R. S., Silinsky E. M., 1995) (Рис. 56 А, Б в). Блокаторы Са-каналов – ионы Cd, Co, Gd и др. предотвращали развитие Са-тока и Са-плато (Рис. 56 А г).

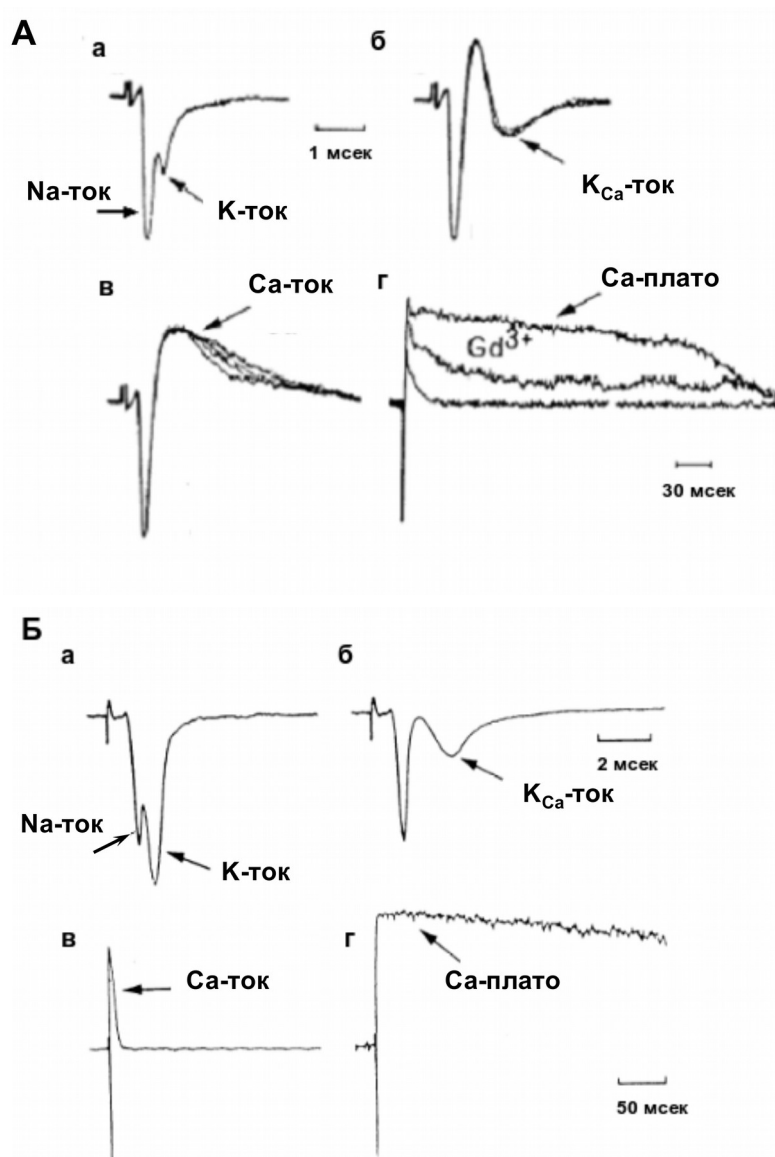


Рис. 56. Ответы нервного окончания лягушки и мыши, регистрируемые периневральным способом.

А – ответы в нервно-мышечном синапсе *m. cutaneous pectoris* лягушки (Molgo J. et al., 1991, Rowan E.G., Harvey A.L., 1988). а – в контроле, б - при блокировании потенциал-активируемых К-токов 3.4-диаминопиридином (0.2 мМ), в - при блокирование К-каналов 3.4-диаминопиридином (0.2 мМ) и тетраэтиламмонием (ТЭА) (1 мМ) и увеличении концентрации внеклеточного Са ([Ca²⁺]_o) до 2.5 мМ, г – плато Са-тока при блокировании К-каналов ТЭА (10 мМ) и увеличении [Ca²⁺]_o до 8 мМ, показано снижение плато при действии ионов Gd (0.2 - 0.5 мМ)
Б – ответы в нервно-мышечном препарате *m. triangularis sterni* мыши (Mallart A., 1985). а - в контроле, б – при блокировании потенциал-активируемых К-токов 3.4-диаминопиридином (0.1 мМ), в – при блокировании К-каналов 3.4-

диаминопиридином (0.2 мМ) и ТЭА (0.5 мМ), г - при блокировании К-каналов 3.4-диаминопиридином (0.15 мМ) и ТЭА (2 мМ) и увеличении $[Ca^{2+}]_o$ до 6 мМ. (Из Van Der Kloot W., Molgo J., 1994 с изменениями).

Модуляция ионных токов двигательного нервного окончания.

Исследование модуляции секреции медиатора является одной из актуальных областей нейрофизиологии, так как позволяет выявить механизмы, определяющие эффективность работы и силу синапса. Регуляция освобождения медиатора может осуществляться при участии гуморальных агентов, присутствующих в самом организме, в частности, медиаторами, гормонами, продуктами их метаболизма, так и экзогенными факторами (Кирзон М.В, Каменская М.А., 1969; Полетаев Г.И., 1972, Матюшкин Д.П., 1980, Зефилов А.Л., Шакирьянова Д.М., 1992).

Вызванная квантовая секреция медиатора чрезвычайно чувствительна к изменениям МП нервного окончания во время распространяющегося нервного импульса (Katz В., Miledi R., 1967 в; Van der Kloot W., Molgo J., 1994), следовательно, модулируя характеристики ПД нервной терминали можно регулировать функцию синапса. Среди факторов, оказывающих влияние на двигательные нервные окончания, особое место занимает АХ, способный осуществлять ауторегуляцию синаптической передачи по принципу обратной связи. Концентрация АХ, создаваемая в синаптической щели после прохождения одиночного импульса по нерву, по данным разных авторов, достигает от 0.3 до 100 мМ (Katz В., 1969, Kuffler S.W., Yoshikami D., 1975). В двигательном нервном окончании лягушки экзогенный АХ в зависимости от концентрации изменял амплитуду потенциал- и Са-активируемых К-токов (Зефилов А.Л., Шакирьянова Д.М., 1992, Shakiryanova D.M. et al., 1994). В концентрации - 0.5 мМ АХ увеличивал, а в концентрации 1 мМ – снижал амплитуду третьей фазы ответа нервного окончания, отражающей потенциал-активируемые К-токи. Кроме того, в концентрациях 0.5-1 мМ АХ подавлял также Са-активируемые К-токи нервного окончания. Таким образом, при возникновении определенных условий в процессе функционирования синапса, приводящих к накоплению выделяющегося в синаптическую щель медиатора, эндогенный АХ способен оказывать влияние на параметры ионных токов нервного окончания, и обнаруженный феномен является одним из механизмов модуляции уровня секреции медиатора. Особое значение модификация К-токов медиатором имеет при длительной ритмической активности синапса или в

условиях нарушения гидролиза АХ, в частности, при отравлениях антихолинэстеразными препаратами.

Известно, что катехоламины вызывают облегчение синаптической передачи, однако, оказалось, что физиологической активностью обладают и их естественные метаболиты, относящиеся к классу фенольных соединений (Полетаев Г.И., 1972; Халилов И.А., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л., 1993). В нервно-мышечном синапсе лягушки пирокатехин уменьшал потенциал-активируемые К-токи, что сопровождалось увеличением длительности ПД нервного окончания и усилением секреции медиатора (Ситдикова Г.Ф. и др., 1995, 1996, Sitdikova G.F., Shakiryanova D.M., Zefirov A.L., 1998).

Ионы цинка оказывали двухфазные эффекты на секрецию медиатора и ионные токи нервного окончания лягушки. Первоначальное усиление секреции было связано с угнетением потенциал- и Са-активируемых К-токов и расширением пресинаптического ПД. Последующее угнетение секреции, сопровождающееся резким изменением формы ответа нервного окончания, было связано с комплексным нарушением проводимости всех ионных каналов мембраны (Зефирова и др., 1999).

Оксид азота (II) (NO) – газ, эндогенно синтезирующийся в организме, является регулятором и модулятором многих физиологических функций (Garthwaite J., 2008, Уразаев А.Х, Зефирова А.Л., 1999, Капилевич Л.В. и др, 2000, Малышев И.Ю. и др., 2000, Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ванин А.Ф., 2000, Сосунов А.А., 2000, Boehning D, Snyder S.H., 2003, Зефирова А.Л., 2005, Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л., 2006). NO синтезируется в области нервно-мышечного синапса и является модулятором освобождения АХ как у холоднокровных, так и у теплокровных животных (Lindgren S.A., Laird M.V., 1994; Зефирова А.Л. и др., 1999; Mukhtarov M.R. et al., 1999). В наших исследованиях было показано, что NO приводил к увеличению потенциал-активируемых К- и уменьшению Са-активируемых К-токов нервного окончания лягушки. Усиление потенциал-активируемых К-токов сопровождалось снижением длительности ПД и уменьшением секреции медиатора (Зефирова А.Л. и др., 1999, 2001, Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л., 2002).

Арахидоновая кислота – *cis*-полиненасыщенная жирная кислота является важным компонентом мембранных липидов и служит биологически активной

сигнальной молекулой (Katzuki H., Okuda S., 1995). Освобождение арахидоновой кислоты из мембраны происходит при активации фосфолипаз в ответ на различные стимулы. В наших работах были показаны эффекты арахидоновой кислоты и других ненасыщенных и насыщенных жирных кислот на ионные токи двигательного нервного окончания и секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. Арахидоновая кислота и простагландин E₂ уменьшали токи через потенциал-активируемые K-каналы, Ca-активируемые K-каналы и угнетали Ca-токи нервного окончания (Архипова О.В. и др., 2005, Яковлева О.В. и др., 2006).

4.3.2. Кальциевые каналы нервного окончания в процессах экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора

Виды Ca-каналов в нервном окончании. Практически все типы Ca-каналов были обнаружены в двигательных нервных окончаниях у разных видов животных. У насекомых выявлены каналы P и/или Q-типа (Bindakas V.P., Vehema V.J., Adams M.E., 1991), у омара – N-типа (Grossman Y., Colton J.S., Gilman S.C., 1991), у ящерицы - L-типа (Lindgren C.A., Moore J.W., 1989, 1991), у лягушки – L и N- типов (Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Charlton M.P., 1993), в электромоторных нейронах электрических рыб – каналы N- (Farinas I., Solona C., Marsal J., 1992) и Q-типа (Richardson C.M., Dowdall M.J., Green A.C., Bowman D.D., 1995). В двигательных нервных окончаниях мышцы обнаружены каналы L-типа (Hong S.J., Lee S.H., Chang C.C., 1995), вместе с каналами N, P- (Protti D.A., Uchitel O.D., 1993) и P/Q-типов (Sugiura Y., Woppmann A., Miljnich G.P., Ko C. P., 1995), тогда как у крыс найдены каналы только N-типа (Hamilton B.R., Smith D.O., 1992), а у человека каналы P-типа (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999).

Картина распределения Ca-каналов в различных участках ЦНС достаточно пестрая. Чувствительные нейроны спинного мозга содержат, в основном, N-тип каналов, хотя описаны также каналы L- и P-типа (Mendelowitz D., Reynolds P.J., Andersen M.C, 1995). В нервных окончаниях верхнего шейного ганглия доминируют каналы P-типа, а также имеется небольшое количество каналов N-типа (Regehr W.G., Mintz I.M., 1994). В

нейрогипофизе присутствуют каналы L, N, и P/Q- типа (Wang X., Wang G., Lemos J.R., Triestman S.N., 1994), однако, только каналы N-типа контролируют секрецию (Von Spreckelsen S., Lollike K., Treiman M., 1990). В мозжечке доминируют каналы P-типа с небольшим количеством каналов N-типа. В цереброкортикальных синапсах (Thomas M.M., Puliganla P.S., Dunn S. M., 1994), в синапсах фронтальной коры и минисрезах неокортекса присутствуют P-тип каналов. В сетчатке представлен L-тип Ca-каналов. Секреция основных медиаторов в ЦНС контролируется различными Ca-каналами. Так, освобождение ГАМК контролируется N-типом каналов с небольшим вкладом L-типа каналов (Kirk I.P., Richardson P.J., 1995), дофамина - всеми типами каналов в равной степени (N, L и P/Q) (Carvalho C.M., Ferreira I.L., Duarte C.V. et al, 1995), глутамата - только P-типа (Turner T.J., Adams M.E., Dunlap K., 1993). В культуре гиппокампальных нейронов функция N-типа каналов обеспечивает экзоцитоз везикул с небольшим вкладом каналов P/Q и L-типа (Reuter H., 1995). На препаратах срезов гиппокампа P/Q-тип каналов определяет секрецию медиатора, а вклад N-типа каналов значительно меньше (Luebke J., Dunlap K., Turner T.J, 1993). В ряде исследований было показано, что отдельные нервные окончания нейронов аплизии (Fossier P., Baux G., Poulan B., Tauc L., 1990), висцеральных сенсорных нейронов крысы (Mendeowitz D., Reynolds P.J., Andersen M.C, 1995), нейронов нейрогипофиза (Wang X., Wang G., Lemos J.R., Triestman S.N., 1994), клеток Пуркинье (Mintz I.M., Sabatini B.L., Regehr W.G., 1995) содержат более одного типа Ca-каналов, участвующих в секреции медиатора. Предполагается, что разные типы Ca-каналов на одном нервном окончании необходимы для кинетически различных фаз освобождения медиатора и защиты от различных видов токсинов, блокирующих Ca-каналы (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999).

Исследование функциональных свойств Ca-каналов методом пэтч-кламп возможно только на ограниченном числе нервных окончаний, среди которых пептидергические нервные окончания нейрогипофиза (Wang X., Triestman S.N., Lemos J.R., 1992), синапсы типа Calyx of Held (Stanley E.F., Goping G., 1991, Forsythe I. D., 1994), биполярные нейроны сетчатки золотой

рыбки (Heidelberg R., Matthews G., 1992). Потенциал-активируемые Са-каналы, обнаруженные в нервных окончаниях, являются высокопороговыми и, следовательно, активируются распространяющимся ПД. Большинство детально исследованных Са-каналов нервных окончаний по своим характеристикам не вписываются в общепринятую классификацию и включают функциональные и фармакологические свойства различных типов каналов. Например, в нервном окончании нейрогипофиза обнаружен N_t тип каналов, который является комбинацией N и Q типов. Эти каналы, имеет проводимость 11 пСм, порог активации около -10 мВ и проявляют потенциал-зависимую инактивацию (Wang X., Triestman S.N., Lemos J.R., 1992).

Свойства Са-каналов нервного окончания: особенности регуляции и модуляции. Величина Са-токов зависит от внеклеточной концентрации ионов Са. Кроме того, ионы Sr и Ba также могут проходить через эти каналы. У лягушек, ящериц, мышей и крыс Са-ток в двигательных нервных терминалях можно заблокировать ди- и трехвалентными катионами, такими как Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} и Gd^{3+} в концентрациях от микромолярных до миллимолярных (Van der Kloot W., 1991). Терминали у различных видов позвоночных животных имеют разную чувствительность к органическим блокаторам каналов и активатору ВАУ К 8644, который увеличивает Са-ток через дигидропиридин-чувствительные каналы. В терминалях мышей и крыс Са-ток нечувствителен к высоким концентрациям D-600, нитрендипина, низолипина, нифедипина и ВАУ К 8644. В нервных терминалях ящериц Са-ток обратимо блокировался нифедипином, в то время как ВАУ К 8644 обладал неустойчивым эффектом на Са-ток (Van der Kloot W., 1991). Антибиотики канамицин, беканамицин и полимиксин В снижали, но не устраняли, Са-ток в терминалях мышей. Эти катионные антибиотики могут «снимать» или нейтрализовать негативные заряды на пресинаптической мембране, повышая, тем самым, электрический порог активации Са-каналов. ω -конотоксин GVIA - компонент яда морской улитки *Conus geographus*, необратимо блокировал Са-ток в моторных терминалях у лягушек и ящериц (Lindgren C. A., Moore J.W., 1991), но не влиял на Са-ток в нервных терминалях мышей (Anderson A.J., Harvey A.L., 1987). В терминалях крыс 10 нМ ω -конотоксин блокировал 35% Са-тока (Hamilton B.R., Smith D.O., 1992). В нервно-мышечном соединении у мышей Са-ток

блокировался ядом паука FTX, выделенного из Американского паука *Agelenopsis aperta* и его синтетическим аналогом sFTX. Синтетический полипептид ω -агатоксин (ω -Aga IVA) блокировал Ca-ток в терминалях у мышей и других позвоночных животных (Van der Kloot W., 1991).

Модуляция Ca-каналов нервного окончания играет ключевую роль в регуляции секреции медиатора и, следовательно, в синаптической передаче. Модуляция работы Ca-каналов может осуществляться несколькими путями. Во-первых, показано, что ряд гормонов и медиаторов, действуя на пресинаптические рецепторы, изменяют секрецию медиатора из нервного окончания (Abdul Ghani M., Meiri H., Rahamimoff R., 1991, Vilim F.S., Crooper E.C., Price D. et al., 1996) за счет активации ингибиторных G-белков и модификации работы Ca-каналов (Scott R.H., Dolphin A.C., 1987). $\beta\gamma$ субъединицы активированного G-белка могут непосредственно подавлять активность Ca-каналов (Ikeda S.R., 1996, Dolphin A.C., 1997, Hille B., 1994). Изменение активации Ca-каналов обнаружено при действии гистамина (Fossier P., Vaux G., Poulan B., Tauc L., 1990), 2-гидрокситриптамина (Eliot L.S., Kandel E.R., Siegelbaum S.A., Blumenfeld H., 1993), нейропептида Y (Toth P.T., Bindokas V.P., Bleakman D. et al., 1993), соматостатина, опиатов (Taddese A., Nah S. Y., McCleskey E.W., 1995) и глутамата (Van Den Pol A.N., 1995). Основными и наиболее изученными рецепторами нервного окончания, которые могут регулировать работу Ca-каналов через G-белок являются АХ-рецепторы. Карбахол, агонист АХ-рецепторов, модулирует освобождение дофамина в срезах префронтальной коры (Jaffe E. H., Hernandez N., 1989). В двигательных нервных окончаниях крысы АХ ингибирует свое собственное освобождение посредством уменьшения Ca-тока (Hamilton B.R., Smith D.O., 1991). Адреналин и норадреналин модулируют Ca-ток посредством различных адренорецепторов иногда с противоположно направленными эффектами. Обнаруженные адренорецепторы являются как ауто-, так и гетерорецепторами, модулирующими освобождение АХ и вещества Р. Аденозиновые рецепторы могут считаться ауторецепторами в различных системах, так как аденозин является продуктом расщепления АТФ, которая освобождается вместе с медиаторами. В мотонейронах мыши и крысы было обнаружено, что активация аденозиновых рецепторов через каскад G-белка, приводит к ингибированию

пресинаптических Са-каналов N-типа (Hamilton B.R., Smith D.O., 1991). В ряде объектов было показано, что ГАМК действуя на ГАМКв рецепторы пресинаптической мембраны ингибирует высокопороговые Са-каналы нервного окончания (Holz G.G.T., Kream R.M., Spiegel A., Dunlap K., 1989). Общепринято, что ГАМК действует на Са-каналы N и P/Q-типа, но показано также ее влияние на каналы L и R-типа (Wu L.G., Borst J., Sakmann B., 1998).

Вторым путем модуляции Са-каналов может быть их фосфорилирование или дефосфорилирование. В синапсосомах гиппокампа морской свинки показано, что протеинкиназа C усиливает освобождение глутамата путем увеличения активности Са-каналов (Terrian D.M., 1995). В синапсосомах коры головного мозга крысы освобождение глутамата и Са-токи уменьшались при дефосфорилировании под действием кальцийнейрина (Sheng Z.H., Rettig J., Takashi M., Catterall W.A., 1994). Оказалось, что существует динамическое равновесие между фосфорилированием протеинкиназой C (активацией) и дефосфорилированием (инактивацией) фосфатазами. Фосфорилирование протеинкиназой C происходит во внутриклеточной петле $\alpha 1$ -субъединицы Са-канала, которая также связывает ингибирующий белковый комплекс G-белка (Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D. et al., 1997).

Множество вне- и внутриклеточных сигналов, имеющих химическую или физическую природу, являются модуляторами Са-каналов нервного окончания. В синапсосомах стриатума крысы закисление внеклеточной среды ингибирует освобождение дофамина путем блокирования Са-каналов (Drapeau P., Nachshen D.A., 1998). Растяжение камбаловидной мышцы крысы усиливает Са-вход (Yamasita T., Ishii S., Oota I., 1992). В симпатических нервах почки, селезенки, сердца, сосудов простагландин E2 ингибирует, а ингибиторы циклооксигеназ увеличивают освобождение норадреналина посредством ω -конотоксин чувствительных каналов (Malik K.U., Sehic E., 1990). В синапсосомах коры мозга крысы глюкокортикоиды усиливают кальмодулин-зависимую активацию Са-каналов (Sze P.Y., Yu B.H., 1995). В синапсосомах электрического органа Torpedo лактат может ингибировать освобождение АХ из нервного окончания путем блокирования Са-каналов (Gaudry Talarmain Y.M., 1986). В исследованиях на клетках нейробластомы человека и клеточной линии феохромоцитомы крысы (Passafaro M., Rosa P., Sala C. et al., 1996) был

предположен еще один механизм модуляции Са-каналов. Оказалось, что некоторые вещества, такие как КСl, иономицин, форболовый эфир, вызывают транслокацию Са-каналов N-типа из внутриклеточного пула в поверхностную мембрану. Если данный механизм существует также в нервных окончаниях, то соответствующие воздействия, вызывающие встраивание новых Са-каналов в мембрану, будут увеличивать секрецию медиатора и надежность синаптической передачи.

Са-каналы и экзоцитоз. В нервных окончаниях Са-каналы объединены в кластеры, которые находятся в непосредственной близости от белковых элементов экзоцитоза и везикул (Dreyer F. et al., 1973, De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E, 2001). Эти образования получили название активных зон (Couteaux D. E. M., Pecot-Dechavassine M., 1970). Наиболее изученной является активная зона двигательного нервного окончания лягушки, которая состоит из пресинаптической плотной полосы, расположенной поперек нервного окончания, около которой в два двойных ряда расположены Са-каналы и в два одиночных ряда 40-50 синаптических везикул (рис. 57). Расстояние между активными зонами составляет 1-2 мкм (Dreyer F. et al., 1973, Peper K. et al., 1974).

Электрофизиологические исследования показали, что именно в активной зоне происходит спонтанное и вызванное освобождение медиатора (Бениш Т.В., Зефирова А.Л., Фаткуллин Н.Ф., 1988, Zefirov A.L. et al., 1995, De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001, Зефирова А.Л., 2000, 2004, Зефирова А.Л. и др., 1990). По современным представлениям синаптическая везикула, Са-канал или каналы и белки экзоцитоза (синтаксин, SNAP-25, синаптотагмин и др.) тесно связаны между собой и функционируют как единое целое, а разрушение этой связи приводит к серьезным изменениям механизма освобождения (Зефирова А.Л., Черанов С.Ю., 2000, De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E., 2001). Было обнаружено, что $\alpha 1$ и $\beta 1$ субъединицы N- и P/Q типов Са-каналов непосредственно взаимодействуют с синтаксином и SNAP-25 через цитоплазматическую петлю, соединяющую их II и III домены (Sheng Z.H., Retting J., Takahashi M., Catterall W.A., 1994, Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999). Применение пептидов, взаимодействующих с этой цитоплазматической петлей, или ее фосфорилирование приводит к

изменению зависимости экзоцитоза от ионов Ca и угнетению синаптической передачи за счет нарушения процесса докиривания везикул. Было обнаружено, что синтаксин снижает функциональную активность N- и Q-типов каналов за счет стабилизации процессов инактивации в канале (Bezprozvanny I., Scheller R.H., Tsien R.W., 1995). Таким образом, связь Ca-канала с синтаксином и SNAP-25 обеспечивает докиривание синаптической везикулы в активной зоне и предотвращает процессы случайного экзоцитоза докириванных везикул.

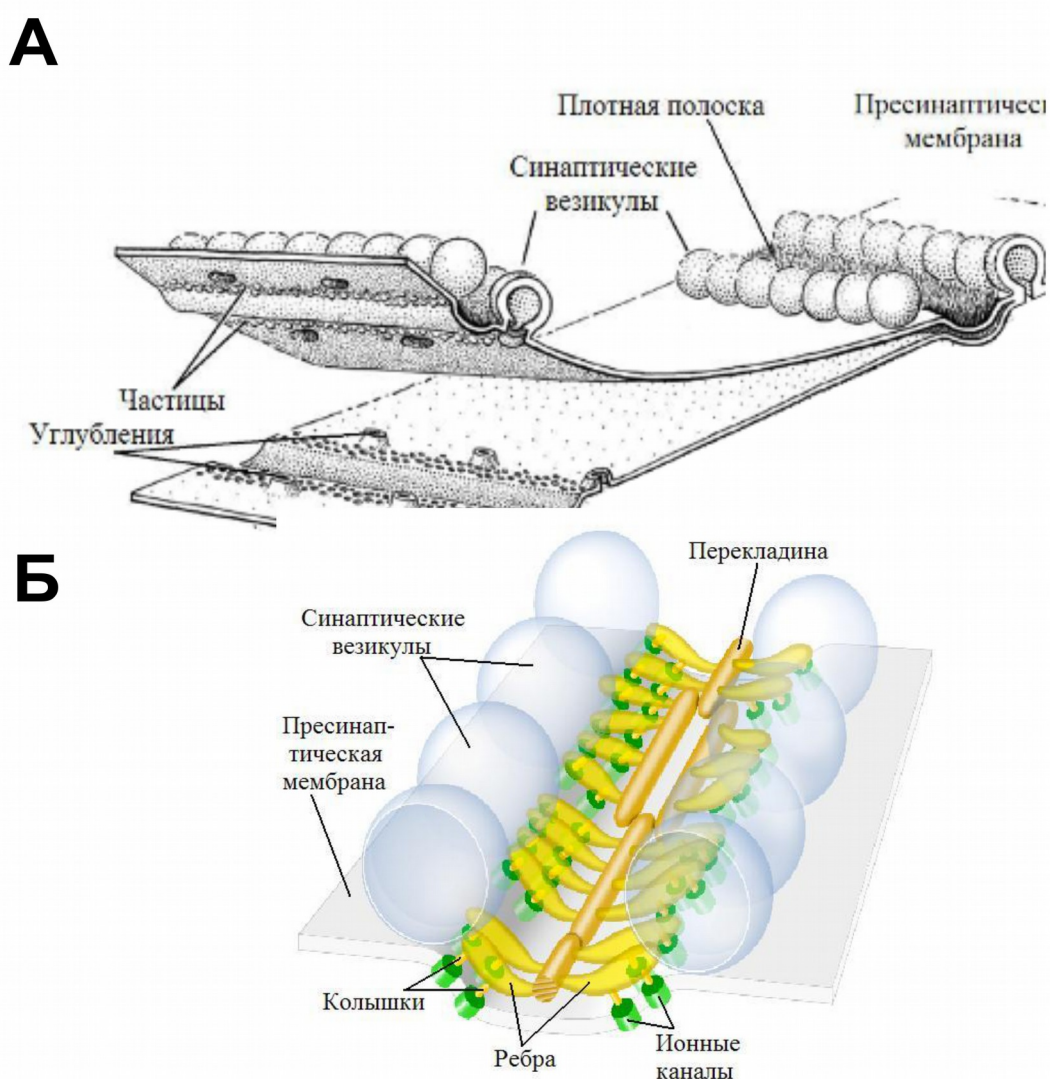


Рис. 57. Активная зона нервно-мышечного синапса лягушки

А - Метод замораживания–скалывания. Представлен скол пресинаптической мембраны под которой располагается синаптическая щель. На цитоплазматическом листке пресинаптической мембраны видны плотные

полоски, идущие поперек нервного окончания, около которых в два ряда располагаются синаптические везикулы. Рядом с везикулами в мембране находятся крупные частицы – Са-каналы. В области активной зоны наблюдаются углубления, отражающие процесс экзоцитоза синаптических везикул.

Б - Трехмерная реконструкция активной зоны с использованием электронно-микроскопической томографии. Посередине активной зоны расположены «перекладины», от которых отходят «ребра», контактирующие другим концом с синаптическими везикулами. К ребрам также крепятся «колышки», соединенные с субъединицами ионных каналов пресинаптической мембраны. «Ребра» и «колышки» являются белками экзоцитоза. (из Harlow M.L. et al., 2001 с изменениями).

Модельные исследования в 80-90-х годах 20 века показали, что внутриклеточная концентрация ионов Ca нарастает и спадает очень быстро в непосредственной близости от Ca-канала, когда он открывается и закрывается (Chad J.E., Eckert R., 1984, Simon S.M., Llinas R.R., 1985, Yamada [W.M.](#), Zucker R.S., 1992, Zucker R.S., 1986). Таким образом, быстрое увеличение, а затем снижение вероятности секреции медиатора во время ПД может быть объяснено очень близкой (десятки нм) колокализацией Ca-каналов и синаптической везикулы. Методика освобождения связанного внутриклеточного кальция путем вспышечного фотолитиза позволила установить, что для инициации секреции необходимы микромолярные уровни Ca в различных объектах (Beutner D., Voets T., Neher E., Moser T., 2001, Bollmann J., 2000, Hsu S.F., Augustine G.J., Jackson M.B., 1996, Lando L., Zucker R.S., 1994, Schneggenburger R., Neher E., 2000, Thoreson W.B., Rabl K., Townes-Anderson E., Heidelberger R., 2004). Если учесть, что уровень цитозольного Ca в покое составляет около 50 нМ, то максимально близкое расположение источника ионов Ca и триггера экзоцитоза является рациональным и энергетически выгодным решением, поскольку выкачивание ионов Ca из цитоплазмы достаточно энергозатратный процесс. Подобные построения согласуются с данными о том, что уровень цитозольного Ca в нервном окончании лягушки не превышает 2-3 мкМ даже при высокочастотной активности (Suzuki S., Osanai M., Murase M. et al., 2000). Доказательства наличия короткоживущих, локальных областей повышенной концентрации ионов Ca в нервных окончаниях – кальциевых микродоменов были получены в экспериментах с высокоскоростной регистрацией Ca-сигналов с разрешением в доли микрометров. Имиджинг низкоаффинного Ca индикатора акворина показал наличие отдельных пятен диаметром менее 1 мкм в примембранном пространстве, при этом длительность люминисцентного сигнала была не более 1 мсек (Llinas R., Sugimori M., Silver R.B., 1995). Концентрация Ca в таком микродомене достигала сотен мкМ. Данные о наличии локальных короткоживущих Ca облаков в примембранных слоях пресинаптических терминалей были получены в экспериментах на культуре нервно-мышечных синапсов, слуховых волосковых клетках, биполярных нейронах, хромоаффинных клетках и др. (Augustine G.J., 2001, DiGregorio D.A., Peskoff A., Vergara J.L., 1999, Roberts W.M., 1994, Zucker R.S., 1996). Таким

образом, была сформулирована концепция кальциевых микродоменов, согласно которой секреция нейромедиатора осуществляется за счет кратковременного (около 1 мс) строго локального (0.5-1 мкм) и значительного (до сотен микромолей) повышения концентрации ионов Са в непосредственной близости от устья открытого Са-канала, расположенного рядом с синаптической везикулой. До сих пор ведутся споры, относительно того, сколько Са-каналов обеспечивает экзоцитоз одной везикулы. Существуют гипотезы «одионого домена» (один канал) и «перекрывающихся доменов» (несколько каналов). Во втором случае предполагается более высокая кооперативность ионов Са (Schneppenburger R., Neher E., 2005). Можно думать, что в реальных условиях существуют оба механизма, а выраженность того или другого зависит от активности синапса и особенностей объекта (пространственное распределение Са-каналов, вероятность открытия канала при деполяризации, проводимость каналов, электрохимический градиент для входящего потока Са и др.). В чашевидном синапсе Хелда значительная часть Са-каналов открывается в ответ на одиночный ПД, и секреция везикулы запускается благодаря работе нескольких каналов (Schneppenburger R., Neher E., 2005). Сходная ситуация в бутонах мшистых волокон гиппокампа, где в ответ на одиночный ПД открывается 90% пресинаптических Са-каналов (Augustine G.J., 2001). В то же время, в гигантском синапсе кальмара, цилиарном ганглии цыпленка и нервно-мышечном синапсе лягушки только малая часть каналов открывается при ПД, и секреция может запускаться входом Са через один канал (Stanley E.F., 1997). Вход ионов Са через большое количество близко расположенных каналов образует область повышенной концентрации ионов Са в определенном участке нервного окончания и формирует так называемый кальциевый макродомен. По всей видимости, кальциевый макродомен создается в области целой активной зоны, а может включать и несколько соседних близко расположенных активных зон. Обычно такие макродомены возникают при высокочастотной ритмической активности синапса; концентрация Са в подобном макродомене значительно ниже по сравнению с микродоменом и составляет не более нескольких микромолей (Smith S.J., Buchanan J., Osses L.R. et al., 1993, Suzuki S., Osanai M., Murase M. et al., 2000). Исчезновение как микро-, так и макродоменов Са связано с диффузией Са в цитозольном пространстве и работой внутриклеточных Са-

связывающих систем. Обнаружено, что в регуляции внутриклеточной концентрации ионов Ca принимают участие митохондрии, ЭПР, везикулы и другие кальцийсвязывающие буферные системы (Балезина О.П., Букие А.Н., Лаптева В.И., 2001, Rozov A., Burnashev_N., Sakmann_B., Neher E., 2001, Rose C.R., Konnerth A., 2001). Са-буферы способны не только быстро утилизировать ионы Са, но и некоторое время поддерживать высокую локальную внутриклеточную концентрацию ионов за счет их освобождения в цитоплазму. Отсюда кальциевый макродомен существует большее время, чем длительность входящего Са-тока (Augustine G.J., Adler E.M., Charlton M.P., 1991, Smith S.J., Buchanan J., Osses L.R. et al. 1993).

Мы рассмотрели роль ионных каналов в деполяризации мембраны нервного окончания и освобождении медиатора. В следующем разделе рассмотрим, какие ионные каналы принимают участие в формировании постсинаптических сигналов.

4.3.3. Ионные каналы и постсинаптические электрические сигналы

Постсинаптические потенциалы и токи в нервно-мышечном синапсе. В нервно-мышечном синапсе позвоночных животных из пресинаптического нервного окончания выделяется нейромедиатор - АХ а на постсинаптической мембране расположены ионотропные Н-АХ-рецепторы. Выделение квантов АХ вызывает активацию Н-АХ-рецепторов и возникновение потенциала концевой пластинки (ПКП). ПКП впервые были зарегистрированы при помощи стеклянных микроэлектродов в 50-х годах 20-го века (рис. 58). Помимо ПКП, вызванных ПД, можно зарегистрировать миниатюрные ПКП, возникающие спонтанно в отсутствие стимуляции (рис. 58 В) (Fatt P.,Katz. B., 1951). Если регистрирующий микроэлектрод отдалять от области концевой пластинки, то амплитуда ПКП уменьшается, а их длительность увеличивается, что свидетельствует о том, что ПКП возникает только в области синаптического контакта. Ионная природа ПКП была установлена в 60-х годах с использованием метода фиксации МП (рис. 59). Было выявлено, что величина и направление ионных токов - ТКП, лежащих в основе ПКП, зависят от величины потенциала на мембране.

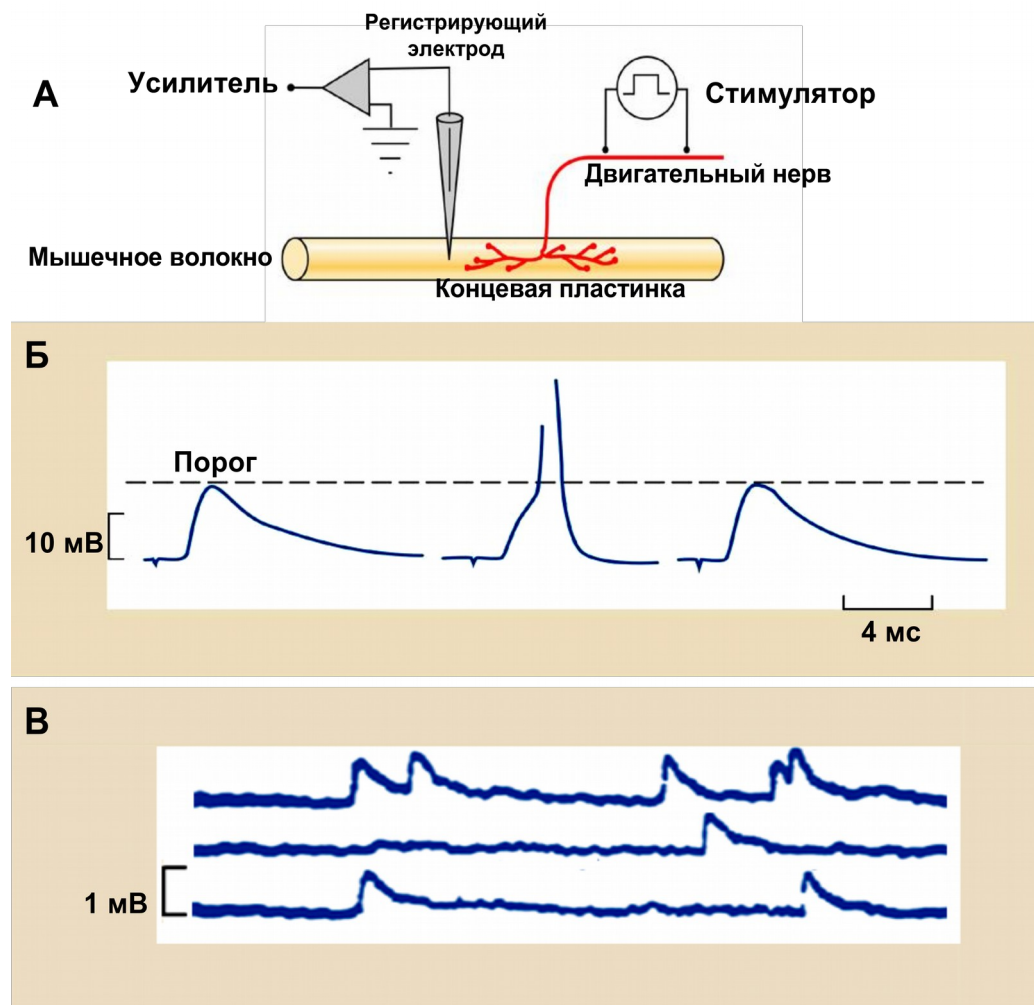


Рис. 58. Регистрация постсинаптических потенциалов в нервно-мышечном синапсе.

А – схема эксперимента. Мышца, выделенная вместе с иннервирующим ее двигательным нервом, помещается в ванночку с физиологическим раствором. Двигательный нерв стимулируется прямоугольными толчками тока при помощи металлических электродов, подключенных к стимулятору. Для отведения ПКП используют регистрирующий микроэлектрод (заполненная раствором электролита стеклянная пипетка с острым кончиком, в которую введена хлорсеребряная проволока), подключенный к усилителю. Регистрация ПКП осуществляется путем введения регистрирующего электрода в синаптическую область мышечного волокна. Б – графическая запись ПКП на фоне блокирования Н-АХ-рецепторов ядом кураре. Концентрация кураре подобрана таким образом, что амплитуда ПКП иногда достигает порога генерации ПД (второй сигнал), а иногда нет (первый и третий сигналы). В – в отсутствии стимуляции двигательного нерва возникают спонтанные, миниатюрные ПКП, амплитуда которых значительно меньше. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

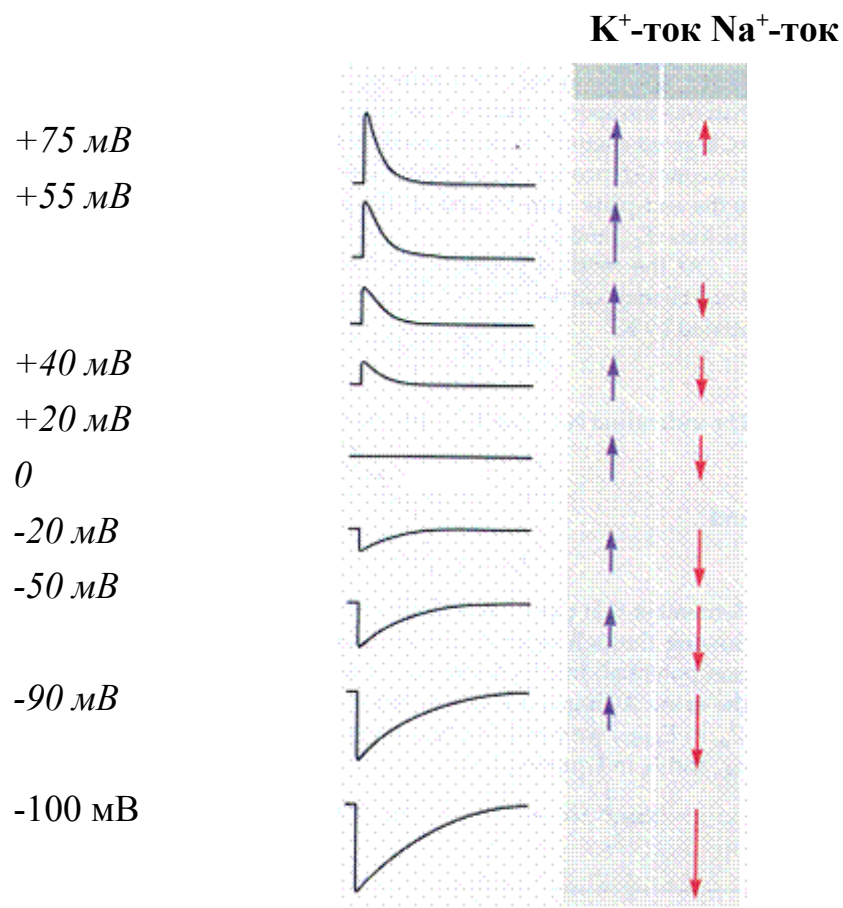


Рис.59. Зависимость амплитуды и полярности токов концевой пластинки от мембранного потенциала мышечного волокна.

Показаны ТКП (справа) и движущие силы для натрия и калия (стрелки слева), при разных значениях мембранного потенциала. Направление стрелки вверх указывает на направление движущей силы – из клетки, вниз – в клетку) (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

При потенциале мембраны скелетного мышечного волокна -90 мВ (потенциал покоя) ТКП имеют входящее направление. Снижение МП в сторону положительных значений приводит к уменьшению амплитуды ТКП и при потенциале фиксации около 0 мВ амплитуда ТКП становится равной нулю. Эта величина потенциала на мембране получила название потенциала реверсии (Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003). Дальнейшее смещение потенциала фиксации в сторону положительных значений приводит к тому, что ТКП приобретают выходящее направление (Рис. 59). Потенциал реверсии ТКП дает возможность определить какие ионные токи протекают через каналы Н-АХ-рецепторов. Например, если бы каналы были проницаемы только для Na, то потенциал реверсии был бы близким к натриевому равновесному потенциалу (около $+50$ мВ). Для K и Cl потенциал реверсии составляет около -90 мВ, а для кальция $+120$ мВ. Оказалось, что канал Н-АХ-рецептора проницаем сразу для нескольких ионов. Изменение наружной концентрации Na, K и Ca влияло на величину потенциала реверсии, чего не происходило при изменении наружной концентрации Cl. На основании этих данных был сделан вывод, что Н-АХ-рецепторы пропускают все катионы, главными из которых являются ионы Na и K. В этом случае при потенциале реверсии через канал будут протекать токи одинаковой величины, но противоположного направления - входящий Na и выходящий K. При смещении потенциала в ту или другую сторону от значения потенциала реверсии будет наблюдаться преобладание Na или K-токов (Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Постсинаптические потенциалы и токи в межнейрональных синапсах. ПКП скелетной мышцы является возбуждающим, поскольку он деполяризует мембрану и при достижении критического уровня деполяризации приводит к возникновению ПД. Аналогичные потенциалы возникают в межнейрональных синапсах и носят название **возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП)**. В ЦНС они возникают при активации рецепторов к глутамату (НМДА и АМПА), аспартату и некоторым другим медиаторам. В общем виде, возбуждающим эффектом будут обладать те ионотропные рецепторы, канальная пора которых проницаема для Na и/или Ca. Помимо возбуждающих в ЦНС существуют и **тормозные постсинаптические**

потенциалы (ТПСП). Они обладают противоположными свойствами, то есть гиперполяризуют постсинаптическую мембрану, понижают возбудимость клетки и препятствуют генерации ПД. Процесс генерации тормозных потенциалов получил название постсинаптического торможения. В центральных синапсах ТПСП возникают при активации глициновых рецепторов и рецепторов к ГАМК, пропускающих ионы Cl внутрь клетки либо ионы K – из клетки (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002). Для центральных синапсов характерны процессы суммации постсинаптических потенциалов. Известно, что на одном нейроне может образовываться до нескольких тысяч синапсов. Информация, поступающая к нейрону по огромному количеству синапсов в виде постсинаптических потенциалов, интегрируется мембраной клетки, что приводит к постоянному колебанию МП. Суммация ВПСП обеспечивает достижение критического уровня деполяризации и генерации ПД в аксоном холмике. Суммация ТПСП приведет к гиперполяризации мембраны и увеличению порога генерации ПД.

В качестве примера рассмотрим постсинаптические потенциалы, возникающие в глутамат- и ГАМК-ергических синапсах. Как уже было сказано выше ионотропные рецепторы глутамата можно разделить на три основных подтипа: НМДА-, АМПА- и каинатные, различающиеся по структуре, ионной селективности, проводимости, кинетике активации, аффинности к глутамату. В большинстве центральных синапсов глутамат вызывает двухкомпонентный ВПСП (рис. 60). Активация АМПА-рецепторов опосредует компонент с быстрым нарастанием и спадом, тогда как компонент, опосредованный НМДА-рецептором, имеет медленное нарастание и спад, продолжающийся несколько сотен миллисекунд.

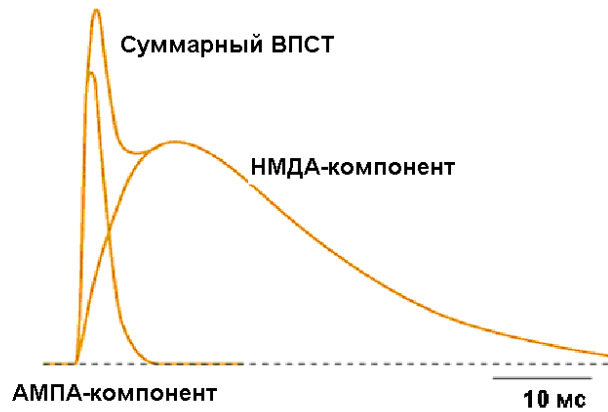


Рис. 60. Постсинаптический сигнал в глутаматергическом синапсе

Суммарный возбуждающий постсинаптический ток (ВПСТ) состоит из двух компонентов. АМРА-зависимый компонент обладает быстрой кинетикой нарастания и спада (миллисекунды), тогда как NMDA-компонент – медленной кинетикой (десятки миллисекунд). (Из Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006 с изменениями).

Быстрая десенситизация АМПА-рецепторов контролирует временное течение ВПСП во многих синапсах, тогда как медленная активация НМДА-рецепторов обеспечивает возможность временной и пространственной суммации множественных входов. Как правило НМДА- и АМПА-рецепторы колокализированы, но иногда их пространственное расположение может и различаться. В первом случае при активации синапса будут возникать двухкомпонентные постсинаптические потенциалы, во втором – либо быстрые (АМПА), либо медленные (НМДА) потенциалы (Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L., 2006, Магазанник Л.Г., 2007).

Ионотропные рецепторы ГАМК делятся на два основных типа. ГАМК_A- и ГАМК_C, -представляющие собой лиганд-зависимые Cl-каналы, результатом действия ГАМК является повышение проницаемости мембраны для Cl, который входит в клетку и приводит к гиперполяризации мембраны (рис. 61). Гиперполяризация мембраны и увеличение общей мембранной проводимости ведет к снижению амплитуды последующих входящих токов (Rudomin P., Jimenez I., Quevedo J., Solodkin M., 1990). Кроме того, деполяризация, связанная с активацией хлорной проводимости (при равновесном потенциале для хлора выше МП покоя), может инактивировать некоторые Ca- и Na-каналы. ГАМК_A Cl-каналы могут также участвовать в механизмах пресинаптического торможения.

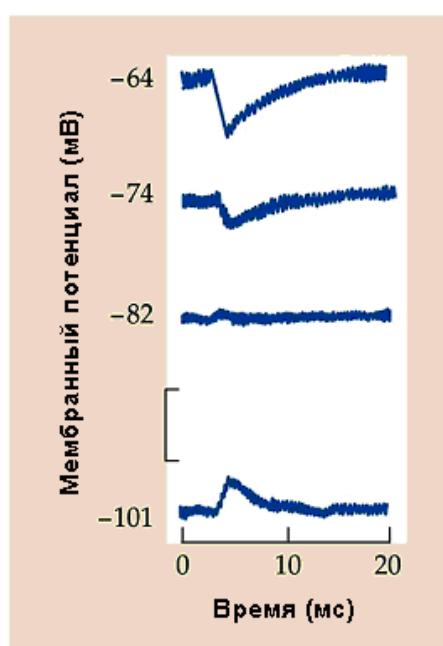


Рис. 61. ГАМК-ергические постсинаптические потенциалы

Показан тормозной постсинаптический потенциал, зарегистрированный при разных уровнях потенциала на мембране. Потенциал реверсии составляет -82 мВ, что соответствует равновесному потенциалу для Cl и подтверждает хлорную природу ГАМК-ергического потенциала. В покое МП нейрона менее отрицателен (-60 - -70 мВ), и ГАМК-ергический потенциал является тормозным, гиперполяризующим. При сильно отрицательных значениях МП (-90

- -100 мВ) он становится деполяризующим. (Из Nicholls J.G. et al., 2003 с изменениями).

Активация ГАМК_A Cl-каналов приводит к замедлению распространения ПД (Wall P., 1995) и уменьшению количества нейромедиатора, освобождаемого нервным импульсом (Rudomin P., Jimenez I., Quevedo J., Solodkin M., 1990). Открытие ГАМК_A-каналов ведет к ингибированию секреции медиатора в таких объектах, как спинной мозг лягушки (Rudomin P., Jimenez I., Quevedo J., Solodkin M., 1990), обонятельная кора (Pickles H.G., 1979), гипофиз (Jackson M.B., 1995), сетчатка крысы (Tachibana M., Kaneko A., 1987), нервно-мышечное соединение речного рака (Finger W., Martin C., 1989).

На ранних стадиях постнатального развития у крыс, обезьян (возможно, и у человека) ГАМК, так же, как глутамат, оказывает деполяризующее, то есть возбуждающее действие на нейроны. Это связано с тем, что в постнатальном периоде концентрация ионов Cl в нейронах настолько велика, что при открывании Cl-каналов ГАМК-рецепторов Cl по градиенту идет не внутрь, а наружу, тем самым деполяризуя мембрану (Owens D.F., Boyce L.H., Davis M.B., Kriegstein A.R., 1996, Reichling D.B., Kyzozic A., Wang J., Macdermott A.B., 1994). В ходе дальнейшего развития организма происходит созревание системы удаления Cl из клеток, и ГАМК становится тормозным медиатором (Hubner C. et al., 2001). Этот интересный феномен играет важное значение в развитии нервной системы. В раннем постнатальном периоде содружественное действие глутамата и ГАМК вызывает «гигантские деполяризующие потенциалы», которые, как считают, обеспечивают созревание синапсов между нервными клетками. Это связано с тем, что вход Ca в клетку в условиях деполяризации активирует синтез рецепторов и белков секреторного аппарата. После формирования основных синаптических контактов ГАМК приобретает свойства исключительно тормозного нейромедиатора.

4.3.4. Ионные каналы и синаптическая пластичность

Естественным условием функционирования синапсов *in vivo* является проведение высокочастотных пачек импульсов (Lisman J.E., 1997). В процессе подобной активности происходят значительные изменения эффективности синаптической передачи, связанные с увеличением либо уменьшением амплитуды постсинаптического сигнала (Zucker R.S., Regehr W.G., 2002).

Различают кратковременные и долговременные формы синаптической пластичности. Первые делятся секунды и минуты, вторые – часы, дни и месяцы (Malenka R.C., Nicoll R.A., 1999). Рассмотрим участие ионных каналов в возникновении и поддержании процессов кратковременной и долговременной синаптической пластичности.

Кратковременная синаптическая пластичность.

Многочисленные исследования показали, что кратковременная синаптическая пластичность связана, главным образом, с изменением количества квантов медиатора, освобождаемых из пресинаптической терминали (Zucker R.S., Regehr W.G., 2002). Кратковременная синаптическая пластичность выполняет важную физиологическую роль в нервной системе. Помимо участия в простых формах обучения и памяти, кратковременная синаптическая пластичность обеспечивает обработку информации в нейронных сетях, участвует в активации «молчащих» синапсов и индукции долговременных форм синаптической пластичности (Fisher [S.A.](#), Fischer T.M., Carew T.J., 1997; Abbott L.E., Regehr W.G., 2004). В нервно-мышечном синапсе кратковременная синаптическая пластичность участвует в управлении движениями как у позвоночных, так и беспозвоночных животных (Fisher [S.A.](#), Fischer T.M., Carew T.J., 1997). К наиболее коротким формам пластичности относятся **облегчение и депрессия**, сопровождающиеся, соответственно, увеличением или уменьшением секреции медиатора из нервного окончания в ответ на тестирующее раздражение, поданное после кондиционирующего. Эти процессы имеют быструю кинетику и делятся до сотен миллисекунд. При высокочастотной активности облегчение и депрессия суммируются и становятся более заметными. В настоящее время известно, что ключевую роль в развитии облегчения играет повышение концентрации ионов Ca в аксоплазме нервного окончания (Katz B., Miledi R., 1968, Zucker R.S., Regehr W.G., 2002). Согласно гипотезе «остаточного кальция», кальций, поступивший в нервное окончание после предыдущего раздражения, суммируется с Ca, вошедшим в ответ на последующее раздражение, что в итоге приводит к увеличению внутриклеточной концентрации данных ионов и повышению вероятности секреции квантов медиатора (Zucker R.S., Regehr W.G., 2002). Кроме того, определенный вклад в развитие облегчения вносит изменение Ca-входа в

нервное окончание (Borst J.G., Sakmann B., 1998, Miralles F., Solsona C., 1996, Zefirov A.L., Mukhamed'yarov M.A., Gafurov B.Sh., 2002). Важным фактором, определяющим величину Са-тока, является длительность ПД. В естественных условиях регуляция длительности ПД нервного окончания осуществляется за счет изменения кинетики выходящих К-токов, реполяризующих мембрану нервного окончания и, тем самым, укорачивающих ПД. Большое значение в этих процессах имеют потенциал-активируемые К-каналы нервного окончания (Zefirov A.L., Mukhamed'yarov M.A., Gafurov B.Sh., 2002). В исследованиях кратковременной синаптической пластичности в нервно-мышечном синапсе было показано, что в зависимости от частоты ритмической активности преобладают различные механизмы облегчения. При высокочастотном раздражении (50 Гц) преобладают механизмы, связанные с накоплением ионов Са в аксоплазме нервного окончания. Кроме того, происходящее во время ПД кратковременное локальное повышение внутриклеточной концентрации Са приводит к активации Са-активируемых К-каналов и ограничению длительности ПД (Зефилов А.Л., Халилов И.А., 1985, Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Charlton M.P., 1993). При меньшей частоте активации (10 Гц) наблюдается выраженное изменение Са-входа в нервное окончание, вызванное увеличением длительности ПД за счет инактивации потенциал-активируемых К-каналов, сопровождающееся значительным облегчением (Зефилов А.Л., Мухамедьяров М.А., 2004, Мухамедьяров М.А., Минлебаев М.Г., Зефилов А.Л., 2004).

Долговременная синаптическая пластичность

Долговременная потенцияция (ДВП). Во многих областях нервной системы ритмическая активность может вызывать долговременные изменения синаптической передачи, лежащие в основе механизмов обучения и формирования памяти. ДВП была впервые описана в 1973 г. в глутаматергических синапсах гиппокампа (Bliss T.V.P., Lomo T., 1973, Paradiso M.A., Bear M.F., Connors B.W., 2007). Феномен ДВП заключается в том, что относительно кратковременная (десятки мс) высокочастотная (100 Гц) стимуляция возбуждающих моносинаптических путей вызывает длительное усиление синаптической активности в виде возросшего ответа постсинаптического нейрона на одиночное раздражение тех же волокон. В

основе возникновения ДВП лежат различные пре- и постсинаптические механизмы, связанные с увеличением внутриклеточной концентрации ионов Са и активацией Са-зависимых процессов, активацией и встраиванием ионных каналов в мембрану.

Известно, что механизм индукции ДВП в синапсах СА3-СА1 гиппокампа требует постсинаптической активации НМДА-рецепторов. Канал НМДА-рецепторов при МП покоя заблокирован ионами Mg, которые отходят от канала только при деполяризации мембраны. Большая часть глутамат-чувствительных нейронов экспрессируют одновременно НМДА и АМПА-рецепторы. Электрическая стимуляция пресинаптической клетки вызывает освобождение глутамата который связывается с постсинаптическими АМПА и НМДА рецепторами. Активация АМПА рецепторов вызывает деполяризацию и снятие магниевого блока НМДА рецепторов. Вход Са через НМДА-рецепторы в дендритные шипики вызывает активацию протеинкиназ, которые инициируют каскад биохимических процессов, модифицирующих синаптическую силу. В результате происходит увеличение проводимости как уже имеющихся рецепторов, так и встраивание в мембрану новых рецепторов АМПА, что в целом усиливает постсинаптический ответ. Са /кальмодулин зависимая протеинкиназа II (СаМКII) играет ключевую роль в этом процессе (Malenka R.C., Nicoll R.A., 1999). Кальций, входящий через НМДА-рецептор, связывается с кальмодулином, комплекс Са-кальмодулин активирует СаМКII, которая фосфорилируется и превращается в форму, сохраняющую активность спустя долгое время после возвращения Са к начальному уровню. СаМКII оказывает двойной эффект на синаптические процессы. Во-первых, фосфорилирование СаМКII АМПА-рецепторов в мембране увеличивает их проводимость. Во-вторых, активация НМДА-рецепторов и СаМКII приводят к встраиванию субъединиц GluR1 АМПА-рецепторов в постсинаптическую мембрану (Malenka R.C., Nicoll R.A., 1999). В результате увеличивается количество постсинаптических сайтов, доступных для активации глутаматом (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002). Кроме того, показано также увеличение количества мРНК, кодирующей НМДА-рецепторы, в течение 5 часов после индукции ДВП в гиппокампе (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002). Несколько других протеинкиназ, протеинкиназа С или MAP киназы также

вовлечены в экспрессию ДВП. Эти процессы, зависимые от фосфорилирования, могут поддерживать ДВП в течение 1-3 часов. Этот период называется ранней фазой ДВП. Для поддержания ДВП более трех часов, включаются протеинкиназа А и ERK (внеклеточно регулируемые киназы). Это поздняя фаза ДВП требует транскрипции генов и синтеза белков. Основным регулятором генной экспрессии является фосфорилирование ядерного транскрипционного фактора CREB (cAMP Response Element-Binding protein), который считается основным фактором формирования долговременной пластичности и памяти. Хотя молекулярные основы ДВП до сих пор неясны, показано, что структурная пластичность является фундаментальным свойством нейронов, и изменения количества и морфологии шипиков обеспечивает клеточную базу для хранения памяти (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Paradiso M.A., Bear M.F., Connors B.W., 2007).

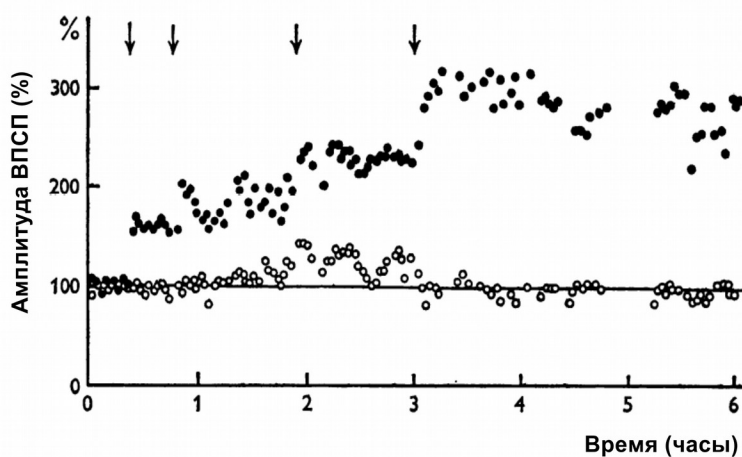


Рис. 62. Долговременная потенция в гиппокампе кролика.

На графике показана амплитуда ВПСП в эксперименте (черные кружочки) и в контроле (прозрачные кружочки) в ответ на одиночную стимуляцию. Каждая точка получена путем усреднения 30 ответов. Короткие тетанусы (15 Гц в течение 10 сек) наносились в моменты времени, указанные стрелками. (Из Bliss T.V.P., Lomo T., 1973 с изменениями.)

Существуют и пресинаптические механизмы развития ДВП, которые предполагают наличие ретроградного посредника в синапсе. Кандидатами в такие посредники являются NO и монооксид углерода, которые могут быть

синтезированы в постсинаптической клетке и быстро диффундировать в пресинаптическую область, модулируя освобождение медиатора. На рисунке 62 показан пример ДВП в глутаматергических синапсах гиппокампа кролика. Синаптические ответы в ответ на стимуляцию перфорированных путей регистрировались в гранулярных клетках зубчатой фасции. Блисс и Ломо показали значительное увеличение амплитуды постсинаптических потенциалов к нейронам зубчатой фасции в результате высокочастотной стимуляции входов к этим клеткам, которое длится часы и даже дни (Bliss T.V.P., Lomo T., 1973).

Долговременная депрессия (ДВД). ДВД была впервые показана в синапсах между коллатеральными Шаффера и пирамидными клетками поля CA1 гиппокампа. Так, низкочастотная стимуляция Шафферовских коллатералей в гиппокампе (~ 1 Гц) вызывает снижение ВПСП в синапсах CA3-CA1. Этот тип синаптической пластичности может продолжаться, по крайней мере, 1 час. ДВД была позже показана и в других областях мозга, таких как поле CA3 гиппокампа, зубчатая фасция, различные области новой коры и в мозжечке (Linden D.J., Conner J.A., 1995). В коллатеральных Шаффера индукция ДВД требует активации НМДА рецепторов, другой механизм включает активацию метаботропных глутаматных рецепторов (Daniel H., Levenes C, Krepel F., 1998). Показано, что в результате активации протеинфосфатаз и дефосфорилирования уменьшается проводимость АМПА-рецепторов, а, кроме того, снижается их количество (Levenes C., Daniel H., Crepel F., 1998, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Таким образом, ионные каналы играют ключевую роль в возникновении различных типов электрических сигналов возбудимых структурах: в формировании МП покоя, генерации ПД, обеспечивают формирование пре- и постсинаптических сигналов, секреции медиатора и синаптической пластичности. Рассмотрим роль ионных каналов в генерации рецепторных потенциалов в сенсорных системах.

4.4. Ионные каналы и рецепторные сигналы

Начальным звеном каждой сенсорной системы является специализированная структура – сенсорный рецептор, в котором происходит процесс **трансдукции** - преобразование энергии стимула в электрический

потенциал, называемый рецепторным. Все рецепторы подразделяются на первично- и вторично-чувствующие. В **первично-чувствующих рецепторах** стимул воспринимается непосредственно сенсорным нейроном, тогда как в случае **вторично-чувствующих рецепторов** стимул воспринимается специализированной клеткой не нервного происхождения (обычно эпителиального), которая затем передает сигнал чувствительному нейрону. Во многих видах рецепторов в восприятии стимула принимают участие ионные каналы. Человек имеет четыре класса рецепторов, чувствительных к одной из форм физической энергии – механической, химической, термической или электромагнитной. Механизмы трансдукции зависят от типа физического стимула. Так, например, в хемо- и фоторецепторах трансдукция происходит с участием внутриклеточных вторичных посредников при активации мембранного рецептора, связанного с G-белком. Преимуществом такого механизма является усиление сигнала, так что один квант света или несколько молекул одоранта могут изменить проводимость множества ионных каналов рецепторной клетки и вызывать рецепторный потенциал. В механорецепторах механические стимулы преобразуются в электрический ответ с участием механочувствительных ионных каналов (Sperelakis N., 1995, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Альтман Я.А., 2009).

Возникновение рецепторного потенциала является начальным этапом сенсорного восприятия. Будучи локальным ответом, рецепторный потенциал затухает вблизи места возникновения, поэтому для успешной передачи сенсорного сигнала в соответствующую область мозга необходимо возникновение ПД. Процесс передачи сенсорного сигнала в первично- и вторично-чувствующих рецепторах различается. В случае первично-чувствующих рецепторов на мембране дендрита сенсорного нейрона возникает рецепторный потенциал, который при достижении порогового уровня генерирует ПД. В случае вторично-чувствующих рецепторов стимул воспринимается мембраной специализированной воспринимающей клетки, которая образует химический синапс с чувствительным нейроном. Рецепторный потенциал воспринимающей клетки вызывает выброс медиатора, что приводит к появлению постсинаптического потенциала или **генераторного потенциала** в отростке чувствительного нейрона. При достижении критического уровня

деполяризации в нейроне возникает ПД, который проводится в центральную нервную систему (Каламкаров Г.Р., Островский М.А., 2002, Альтман Я.А., 2009).

4.4.1. Роль ионных каналов в процессе фототрансдукции

Фоторецепторы расположены в сетчатке глаза и являются вторично-чувствующими рецепторами. Существует два вида фоторецепторов – палочки и колбочки, которые отвечают за ночное и дневное зрение, соответственно (рис. 63 А). В темноте фоторецепторы деполяризованы постоянным входящим, так называемым темновым, током в области наружного сегмента благодаря наличию в мембране цГМФ-активируемых неселективных ионных каналов, проводящих преимущественно Na-ток (Yau K.W., Chen T.Y., 1995). В темноте концентрация цГМФ относительно велика, что поддерживает цГМФ-активируемые каналы в открытом состоянии. Во внутреннем сегменте фоторецептора присутствуют K-каналы утечки, через которые постоянно течет выходящий K-ток, стремящийся гиперполяризовать мембрану до уровня калиевого равновесного потенциала. В результате МП фоторецептора в темноте составляет около -40 мВ (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002, Каламкаров Г.Р., Островский М.А., 2002, Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003) (рис. 63 Б).

Начальный этап фототрансдукции связан с поглощением света зрительными пигментами. В палочках зрительный пигмент родопсин состоит из белковой части – опсина, встроенного в мембрану дисков, и светочувствительной части – ретиналя, производного витамина А. В неактивном состоянии родопсин содержит цис-изомер ретиналя. Поглощение света приводит к переходу ретиналя в транс-конфигурацию. Стереоизомеризация 11-цис-ретиналя вызывает конформационные изменения белковой части молекулы родопсина, который превращается в метародопсин II. Активированная молекула родопсина диффундирует внутри мембраны диска и активирует сотни молекул трансдуцина, являющихся членом семейства G-белков. Трансдуцин активирует фосфодиэстеразу - фермент, понижающий концентрацию цГМФ в цитоплазме, что, в свою очередь, приводит к закрытию цГМФ-активируемых каналов и гиперполяризации мембраны (Stryer L. 1986, Schnapre J.L., Baylor, 1987, Purves D. et al. 2001, Каламкаров Г.Р., Островский М.А., 2002) (рис. 63 В).

Фоторецепторы образуют глутаматергические синапсы с биполярными клетками. Выделяют два типа таких клеток – «ON»(включать) и «OFF»(выключать).

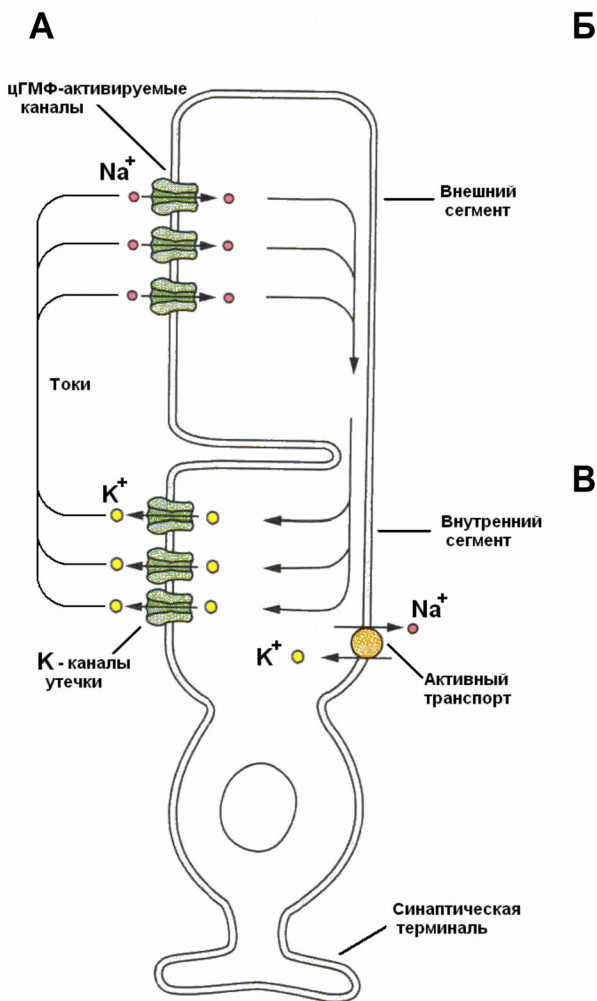


Рис. 63. Механизмы фототрансдукции

А – Фоторецепторы состоят из наружного сегмента, содержащего пигмент, внутреннего сегмента и синаптической терминали. В темноте фоторецептор деполяризован постоянным входящим током в области наружного сегмента благодаря наличию в мембране цГМФ-активируемых каналов, проводящих преимущественно Na^+ -ток. Во внутреннем сегменте присутствуют K^+ -каналы утечки, проводящие выходящий K^+ -ток. В результате МП фоторецептора в темноте составляет около -40 мВ. Na^+/K^+ -насос поддерживает внутриклеточные концентрации ионов Na^+ и K^+ , перемещая ионы против градиента концентрации. **Б** – В ответ на воздействие светового стимула мембрана фоторецептора гиперполяризуется, амплитуда рецепторного потенциала зависит от интенсивности света. **В** – В отсутствие света цГМФ-активируемые каналы под действием высокой концентрации цГМФ находятся в открытом состоянии. При попадании света на фоторецептор происходит активация зрительного пигмента (родопсина в палочках), встроенного в мембраны дисков наружного сегмента, стимуляция G-белка (трансдуцина), который активирует цГМФ-фосфодиэстеразу. Этот фермент расщепляет цГМФ до 5'-ГМФ, что приводит к закрытию цГМФ-активируемых каналов и

гиперполяризации мембраны фоторецептора. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

ON-клетки ингибируются (гиперполяризуются), а OFF-клетки, наоборот, активируются (деполяризуются) под действием глутамата, выделяемого фоторецепторами. Каждая колбочка имеет синапсы с как с ON-, так и OFF-клетками. В покое за счет деполяризации мембраны темновым током Ca-каналы фоторецепторов открыты, и происходит постоянный выброс глутамата. Соответственно, в покое ON-клетки гиперполяризованы, а OFF-клетки – деполяризованы. При действии света происходит гиперполяризация фоторецепторов, что приводит к уменьшению выброса глутамата, и, следовательно – деполяризации ON-клеток и гиперполяризации OFF-клеток. Различные ответы на глутамат связаны с его действием на разные каналы в ON- и OFF-клетках. В OFF-клетках глутамат активирует Na-каналы, а в ON-клетках механизмы действия глутамата не совсем ясны и, по-видимому, различаются в палочках и колбочках. В некоторых синапсах медиатор действует через открытие K-каналов, а в других – путем активации метаботропного рецептора и закрытия цГМФ-активируемых каналов, обеспечивающих входящий Na-ток. Биполярные клетки образуют глутаматные синапсы с ганглиозными клетками. Деполяризация ON-клетки под действием света будет приводить к возбуждению ганглиозной клетки, возникновению генераторного потенциала и генерации ПД, тогда как гиперполяризация OFF-клетки при действии света будет вызывать ингибирование ганглиозной клетки. Помимо фоторецепторов, биполярных и ганглиозных клеток, в сетчатке имеются горизонтальные и амакриновые клетки, образующие многочисленные синаптические связи и участвующие в обработке и передаче сенсорной информации.

Изменение уровня МП фоторецепторов лежит в основе световой адаптации. Очень яркое освещение приводит к гиперполяризации мембраны до -70 мВ, в этом состоянии колбочки не могут отвечать на дальнейшее усиление световой интенсивности. Однако, постепенно мембрана колбочек деполяризуются до промежуточного значения между -70 и -40 мВ, в результате фоторецепторы вновь могут отвечать гиперполяризацией на усиление яркости света. В основе этого процесса лежит изменение концентрации ионов Ca во внешнем сегменте. В темноте 1/7 тока через цГМФ-активируемые ионные каналы переносится ионами Ca, которые оказывают ингибирующее влияние на гуанилатциклазу. При освещении происходит медленное снижение

внутриклеточной концентрации Ca, что приводит к активации гуанилатциклазы, повышению уровня цГМФ, открытию каналов и медленной деполяризации колбочек (Purves D. et al., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

4.4.2. Ионные каналы и механорецепция

Механорецепторы, одни из наиболее эволюционно древних рецепторов, детектирующих растяжение, прикосновение, звуковые волны.

Механорецепторы кожи воспринимают тактильные стимулы, в результате их активации возникают ощущения давления, прикосновения, вибрации. Большинство их них являются инкапсулированными нервными окончаниями, то есть имеют специализированную капсулу, опосредующую влияние механической деформации на мембрану нервной терминали. Механорецепторы иннервируются толстыми миелинизированными волокнами, проводящими ПД с большой скоростью. Трансдукция в механорецепторах происходит благодаря наличию механочувствительных ионных каналов в мембране рецептора, при активации которых возникает входящий ток, обеспечивающий возникновение деполяризующего рецепторного потенциала с последующей генерацией ПД (рис. 64 А). В отсутствие тактильных стимулов механорецепторы «молчат» (Purves D. et al., 2001, Альтман Я.А., 2009).

Выделяют быстро адаптирующиеся – волосные рецепторы, тельца Мейснера, тельца Пачини, а также медленно адаптирующиеся – диски Меркеля и тельца Руффини. Тельца Мейснера относятся первично-чувствующим рецепторам и состоят из накладывающихся друг на друга плоских пластинчатых клеток, между которыми ветвятся нервные окончания. Деформация ткани приводит к возникновению рецепторного потенциала в нервных окончаниях и генерации ПД. Рецептор реагирует на момент прикосновения. Рецептор Меркеля является вторично чувствующим: рецепторный потенциал формируется в эпителиальных клетках и вызывает освобождение медиатора, генераторный потенциал возникает в окончаниях афферентного волокна. Спайковая активность в волокне продолжается на всем протяжении действия стимула. Тельца Пачини относятся к первично-чувствующим рецепторам и располагаются в глубоких слоях кожи, в соединительной ткани мышц, надкостнице и брыжейке.

А

Б

В

Рис. 64. Механорецепция

А - схема механочувствительной мембраны сенсорных окончаний, Б - строение мышечного веретена, В – ответы изолированного мышечного веретена на растяжение. Верхняя запись показывает рецепторные потенциалы, возникающие в сенсорных окончаниях при растяжении на разную длину. Нижняя запись отражает силу растяжений. Начальная деполяризация чувствительных окончаний пропорциональна амплитуде и скорости растяжения (динамический ответ), однако, когда растяжение фиксируется на определенной длине, рецепторный потенциал спадает до более низких значений, пропорциональных только амплитуде растяжения (статический ответ). (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

Тельце Пачини представляют собой крупное концевое образование первичного афферентного волокна, состоящее из немиелинизированного окончания, окруженного несколькими концентрическими слоями шванновских клеток, образующих капсулу. При деформации капсулы происходит локальное увеличение проницаемости мембраны к ионам K, Na, Ca, Cl и деполяризация. Рецепторный потенциал, достигая порогового уровня, вызывает генерацию ПД

в первом перехвате Ранвье афферентного волокна. Так как тельца Пачини являются быстро адаптирующимися, ответ рецептора возникает только в момент нанесения механического стимула (Purves D. et al., 2001, Альтман Я.А., 2009).

Проприоцепторы мышц, суставов и сухожилий сигнализируют нам о степени растяжения мышц, о положении конечностей, скорости и направлении их движения. Мышечные веретена представляют собой первично-чувствующие рецепторы растяжения в скелетных мышцах млекопитающих. Каждое мышечное веретено, состоящее из 8-10 интрафузальных волокон, иннервируется двумя типами сенсорных волокон – более крупными и быстрыми типа Ia и более тонкими и медленными типа II (рис. 64 Б). Окончания волокон Ia чувствительны в основном к быстрым изменениям степени растяжения, тогда как группа II – к уровню статического напряжения. Стретч-чувствительные ионные каналы мембраны сенсорных нервных окончаний с помощью белка спектрина связаны с цитоскелетом. Механическая деформация мембраны приводит к открытию этих неселективных ионных каналов, входу ионов Na и Ca в нервное окончание и деполяризации мембраны при этом амплитуда рецепторного потенциала пропорциональна силе растяжения (рис. 64 В) (Purves D. et al., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Ионные каналы и механизмы трансдукции в слуховых и вестибулярных рецепторах.

Восприятие звуков и изменения скорости движения и положения головы обеспечивается рецепторными клетками, расположенными в улитке и полукружных каналах внутреннего уха. Общие принципы механоэлектрической трансдукции сходны в слуховых и вестибулярных рецепторах. Более подробно рассмотрим трансдукцию в слуховых рецепторных клетках. Канал улитки разделен на три отдела: вестибулярная, средняя и барабанная лестницы. Процессы трансдукции происходят в органе Корти, расположенном на базальной мембране средней лестницы и содержащем слуховые клетки. Слуховая рецепторная клетка представляет собой волосковую клетку, несущую на своем апикальном конце пучок ресничек, который служит рецепторным аппаратом для механических стимулов. В состав пучка входят один более

длинный отросток - киноцилия и от 20 до 100 стереоцилий разной длины (рис. 65 А).

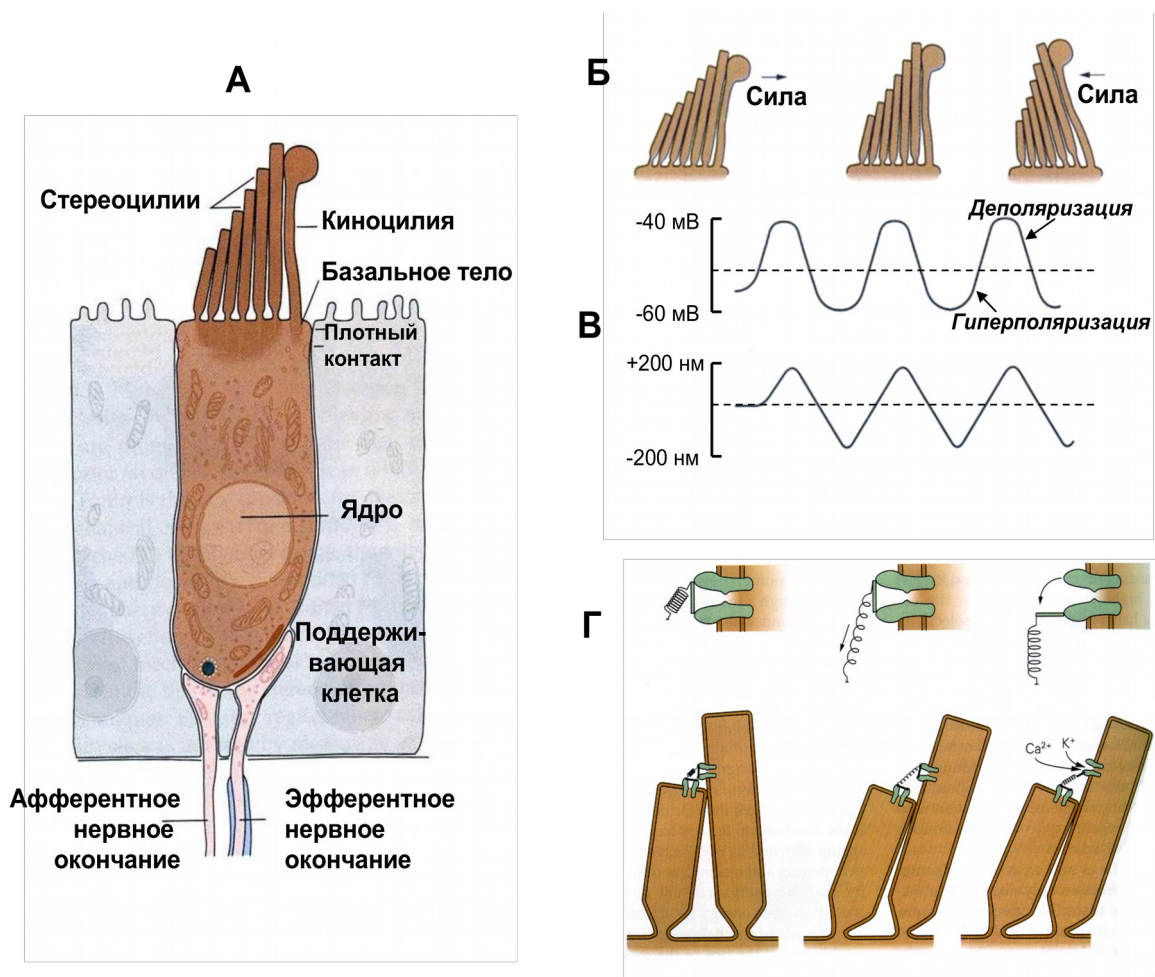


Рис. 65. Механорецепция в волосковых клетках

А – Волосковая клетка связана с соседними, поддерживающими клетками кольцевым плотным контактом в области апикального периметра. От апикальной поверхности базального тела отходит волосковый пучок – механочувствительная часть клетки. На базолатеральной поверхности волосковой клетки расположены синапсы с афферентными и эфферентными нервными окончаниями. Б - Звуковые колебания или механические стимулы вызывают смещение пучка волосков в сторону киноцилии (положительный стимул) или противоположную сторону (отрицательный стимул). В – Положительный стимул (нижний график) вызывает открытие ионных каналов и деполаризацию мембраны (верхний график), тогда как отрицательный стимул приводит к закрытию каналов, открытых в покое и гиперполяризации мембраны. Г – Механизм открытия механочувствительных катионных каналов под воздействием растяжения (из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

Над слуховыми клетками нависает текториальная мембрана, в которую погружены пучки ресничек. Имеется два типа слуховых клеток: формирующие один ряд внутренние слуховые клетки и построенные в три ряда внешние слуховые клетки, расположенные более дистально по отношению к центральной оси улитки. Внешние клетки в отличие от внутренних получают значительную эфферентную иннервацию. Кроме этого, наружные слуховые клетки обладают подвижностью – укорачиваются при деполяризации и удлиняются при гиперполяризации. По-видимому, наружные клетки являются элементами, усиливающими чувствительность и частотную избирательность улитки. (Purves D. et al., 2001 Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Волосковые клетки, как и сама основная мембрана, на которой они располагаются, организованы тонотопически: каждый участок с волосковыми клетками вдоль основной мембраны оптимально чувствителен к определенной частоте звука (Hudspeth A.J., 1989). Звуковые колебания вызывают смещение жидкости в полостях внутреннего уха, сопровождающееся движением базальной и текториальной мембран относительно друг друга и механической деформацией пучка ресничек, что в свою очередь запускает процессы механотрансдукции. Ионные каналы трансдукции относятся к неселективным катионным каналам с проводимостью около 100 пСм, проводящим в основном ионы К. Каждая волосковая клетка содержит около 100 каналов трансдукции, при этом на каждой стереоцилии может находиться один или несколько каналов. Каждая стереоцилия связана вблизи конца молекулярной нитью с соседней - более длинной. Проницаемость каналов регулируется эластическими элементами, «воротными пружинками», которые чувствительны к смещению пучка ресничек (рис. 65 Г). В покое около 15% каналов открыты, в результате МП клетки составляет около -60 мВ. Ответ слухового рецептора зависит от направления изгиба волосков. Положительным стимулом является наклон в сторону киноцилии. Это приводит к увеличению натяжения молекулярной нити, присоединенной к молекулярным воротам каждого канала и связывающей две стереоцилии, открытию дополнительных каналов и деполяризации мембраны. Отрицательный стимул, изгибающий пучок ресничек в противоположную сторону, закрывает каналы и гиперполяризует клетку (рис. 65 Б-Г). (Hudspeth

A.J., 1989, Purves D. et al., 2001). Преимуществом трансдукции звукового стимула с помощью механочувствительных каналов является высокая скорость ответа - латентный период ответа слуховых клеток составляет несколько миллисекунд (Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., 2003).

Слуховые клетки настроены на определенную частоту звуковых колебаний с помощью, по крайней мере, двух механизмов. Один из них - это механические свойства пучка ресничек, которые определяют резонансную частоту его колебаний. Показано, что слуховые клетки, отвечающие на низкочастотные вибрации, имеют более длинные реснички, тогда как отвечающие на высокочастотную стимуляцию – более короткие. Во внутреннем ухе человека длина пучка ресничек клетки, воспринимающей частоту 20 кГц, составляет 4 мкм, а чувствительных к 20 Гц – 7 мкм. Другой механизм связан со спонтанной электрической активностью мембраны слуховой клетки, в результате чего колебания МП резонируют с определенной частотой звука. Было показано, что деполяризующая фаза осцилляции переносится током через потенциал-активируемые Са-каналы, тогда как реполяризация возникает в результате активации Са-активируемых К-каналов. Ряд факторов устанавливают определенную частоту колебаний МП волосковых клеток в определенном месте мембраны: емкость мембраны, количество и кинетические свойства Са и Са-активируемых К-каналов, время выведения Са из клетки. Показано, что путем альтернативного сплайсинга в слуховых клетках экспрессируются различные изоформы К-каналов, отличающиеся по чувствительности к ионам Са и потенциалу (Hudspeth A.J., 1997, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Волосковые клетки образуют синапсы с афферентными нервными окончаниями кохлеарного нерва (рис. 65 А). Секреция нейромедиатора (вероятно, глутамата) запускается входом ионов Са при деполяризации, однако наблюдается и в отсутствие стимуляции благодаря наличию Са-каналов, открытых в условиях покоя. Количество выделяемого медиатора усиливается при деполяризации клетки и уменьшается при ее гиперполяризации. Генераторный потенциал возникает в нервных окончаниях кохлеарного нерва и приводит к генерации ПД (Trussel L.O., 2002).

4.4.3. Роль ионных каналов в процессах трансдукции в обонятельных и вкусовых рецепторах

Обонятельные рецепторы расположены в обонятельном эпителии носовой полости и представляют собой биполярные нейроны, дендриты которых образуют сенсорную поверхность, а аксоны, формируя пучки обонятельного нерва, поступают в обонятельную луковицу, где образуют синаптические контакты с митральными нейронами. Дендрит обонятельного нейрона заканчивается небольшим вздутием – булавой, образующей в среднем 20 длинных ресничек (цилий), где и происходят процессы трансдукции обонятельных стимулов или одорантов. Обонятельные нейроны короткоживущие, срок жизни составляет 30-60 дней. Обонятельная клетка способна детектировать и различать огромное количество запахов и является очень чувствительной. При этом человека способен различать запахи при концентрации пахучего вещества в диапазоне от 10^{-4} до 10^{-13} М. В последние годы идентифицировано не менее тысячи генов, кодирующих обонятельные рецепторные белки, что составляет 1-2% генома человека. Связывание одоранта с обонятельными рецепторами приводит к активации системы вторичных посредников, активации ионных каналов мембраны и деполяризации мембраны. В большинстве случаев одоранты увеличивают активность аденилатциклазы (рис. 66). Повышение уровня цАМФ приводит к открытию цАМФ-активируемых катионных ионных каналов в мембране реснички и деполяризации мембраны. Дополнительные каскады сигнальной трансдукции включают ИФ₃, цГМФ и монооксид углерода, роль которых не до конца выяснена (Spehr M. et al., 2002),

Обонятельная система характеризуется высокой способностью к адаптации, которая связана с двумя механизмами. Один из механизмов включает инактивацию или десенситизацию рецептора за счет фосфорилирования, второй – изменение чувствительности цАМФ-активируемых ионных каналов к цАМФ. Эти процессы опосредованы влиянием ионов Ca, которые также проходят через цАМФ-активируемые ионные каналы при активации (Schild D., Restrepo D., 1998, Zufall F., Leideners-Zufall T., 2000, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

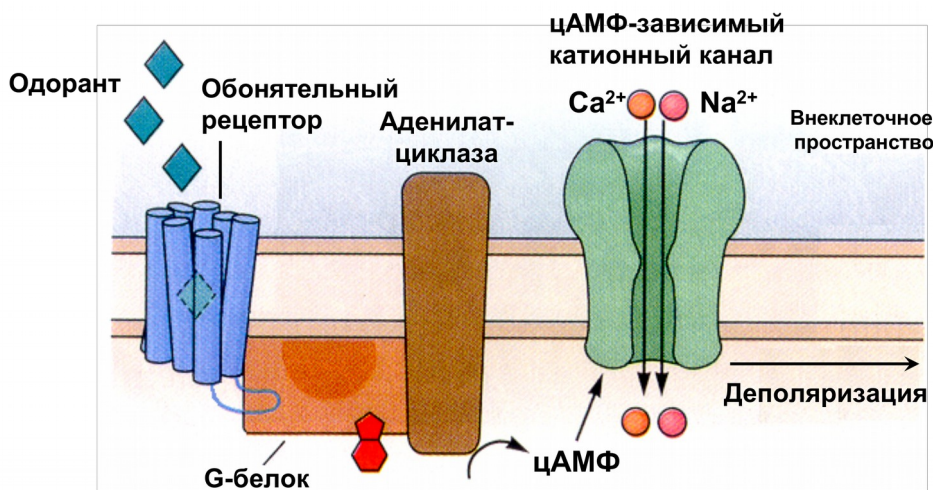


Рис. 66. Сенсорная трансдукция в обонятельных нейронах

Обонятельный рецептор представляет собой рецептор, связанный с G-белком. Связывание рецептора с одорантом приводит к активации аденилатциклазы и синтезу цАМФ. Повышение уровня цАМФ ведет к открытию цАМФ-зависимых катионных ионных каналов и депольяризации мембраны рецептора. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

Вкусовые рецепторные клетки располагаются во вкусовых почках языка и слизистой оболочки ротовой полости. Вкусовые клетки образуют микроворсинки, где непосредственно происходят процессы трансдукции. Хотя вкусовые клетки имеют эпителиальное происхождение, их иногда относят к возбудимым клеткам, мембрана которых обладает потенциал-активируемыми Na-, Ca- и K-каналами, способным генерировать ПД. Различают четыре базовых вкусовых стимула горький, соленый, сладкий и кислый. Глутамат натрия относится к пятой категории стимулов, называемых умами. Каждый из типов вкусовых стимулов имеет свой механизм трансдукции. Различные вкусовые клетки обеспечивают восприятие разных вкусовых стимулов. В самом общем виде, вкусовая молекула взаимодействует с ионным каналом или рецептором апикальной мембраны, что приводит к депольяризации мембраны клетки напрямую или через систему вторичных посредников. Результирующий рецепторный потенциал генерирует ПД, который в свою очередь ведет к входу Ca и освобождению медиатора в синапсах, формируемых вкусовой клеткой с афферентными нервными волокнами. Альтернативный механизм увеличения

уровня Ca , приводящий к секреции медиатора, может быть связан с освобождением ионов Ca

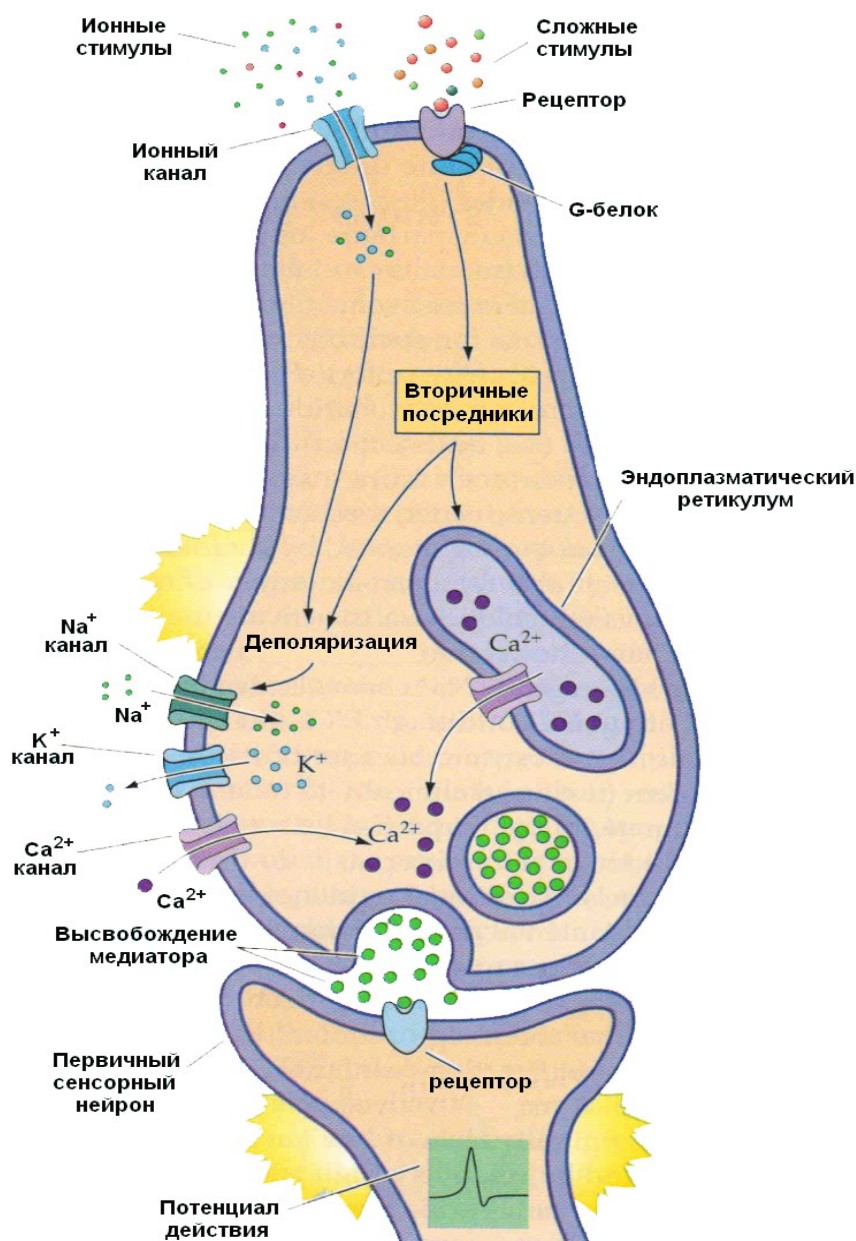


Рис. 67. Общие механизмы трансдукции во вкусовой клетке.

Апикальная мембрана содержит как ионные каналы, так и G-белок связанные рецепторы, активируемые вкусовыми стимулами. Базолатеральная мембрана содержит потенциал-активируемые Na , K , Ca -каналы и структуры, необходимые для освобождения медиатора. Увеличение внутриклеточного уровня Ca как через активацию потенциал-активируемых Ca -каналов, так и путем освобождения из внутриклеточных депо вызывает слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной и освобождение медиатора в синаптическую щель. Медиатор активирует рецепторы постсинаптической мембраны чувствительного волокна, что в свою очередь

приводит к формированию генераторного потенциала и ПД (Из Purves D.et al, 2001 с изменениями).

из внутриклеточных депо, независимо от изменения МП (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002) (рис. 67). **Сладкие** вкусовые стимулы воспринимаются специфическими рецепторами на апикальной мембране. При этом происходит повышение уровня цАМФ во внутриклеточном пространстве, активация протеинкиназы А и фосфорилирование К-каналов, открытых в покое и участвующих в создании МП покоя рецепторной клетки. Фосфорилирование К-каналов приводит к их инактивации и деполяризации мембраны (рис. 68 А). Другой механизм трансдукции связан с активацией фосфолипазы С, образованием ИФ₃ и высвобождением Са из внутриклеточных депо (Margolskee R.F., 2002). **Соленые** стимулы, такие как NaCl, воспринимаются посредством диффузии ионов натрия по электрохимическому градиенту через апикальные амилорид-чувствительные Na каналы. Вход ионов Na непосредственно изменяет МП клетки, вызывая деполяризацию (Heck G.L., Mierson S., DeSimone J.A., 1984) (рис. 68 Б). **Кислые** стимулы также опосредуются проницаемостью протонов через амилорид-чувствительные Na-каналы, а, кроме того, протоны блокируют апикальные К-каналы, открытые при потенциале покоя, что ведет к деполяризации мембраны (Gilbertson T.A. et al., 1992) (рис. 68 В). **Горьким** вкусом обладают различные соединения, включая двухвалентные катионы, некоторые аминокислоты, алкалоиды. Трансдукция большого количества горьких стимулов включает связывание с G-белок сопряженным мембранным рецептором, последующую активацию фосфолипазы С и образование ИФ₃, который в свою очередь освобождает кальций из внутриклеточного депо через ИФ₃-рецепторы (рис. 68 Г). Увеличение уровня Са вызывает освобождение медиатора из вкусовой клетки. Другие горькие соединения могут активировать рецепторы, связанные со специфическим вкусовым G-белком – гастдуцином, который также как и трансдуцин в фоторецепторах активирует фосфодиэстеразы, расщепляющие циклические нуклеотиды. Трансдукция мембрано-проникающих горьких соединений связана с их способностью блокировать апикальные К-каналы (Margolskee R.F., 2002) (рис. 68 Г). **Вкус умами** (глутамата натрия) опосредуется активацией метаботропного рецептора глутамата mGluR4 и закрытием ионных каналов через цАМФ-зависимый механизм (Purves D. et al., 2001, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

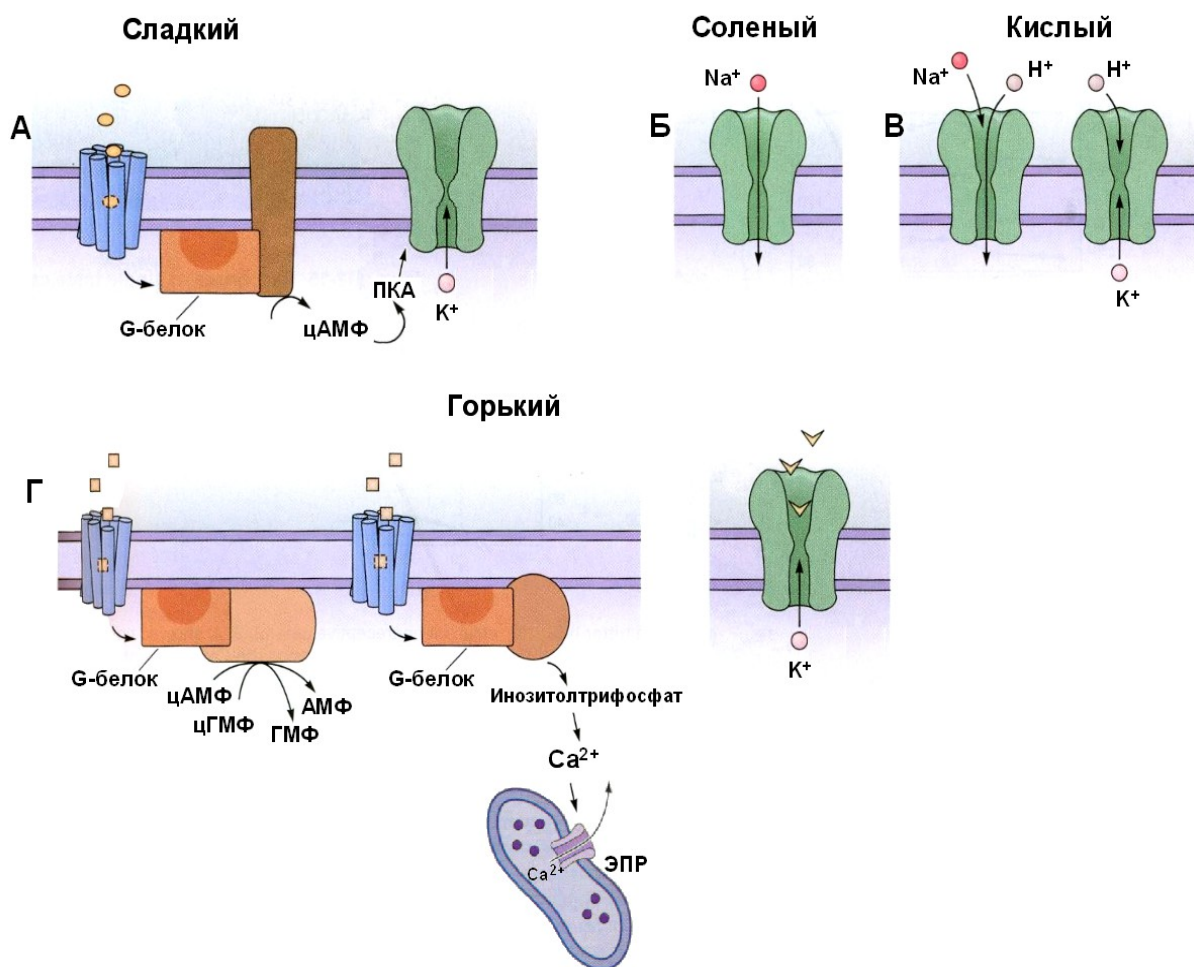


Рис. 68. Механизмы трансдукции основных вкусовых стимулов.

А - сладкие стимулы воспринимаются специфическими G-белок связанными рецепторами на апикальной мембране. В результате происходит активация аденилатциклазы, повышение уровня цАМФ, активация протеинкиназы А (PKA) и фосфорилирование K-каналов утечки, участвующих в создании МП покоя рецепторной клетки. Фосфорилирование K-каналов приводит к их инактивации и деполяризации мембраны. **Б** – соленые стимулы, такие как NaCl, воспринимаются посредством диффузии ионов Na по электрохимическому градиенту через апикальные амилорид-чувствительные Na-каналы. Вход ионов Na вызывает деполяризацию клетки. **В** – трансдукция кислых стимулов опосредуются двумя механизмами: либо протоны проникают через амилорид-чувствительные Na-каналы, либо блокируют апикальные K-каналы утечки, что приводит к деполяризации мембраны. **Г** – представлены три возможных механизма трансдукции горьких стимулов. Два механизма включают активацию рецепторов, связанных с G-белком. В результате либо стимулируется фосфодиэстераза, расщепляющая циклические нуклеотиды, либо активируется фосфолипаза С и образуется ИФ₃, который освобождает Ca из внутриклеточного депо. Третий механизм связан с блокированием

апикальных К-каналов. (Из Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002 с изменениями).

4.4.4. Ионные каналы и терморцепция

Терморцепторы, обеспечивающие температурную чувствительность кожи, представляют собой свободные нервные окончания. В отличие от механорецепторов кожи, тепловые и холодовые рецепторы даже при нормальной температуре кожи (34 °С) генерируют ПД с небольшой частотой (2-5 Гц). Максимальная активность холодových рецепторов наблюдается при 25 °С, а тепловых – при 45 °С. Быстрые изменения температуры кожи вызывают динамические ответы рецепторов. Охлаждению кожи приводит к исчезновению импульсации тепловых рецепторов и к резкому усилению частоты разрядов холодových рецепторов, которая впоследствии снижается до нового устойчивого уровня вследствие адаптации. Напротив, при нагревании наблюдается кратковременное прекращение импульсации холодových рецепторов и повышение активности тепловых.

Исследования последних лет показали, что термотрансдукция связана с наличием специальных, температуро-чувствительных ионных каналов из семейства TRP (transient receptor potential – «быстрый рецепторный потенциал») на мембранах терморцепторов. Эти каналы проницаемы для катионов, особенно для кальция. На данный момент существует несколько разновидностей температурно-чувствительных TRP-каналов (TRPV1, TRPV3, TRPM8, TRPA1), активирующихся при различных значениях температуры; этот ряд продолжает расти. Изменение температуры приводит к активации TRP-каналов мембраны рецептора, появлению (или возрастанию) входящего катионного тока и увеличению частоты генерации ПД. Возбуждение от терморцепторов проводится по А δ и С-типам чувствительных нервных волокон в ЦНС (Bevan S., Yeats J. 1991, Cesare P., McNaughton P.A., 1996, Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006).

4.4.5. Ионные каналы и ноцицепция

Рецепторы, отвечающие на стимулы, вызывающие повреждение ткани, называются ноцицепторами. Ноцицепторы либо непосредственно активируются болевыми стимулами, либо опосредованно отвечают на химические агенты, выделяющиеся из тканей при повреждениях, - гистамин, ионы К, брадикинин, субстанция Р, АТФ, серотонин, АХ и др. (Burgess G.M. et al., 1989, Cook S.P. et

al., 1997, Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006). Ноцицепторы представляют собой нервные окончания афферентных нервных волокон А δ (тонкие миелиновые)- или С (немиелинизированные)- типа. Некоторые ноцицепторы являются унимодальными, то есть активируются по отдельности механическими, термическими или химическими стимулами, а большая часть – полимодальными, то есть активируются целым рядом стимулов.

Важную роль в трансдукции боли играют катионные каналы семейства TRP, активация которых приводит к входу ионов Ca и Na в нервное окончание и деполяризации (Bevan S., Yeats J. 1991, Cesare P., McNaughton P.A., 1996, Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006). TRPV1-канал, или «ванилоидный рецептор», активируется при температуре 43⁰С, которая является порогом болевого ощущения при нагревании у человека. Кроме того, TRPV1-каналы активируются капсаицином – компонентом чилийского жгучего перца. TRPV2-каналы чувствительны к более высокой температуре (52-55⁰С). TRPV1-каналы присутствуют как в А δ , так и в С-типах волокон, тогда как TRPV2-каналы - только в волокнах А δ -типа. TRPM8-каналы активируются при температурах между 28⁰С и 8⁰С, а также ментолом. TRPA1 активируется холодowymi стимулами (<18⁰С), вызывающими ощущение боли (Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006).

Ощущение боли, связанное с уменьшением рН, например, при ишемии в сердце, связано с активацией протон-активируемых ионных каналов (ACIS) в ноцицептивных нервных окончаниях (Waldmann R. et al., 1997). Ноцицепторы могут активироваться механическими стимулами в результате давления, деформации ткани, изменения осмолярности, набухания клеток и т.д. (Burgess P.R., Perl E.R., 1989, Julius D., Basbaum A., 2001) в результате активации механочувствительных катионных каналов. Другой возможный механизм связан с увеличением концентрации внеклеточной АТФ в тканях при их деформации. АТФ, в свою очередь, активирует метаботропные (P2Y) или ионотропные (P2X) рецепторы на мембране ноцицепторов, что приводит к деполяризации и генерации ПД в чувствительных болевых нервных волокнах (Julius D., Basbaum A., 2001).

5. Нарушения работы ионных каналов. Каналопатии

5.1. Дисфункции ионных каналов

Как и в любой биологической системе в работе ионного канала могут возникнуть **дисфункции**, которые приводят к нарушению функционирования клетки и дисрегуляционной патологии (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. 1999, Зефилов А.Л. и др., 2000, Крыжановский Г.Н., 2002, Зефилов А.Л., Ситдикова Г.Ф., 2009). Эти дисфункции, прежде всего, могут быть связаны либо с **мутациями генов**, кодирующих субъединицы канала и его регуляторы, либо с влиянием эндогенных агентов (**аутоантител**), изменяющих работу канала. В своей совокупности все формы врожденных заболеваний, обусловленные нарушением деятельности каналов, объединены в класс под общим названием «**каналопатии**» (channelopathy) (Зефилов А.Л. и др., 2000, Grippo J., Grippo T., 2001, Kleopa K.A., Barchi R.L., 2002, Lehman-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999). Каждая каналопатия, обусловленная патологией соответствующих каналов, имеет свою специфику и свои клинические особенности. Патофизиологические механизмы каналопатий включают нарушения структуры канала, изменяющие его свойства и функции. Кроме того, измененные субъединицы каналов могут влиять на функцию и воротные свойства нормальных субъединиц, с которыми они олигомеризуются. Группа дефектных каналов может опосредованно нарушать функцию нормальных каналов, изменяя МП, возбудимость, концентрационный градиент на мембране, внутриклеточную концентрацию ионов Са. К другим патофизиологическим механизмам можно отнести снижение экспрессии канальных белков, их быструю деградацию, неправильную колокализацию, нарушение распределения и плотности каналов в мембране, синтез новых не характерных для данной клетки каналов.

Достижения в молекулярной биологии и физиологии ионных каналов приобретают в последнее время все большее патофизиологическое и прикладное значение. С каждым годом возрастает количество обнаруженных каналопатий человека и животных, которые сопровождаются дисфункциями каналов (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999, Зефилов А.Л. и др., 2000, Celesia G.G., 2001, Kullmann D.M., Hanna M.G., 2002, Graves T.D., Hanna M.G., 2007). Исследования в этих направлениях позволяют сделать заключение о строении и

функционировании дефектного канала, объяснить патогенез, симптоматику и патофизиологические основы формирования заболеваний, связанных с этим дефектом, разработать тактику лечения. Кроме этого, результаты таких исследований важны для нормальной физиологии, поскольку позволяют оценить роль структурных элементов интактного ионного канала в формировании определенных свойств и характеристик его работы, значение различных типов каналов в функционировании клетки. Необходимо отметить, что большинство спонтанных генетических мутаций, приводящих к дефектами структуры ионных каналов или их регуляторов, являются летальными, и лишь некоторые мутации, приводящие к дисфункции только небольшой части каналов определенного типа, позволяют организму выживать (Felix R., 2000).

Нарушения структуры канала. Прямое воздействие на структуру канальных белков могут оказать генные мутации. В результате missense-мутаций происходит изменение одного нуклеотида в последовательности ДНК, что сопровождается заменой одной аминокислоты в полипептиде на другую. В случае nonsense-мутаций изменение одного нуклеотида в последовательности ДНК приводит к появлению nonsense-кодона, прерывающего процесс трансляции, что в свою очередь, ведет к экспрессии дефектного белка или, в ряде случаев, к полному блокированию экспрессии.

Изменениям могут быть подвержены любые структурно-функциональные части канала. Мутации, затрагивающие сенсор потенциала, могут изменить чувствительность канала к потенциалу, изменения в порообразующих сегментах влияют на ионную селективность и проводимость. Нарушения структуры других участков белковой молекулы затрагивают активационные и инактивационные механизмы и изменяют время открытия канала, искажая ионные токи, текущие через мембрану. Мутационные изменения могут касаться как основной (каналообразующей) субъединицы канала, так и вспомогательных субъединиц. Дефект одного гена может вести к изменению функций нескольких типов каналов. Кроме этого, мутации одного определенного гена могут влиять на функционирование каналов, кодируемых другими генами - это плейотропный эффект, механизм которого не до конца ясен (Felix R., 2000, Gargus J.J., 2003, 2006).

Различают два класса мутаций (Felix R., 2000) по эффекту на функцию белкового продукта: мутации **loss-of-function** и мутации **gain-of-function**. Мутации **loss-of-function** – наиболее распространенный тип мутаций, сопровождающийся потерей белкового продукта, исчезновением или снижением функционирования гена. Обычно это рецессивные мутации. Если гетерозигота содержит аллель «дикого» (нормального) типа и аллель с мутацией **loss-of-function**, то уровень экспрессии аллеля дикого типа обычно является достаточным для формирования «нормального» фенотипа. Если же аллель «дикого» типа не может компенсировать действие аллеля «**loss-of-function**», то фенотип гетерозиготы будет «мутантным». При этом степень потери функции может варьировать в широких пределах. В случае полной потери функции мутацию называют нулевой.

Мутации **gain-of-function** – являются обычно доминантными и проявляются в эффекте сверхэкспрессии гена или эктопической экспрессии (экспрессии в неправильном месте). Другой тип мутаций **gain-of-function** связан с приобретением продуктом мутантного гена новых свойств, приводящих к ингибированию функционирования белка «дикого» типа. Так, например, мутантная субъединица мультимерного белка при олигомеризации может привести к образованию дефектного комплекса, несмотря на присутствие субъединиц дикого типа. В случае ионных каналов мутации **gain-of-function** приводят к изменению селективности, воротных характеристик, включая активацию и инактивацию, исчезновению субъединицы, регулирующей инактивацию, уменьшению чувствительности к различным химическим соединениям, изменению регуляции транспортировки канала.

Мутации, происходящие в транскрибируемом, но не транслируемом регионе ДНК, могут влиять на систему трансляции, изменяя сигнал для связывания мРНК с рибосомами, на стабильность мРНК, что приведет к снижению уровня экспрессии продукта мутантного гена. Мутации в участках, которые не транскрибируются и не транслируются изменяют экспрессию генов опосредованно.

Хромосомные мутации (делеции, инверсии, дупликации) затрагивающие транскрибируемые и транслируемые области ДНК могут приводить к различным эффектам. Например, инверсии вызывают значительное снижение

уровня экспрессии гена вследствие «эффекта положения». Делеции приводят к полному исчезновению нуклеотидной последовательности гена. Дупликации, наоборот, увеличивают число копий данного гена в клетке (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2002).

Экспрессия новых генов (экспрессия генов *de novo*). Серьезные нарушения могут возникнуть при появлении в клетке аномальных каналов во время развития патологических процессов. Это можно проиллюстрировать на примере участия Na-каналов в формировании болевого синдрома. Известно, что активация Na-каналов в ноцицептивных нейронах (Black J.A. et al., 2001) имеет большое значение в механизмах формирования патологической боли. Насчитывается, по крайней мере, девять типов потенциал-активируемых Na-каналов, экспрессирующихся в нейронах спинальных ганглиев при их повреждении, что приводит к гипервозбудимости мембраны, возникновению эктопических разрядов и приступов боли. Экспрессия генов этих каналов может вызвать либо угнетение (**down regulation**), либо активацию (**up regulation**) каналов. Изучение этих нейронов с помощью метода пэтч-кламп показало, что они продуцируют множественные Na-токи, что говорит в пользу предположения об активации нескольких типов Na-каналов (Cummins T.R., & Waxman 1997; Cummins T.R. et al., 1999). Блокада этих каналов приводит к исчезновению разрядов и ослаблению или исчезновению нейропатической боли у животных и у человека (Abram S.E., Yaksh T.L., 1994, Chabal C. et al., 1992; Chung J. et al., 2003, Devor et al., 1992). Возникновение болевого синдрома может быть связано и с изменением функций Ca-каналов в результате нарушения взаимоотношений их субъединиц. Показано, что L-, P/Q- и N-типы Ca-каналов принимают участие в ноцицепции, а их специфические антагонисты оказывают антиноцицептивный эффект (Vanegas H., Schaibl H., 2000).

Нарушения регуляции. Опосредованные влияния на канал могут быть многообразными. Во-первых, это нарушения естественных регуляторных механизмов функционирования канала, таких как фосфорилирование и дефосфорилирование за счет нарушения работы определенных протеинкиназ и протеинфосфатаз. Эти нарушения могут быть связаны как с дефектами синтеза ферментов, так и с изменениями в системах их активации и инактивации. Во-вторых, поскольку различные типы ионных каналов сосуществуют на

мембранах одной клетки, их функционирование связано между собой. Отсюда, дефекты работы одного типа канала сразу скажутся на функциях других. Так, например деполяризация мембраны возбудимой клетки, возникающая при дефекте Cl -каналов, приведет к нарушению работы всех потенциал-активируемых ионных каналов, изменению возбудимости и концентрационных градиентов на мембране. Подтверждением этому является такой факт, что даже в нормальных условиях снижение на 20% хлорной проводимости мышечных волокон приводит к миотонии (Furman, Varehi, 1981, Kwieciszki H., Lehmann-Horn F., Rudel R., 1988). Снижение проводимости Ca -каналов поверхностной мембраны, сопровождающееся уменьшением внутриклеточной концентрации ионов Ca , изменит работу Ca -активируемых K -каналов и каналов Р-рецепторов, изменит синтез и встраивание в мембрану белков других типов каналов. В-третьих, серьезное влияние на каналы оказывают некоторых виды токсических соединений, которые блокируют каналы или нарушают их формирование и синтез. Известно возникновение миотоний, связанных с нарушением работы ионных каналов под влиянием лекарственных средств (Kwieciszki H., Lehmann-Horn F., Rudel R., 1988).

5.2. Каналопатии

Исследования по изучению генетических дефектов ионных каналов при каналопатиях идут в нескольких направлениях (Dworakowska B., Dolowy K., 2000). Во-первых, выявляются участки хромосом, где располагаются дефектные гены, определяются мутации генов и изменения аминокислотных последовательностей и места этих нарушений в канальном белке. Затем дефектные каналы клонируют и экспрессируют в специальные клетки – эмбриональные почечные клетки человека (НЕК) или ооциты *Xenopus* с последующим изучением параметров функционирования каналов с использованием метода пэтч-кламп. Ряд заболеваний человека было выявлено на генетическом уровне после молекулярного исследования болезней животных сходных с заболеваниями человека по клиническим симптомам.

Существуют несколько **классификаций** каналопатий: 1) исходя из **локализации** пораженного канала – скелетно-мышечные каналопатии, каналопатии ЦНС, сердца, почек, дыхательной системы и др.; 2) в зависимости

от **типа ионной проводимости** (селективности) пораженного ионного канала – натриевые, калиевые, кальциевые, хлорные каналопатии; 3) с учетом **вида активации** пораженного канала – каналопатии потенциал-активируемых каналов и каналопатии лиганд-активируемых каналов.

Хочется отметить, что прослеживается явная диспропорция в исследованиях нарушений функций ионных каналов в различных тканях. Так, мы намного больше знаем о дисфункции потенциал-активируемых Na, K, Ca и Cl каналов, особенно, в нервно-мышечной системе, тогда как данные о нарушениях работы лиганд-активируемых ионных каналов в ЦНС достаточно скудные (Kullmann D.M., Hanna M.G., 2002). Это, по всей видимости, связано с тем, что генетические дефекты лиганд-активируемых ионных каналов ЦНС, вызывают серьезные нарушения функций мозга несовместимые с жизнью.

Основная особенность дисфункций каналов возбудимых тканей - это **периодические нарушения** их функции. В скелетных мышцах – это нарушения сократимости от **миотонии** (неспособности к расслаблению), до **паралича** (неспособности к сокращению). Известно, что для нормального мышечного сокращения необходимо, чтобы ПД распространялись по поверхности каждого мышечного волокна и по системе Т-трубочек проникали вглубь мышечных волокон, что в свою очередь вызывает освобождение ионов Ca из СПР и активацию сократительных элементов. Исходя из этой схемы ненормальная активность ионных каналов может привести либо к понижению, либо к повышению возбудимости мышечной мембраны. Гипервозбудимость мышечной мембраны может вызвать появление ритмических ПД и стойкое мышечное сокращение в ответ на одиночные стимулы. В клинике это явление называется миотонией и проявляется в постоянном мышечном сокращении скелетной мышцы в ответ на короткую произвольную активацию.

При электрофизиологическом исследовании это расстройство будет характеризоваться возникновением стойкой серии ритмических ПД – так называемый миотонический разряд. Напротив, субнормальный уровень возбудимости мышечной мембраны будет выражаться в отсутствии мышечных сокращений, несмотря на нормальную активность двигательного нерва и синапса, и приводить к слабости и параличу. В сердце изменения работы ионных каналов вызывают потенциально фатальную **аритмию** за счет

изменения длительности ПД и нарушения нормальной циркуляции возбуждения. Каналопатии в ЦНС – вызывают **припадки, атаксии, мигрени** и другие симптомы, связанные с нарушениями межклеточных коммуникаций и нормальных соотношений процессов возбуждения и торможения. В таблицах 1 и 2 представлены генетические дефекты различных типов ионных каналов, приводящие к наследственным мышечным и неврологическим заболеваниям.

Таблица 1

Генетические дефекты ионных каналов и наследственные скелетно-мышечные и кардиальные заболевания человека

Тип канала	Ген	Дефектная субъединица	Заболевание
Потенциал-активируемые каналы	SCN4A	α -субъединица Nav1.4	Гиперкалиемический периодический паралич Гипокалиемический периодический паралич Врожденная парамиотония
Na-каналы			
	SCN5A	α -субъединица	Другие миотонии LQT3-синдром Синдром Бругада
K-каналы	KCNJ2	α -субъединица Kir2.1	Синдром Андерсена
	KCNE3	Дополнительная субъединица MiRP2	Гипокалиемический периодический паралич
	KCNQ1	α -субъединица Kv	LQT1-синдром
	KCNE1	β -субъединица MinK	LQT5-синдром
	KCNH2	α -субъединица HERG	LQT2-синдром
Ca-каналы	CACNA1S	α -субъединица Cav1.1	Гипокалиемический периодический паралич
	RyR1	Рианодиновый рецептор	Злокачественная гипертермия Миопатия центрального стержня
Cl-каналы	CLCN1	ClC1	Врожденная миотония (доминантная и рецессивная)

Лиганд-активируемые каналы			
Никотиновый АХ-рецептор	CHRNA1	α 1-субъединица	Врожденный миастенический синдром
	CHRNB1	β 1-субъединица	Врожденный миастенический синдром
	CHRND	δ -субъединица	Врожденный миастенический синдром
	CHRNE	ϵ -субъединица	Врожденный миастенический синдром

Фенотип заболеваний при дефектах ионных каналов в невозбудимых клетках еще более многообразен – это нарушения секреции гормонов, функционирования цитозольных компартментов, сложных эпителиально-секреторных и резорптивных функций. В почках дисфункция ионных каналов вызывает вторичные изменения в системном электролитном балансе и кровяном давлении. Кистозный фиброз (муковисцидоз) - является исторически первым выявленным генетическим заболеванием ионных каналов и характеризуется полиорганным поражением вследствие нарушения функции экзокринных желез (Jentsch T.J., Steinmeyer K., Pusch M., Schwappach., 1995).

Разнообразие наблюдаемых фенотипов при определенных каналопатиях (дисфункция одного типа канала) свидетельствует о том, что в их проявлении задействован широкий спектр ионных каналов, и, что локализация мутаций в пределах одного канала значительно влияет на функцию клетки. Однако, вариабельность типов и тяжести клинических проявлений среди отдельных носителей одной и той же мутации пока ставит ученых в тупик. Остается нерешенным вопрос, почему идентичные мутации могут проявляться либо в рецессивной, либо в доминантной формах или проявляются не у всех носителей? Возможно, что такая фенотипическая вариабельность объясняется другими независимыми факторами, которые модифицируют активность канала *in vivo*, например, сочетание различных субъединиц, фосфорилирование и дефосфорилирование, взаимодействие со вторичными посредниками. В

настоящее время диагностика некоторых каналопатий осложняется тем, что некоторые клинические фенотипы вызываются мутациями различных канальных генов, а мутации одного гена приводят к разным фенотипам.

Таблица 2

Генетические дефекты нейрональных и глиальных ионных каналов и наследственные неврологические заболевания человека

Тип канала	Ген	Дефектная субъединица	Заболевание
Потенциал-активируемые каналы			
Na-каналы	SCN1A	α -субъединица Nav1.1	Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями Тяжелая миоклоническая эпилепсия новорожденных
	SCN2A	α -субъединица Nav1.2	Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями
	SCN1B	β 1-субъединица	Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями
K-каналы	KCNA1	α -субъединица Kv1.1.	Эпизодическая атаксия 1 типа
	KCNQ2	α -субъединица M-типа калиевых каналов	Доброкачественные наследственные неонатальные конвульсии
	KCNQ3	α -субъединица M-типа калиевых каналов	Доброкачественные наследственные неонатальные конвульсии
Ca-каналы	CACNA1A	α -субъединица Cav2.1.	Семейная гемиплегическая мигрень Спиноцеребеллярная атаксия 6 типа Эпизодическая атаксия 2 типа
Лиганд-активируемые каналы			
	CHRNA4	β 2-субъединица	Аутосомальная доминантная ночная эпилепсия фронтальной доли

Никотиновый АХ-рецептор	CHRNA2	$\alpha 4$ -субъединица	Аутосомальная доминантная ночная эпилепсия фронтальной доли
Глициновый рецептор	GLRA1	$\alpha 1$ -субъединица	Наследственная гиперэкplexия
ГАМК _A -рецептор	GABRG2	$\gamma 2$ субъединица	Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями
Глиальные каналы	GJB1	Коннексин 32	Болезнь Chacot-Marie-Tooth, связанная с X-хромосомой
Коннексон			

Современные методы исследования, комбинация электрофизиологических и методов молекулярной биологии позволит получить новую информацию о нормальных и дефектных каналах и определить их значение в норме и патологии. Полное понимание молекулярных механизмов функционирования измененных ионных каналов приведет к появлению четких диагностических критериев, ясным клиническим оценкам и более рациональной терапии каналопатий.

В настоящей главе рассмотрены молекулярные механизмы дисфункций основных ионных каналов клетки, приводящих к возникновению каналопатий, представлены клеточные и системные функциональные нарушения, лежащие в основе патогенеза и клинических проявлений этих расстройств. Наибольшее внимание будет уделено ионным каналам возбудимых клеток.

5.1.1. Натриевые каналы

Потенциал-активируемые Na-каналы

Дисфункции потенциал-активируемых Na-каналов вызывают целый ряд неврологических и неврологических заболеваний у человека и могут быть связаны с мутациями генов, кодирующих как α -, так и β -субъединицы. С дефектами Na-каналов связаны периодические параличи скелетных мышц и недистрофичные миотонии. В соответствии с фенотипом и типом дефекта канала нарушения структуры локализованы, главным образом, в потенциал-

чувствительном S4 сегменте домена IV и в участке, связывающем III и IV домены, содержащем инактивационные ворота (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999) (рис. 69). Дисфункции потенциал-активируемых Na-каналов были обнаружены и исследованы у животных. Так, мутации нейронального гена SCN8A в виде делеций были идентифицированы у мышей с заболеваниями двигательного аппарата, характеризующимися прогрессирующим параличом задних конечностей и тяжелой мышечной атрофией в результате нарушения нервно-мышечной передачи. Заболевание начиналось через ~10 дней после рождения и вело к смерти в течение 3-4 недель (Burgess D.L., Korman D.C., Galt J. et al., 1995). У мышей, гомозиготных по этой мутации, происходит дегенерация клеток Пуркинье мозжечка. У дрозофилы мутации локуса *para*, кодирующего нейрональный Na-канал, сходный с Na-каналами позвоночных, вызывают обонятельные дефекты и температуро-зависимый паралич (Lilly M.R., Kreber R., Ganetzky B., Carlson J.R., 1994). Молекулярные повреждения *para* препятствуют транскрипции и процессингу РНК, что ведет к уменьшению скорости экспрессии канала. Возбудимость нейронов с дефектными Na-каналами снижается при неблагоприятных условиях таких, как повышение температуры, вероятно, из-за ускорения канальной кинетики, что ведет к блоку проведения возбуждения (Loughney K., Kreber R., Ganetzky B., 1989).

Скелетно-мышечные натриевые каналопатии

Мутации Na-каналов вызывают недистрофические миотонии. **Миотонии** – это клиническое название заболеваний, сопровождающихся нарушением функций двигательной системы и, в частности, скелетных мышц. Это относительно редкие заболевания, обычно не угрожающие жизни. Симптомы миотонии были впервые описаны в 1875 г. (Rudel R., 1990). Клинически миотония характеризуется либо гипервозбудимостью и генерацией повторных ПД в мышечных волокнах, сопровождающихся произвольными сокращениями, либо невозбудимостью, ведущей к мышечной слабости. Повторные ПД обычно возникают вследствие деполяризации мембраны поперечных трубочек из-за накопления ионов K в их просвете. Миотонические мышечные волокна генерируют повторные разряды в течение секунд после возбуждения, тогда как нормальные – в течение 0,1 сек. Эта характеристика является важным диагностическим критерием при электромиографической

регистрации. Наиболее часто встречающаяся миотония – дистрофическая миотония человека. Это аутосомальное доминантное заболевание вызывается экспрессией поврежденной киназы – миотонина. Мутантный ген содержит большое количество повторов нуклеотидных триплетов, количество которых увеличивается при каждой генерации, что ведет к дистрофии мышц. Хотя при этом заболевании и наблюдается дисфункция ионных каналов, мутации их генов не происходит (Jurkat-Rott K., Lehmann-Horn F., 2001).

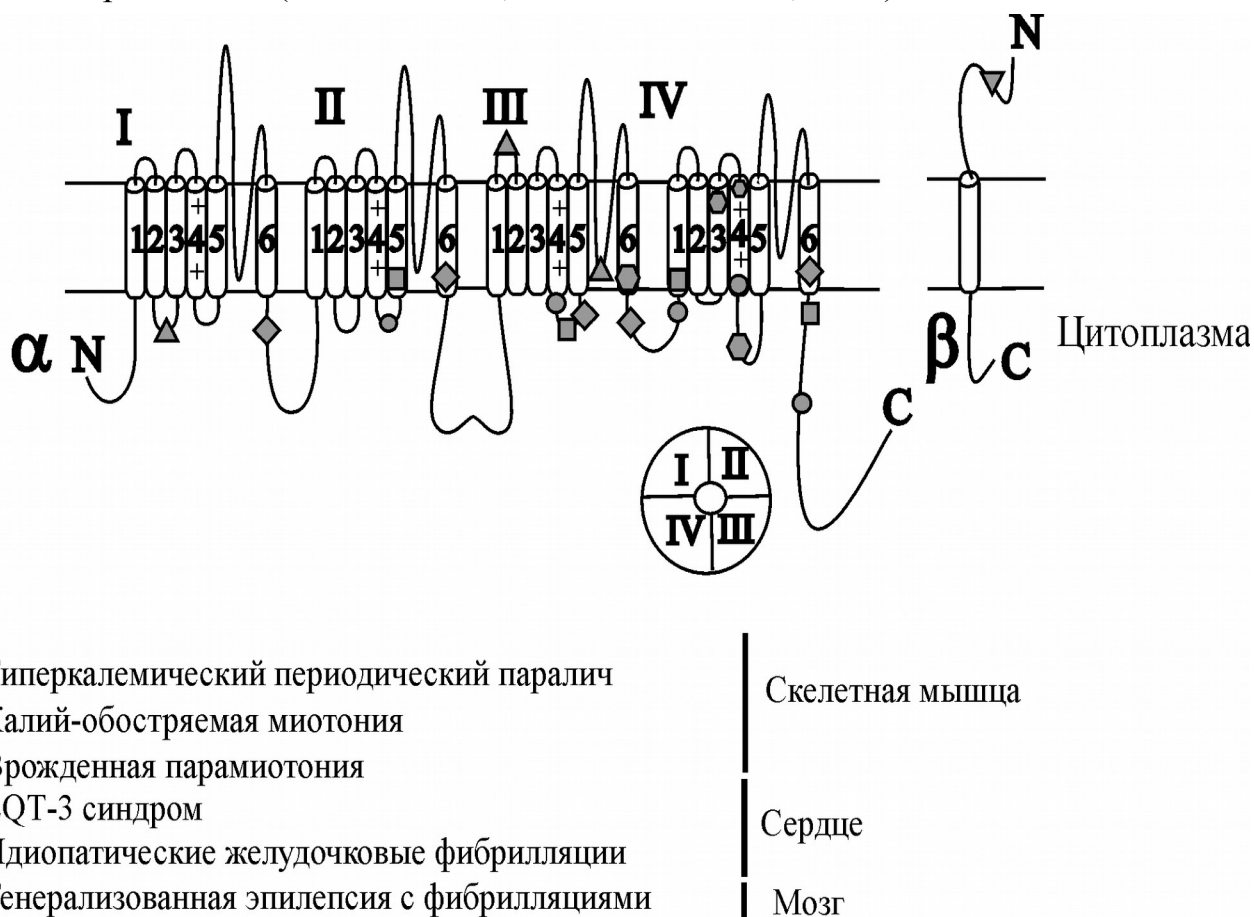


Рис. 69. Генетические дефекты α - и β - субъединиц потенциал-активируемого Na-канала и связанные с ними каналопатии.

Символы указывают на точечные мутации α - и β - субъединиц Na-канала, приводящие к соответствующим каналопатиям в скелетной мышце, сердце и мозге. I-VI – домены, 1-6 – сегменты канала. Внизу кружком показано пространственное расположение доменов Na-канала. (Из Lehmann-Horn F., Jurkat-Rot K., 1999 с изменениями).

Целая группа **недистрофичных миотоний** связана с генетическими нарушениями Na-каналов (рис. 69). Эти миотонии все доминантные и характеризуются наличием небольшой фракции Na-каналов, которые более медленно инактивируются и быстрее активируются по сравнению с нормальными каналами. Регистрация активности одиночного канала показала более длительный период открытого состояния и повторные открытия мутантного канала во время инактивации. В нормальной мышце деполяризация мембраны вызывает только кратковременное открытие Na-каналов, генерирующих ПД, и МП быстро возвращается к исходному уровню. Относительно небольшая популяция мутантных Na-каналов с ненормальной инактивацией может изменить поведение оставшихся мутантных и нормальных каналов, присутствующих в мембране. Постоянный входящий ток, обусловленный этой популяцией каналов, приводит к незначительной, но долго длящейся деполяризации. Поскольку нормальные каналы высоко чувствительны к изменениям потенциала, то даже незначительная деполяризация будет сказываться на их функционировании. Существует, очевидно, тонкая линия раздела между гипервозбудимостью, вызывающей миотонию, и гиповозбудимостью, вызывающей паралич. Использование электрофизиологических моделей позволило предположить, что умеренная деполяризация (5-20 мВ), вызываемая мутантными каналами, приведет к гипервозбудимости мембраны. В этом случае нормальные каналы способны восстановиться из инактивированного состояния, реактивироваться и вызвать появление повторных ПД, которые являются основой для непроизвольной мышечной активности и ригидности мышц. При более значительной деполяризации (20-30 мВ) и нормальные, и мутантные Na-каналы находятся длительное время в состоянии инактивации, что приводит к невозбудимости мышечных волокон и мышечной слабости. Сердечная мышца в отличие от скелетной, содержит другую изоформу Na-канала, а диафрагма, по-видимому, обладает устойчивостью к подобным нарушениям возбудимости, поэтому миотонические приступы не угрожают жизни людей. Больные с рецессивно наследуемыми натриевыми каналопатиями пока описаны не были. Вполне вероятно, что полная потеря функции мышечного Na-канала несовместима с жизнью (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999, Graves T.D., Hanna M.G., 2007).

Гиперкалиемический периодический паралич (ГиперПП) – заболевание при котором наблюдаются эпизодические приступы мышечной слабости с увеличением уровня ионов К в межклеточной жидкости и плазме крови при избыточном потреблении калия с пищей и физической нагрузке. В ранних молекулярных исследованиях было обнаружено, что при ГиперПП происходит мутация гена SCN4A α -субъединицы мышечного Na-канала в мембранопроницающем сегменте белка канала (табл. 1). Дальнейший генетический анализ выявил целый ряд мутаций, которые изменяли как трансмембранный, так и цитоплазматический домены α -субъединицы канала (рис. 69). Электрофизиологические исследования показали нарушения активации и инактивации канала. При этой форме заболевания во время приступов наблюдается заметная деполяризация мембраны мышечных волокон, что делает их невозбудимыми и ведет к параличу мышцы (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999). Предполагаемая схема последовательность процессов, ведущих к параличу, представлена на рис.70.

Врожденная парамитония - заболевание, связанное с несколькими мутациями гена SCN4A (табл. 1). Заболевание также называется парадоксальной миотонией, поскольку сопровождается миотонией и мышечной слабостью в ответ на физические упражнения и холод (Felix R., 2000). Недавние исследования обнаружили, что мутация вызывает уменьшение положительного заряда в сегменте S4 домена IV α -субъединицы, связанное иногда с одиночным аминокислотным замещением (рис. 69). Экспрессия дефектных белков в клетки НЕК 293 обнаружила различные нарушения в канальной функции, включающие изменения кинетики и потенциал-зависимости инактивации, замедление деактивации, ускорение выхода из состояния инактивации.

Атипичная миотония или калий-обостряемая миотония связана с мутациями участка гена SCN4A α -субъединицы Na-канала (рис. 69), который кодирует цитоплазматическую петлю между доменами III и IV. Симптомы миотонии проявляются с задержкой после начала физических упражнений (феномен разогревания) и при нагрузке калием. Основные симптомы ригидности или слабости у больных атипичными или калий-обостряемыми миотониями связаны с длительной деполяризацией мембраны мышечных волокон, как и при ГиперПП.

Сердечные натриевые каналопатии

LQT–синдром. Обнаруженные до настоящего времени наследственные аритмогенные заболевания являются каналопатиями. Синдром длительного интервала QT (LQT) был первым генетически определенным заболеванием, вызываемым дефектом миокардиальных ионных каналов. Синдром выражается в удлинении интервала QT на электрокардиограмме (ЭКГ), вследствие увеличения длительности ПД сердца. Большинство пациентов, страдающих LQT-синдромом, не обнаруживают симптомов заболевания, и только в 1/3 случаев болезнь выявляется при снятии ЭКГ во время клинического обследования.

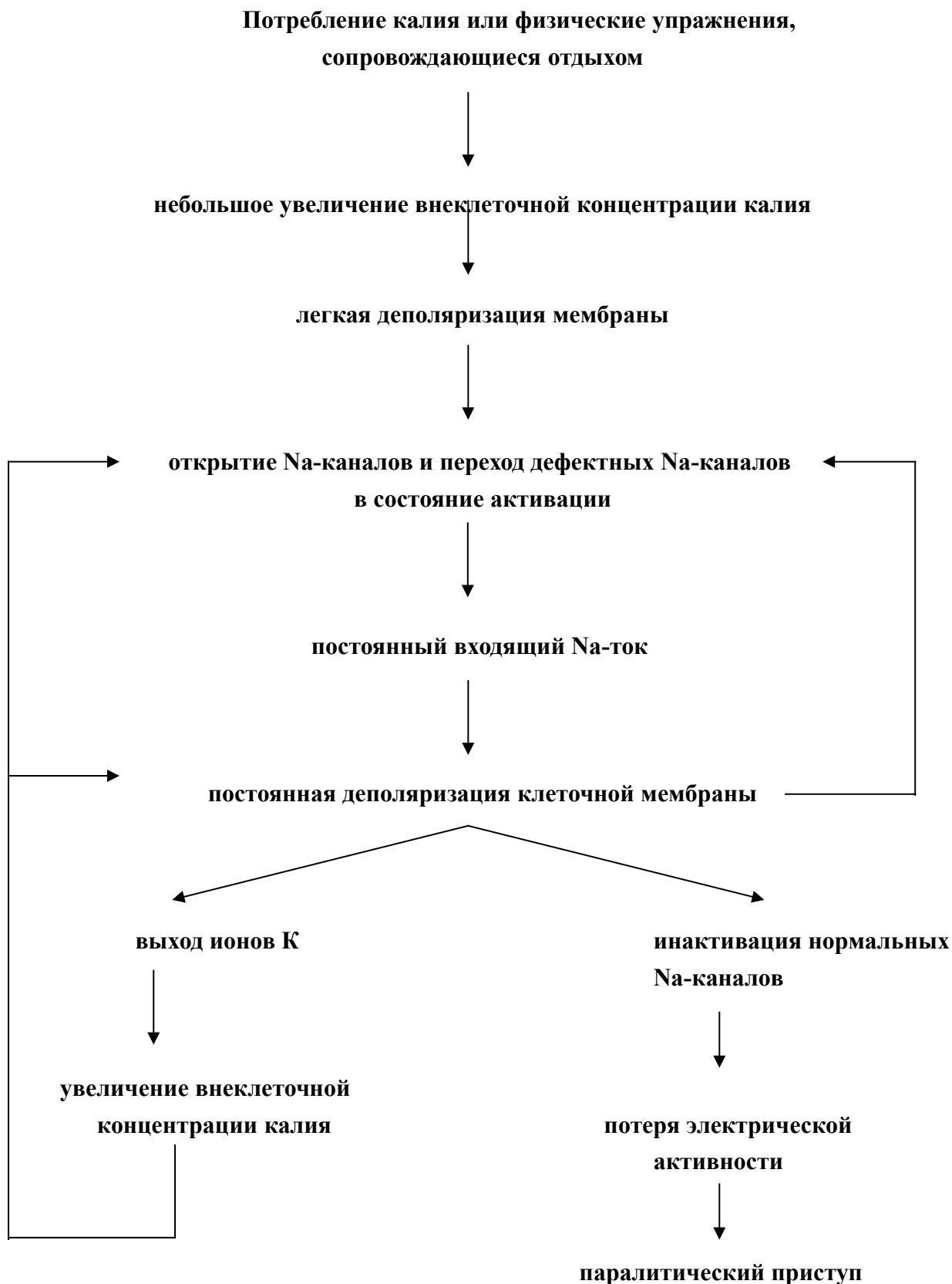


Рис. 70. Последовательность клеточных событий у пациентов с гиперкалиемическим периодическим параличом, которые могут вести к паралитическим приступам.

Часто аритмия является полиморфной желудочковой тахикардией, известной как трепетание-мерцание, вызываемой активацией симпатической нервной системы или применением некоторых лекарственных средств (Steger K.E., Remy J., Krueger S., 1986). LQT-синдром вызывается мутациями шести кардиальных генов: один – кодирующий Na-канал (LQT-3) и пять – кодирующих основную и дополнительную субъединицы трех различных K-каналов. Мутации, увеличивающие Na-токи или уменьшающие K-токи, продлевают ПД и ведут к асинхронности сокращения и аритмиям (Gargus J.J., 2003). В настоящем разделе остановимся на LQT-3 синдроме.

Наследственный LQT3-синдром – заболевание, при котором длительная желудочковая деполяризация ведет к аритмиям, и которое иногда является причиной внезапной смерти. Известно, что в результате тонкого баланса между несколькими типами ионных токов ПД желудочков имеет фазу плато, в течение которой в кардиомиоциты входят ионы Ca, инициирующие сокращение. В течение фазы плато происходит противодействие между деполяризующим Na- и Ca-токами и реполяризующими K-токами, что в дальнейшем приводит к преобладанию K-токов и возвращению к исходным значениям МП. Фаза плато служит и для поддержания Na-каналов в инактивированном состоянии до тех пор, пока волна деполяризации не распространится по всему миокарду. Только в этом случае все желудочковые кардиомиоциты будут реполяризованы и способны к возбуждению. При нарушениях этого механизма даже ничтожные обратные волны деполяризации будут распространяться по любым способным к возбуждению участкам сердца и приводить к фибрилляциям. Такая асинхронность является летальной, так как миокард не сможет обеспечить полноценную насосную функцию сердца. LQT3-синдром связан с мутациями SCN5A гена (рис. 69, табл. 1), кодирующего кардиальный потенциал-активируемый Na-канал (Wang Q., Shen J., Splawski I. et al., 1995). Каналы, кодирующиеся мутантными аллелями, имеют задержанную или уменьшенную инактивацию, что приводит к излишней деполяризации во время фазы плато ПД и задержке реполяризации мембраны K-токами. Это так называемая доминантная gain-of-function мутация. Экспрессия мутантных каналов в ооцитах *Xenopus* показала, что каналы проводят постоянный входящий ток во время деполяризации мембраны и характеризуются замедленной инактивацией.

При этом возникают нарушения стабильности инактивированного состояния с частыми повторными открытиями канала (Bennett P. B., Yazawa K., Makita N, George A.L., Jr., 1995).

Синдром Бругада. Другой набор аллелей вызывает противоположный эффект на инактивацию Na-каналов - быстрое возвращение из состояния инактивации, что приводит к развитию доминантного синдрома аритмии – синдрома Бругада (Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D. et al., 1998) (табл. 1) или идиопатической желудочковой фибрилляции, характеризующейся блоком правой ножки пучка Гиса с удлинением сегмента ST. Миокард таких больных содержит смешанную популяцию Na-каналов, которые не имеют общего периода инактивации и представляет собой идеальный субстрат для развития аритмий. В основе заболевания лежат мутации loss-of-function и двойная missense-мутация. Экспрессия мутантного канала в ооциты *Xenopus* показала смещение потенциал-зависимости инактивации и ускоренное возвращение из состояния инактивации.

Нейрональные натриевые каналопатии

Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями. Этот недавно описанный синдром наблюдается у детей и может выражаться в виде эпилептических приступов или в виде генерализованных приступов, прекращающихся обычно при наступлении пубертатного возраста. Это заболевание связано с мутациями генов, кодирующих α -субъединицы Na-каналов (Nav1.1. и Nav1.2.), дополнительную β -субъединицу Na-канала и γ -субъединицу ГАМК_A-рецептора (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999, Kullmann D.M., Hanna M.G., 2002) (табл. 2). Эти мутации являются наследственными, доминантными и проявляются разнообразными фенотипами даже внутри одной семьи, что контрастирует с относительным однообразием фенотипов многих других каналопатий.

Нейрональные Nav1.1. и Nav1.2. каналы играют ключевую роль в инициации и распространения ПД. Хотя Na-каналы широко распространены в ЦНС, они по разному локализованы в дендритах и аксонах различных нейронов. $\beta 1$ – одна из дополнительных субъединиц канала, образующая комплекс с α -субъединицей и ускоряющая инактивацию Na-каналов. Заболевание связано с точечной мутацией гена SCN1B, кодирующего $\beta 1$ -

субъединицу Na-канала. Мутация прерывает дисульфидный мостик, в норме поддерживающий внеклеточную иммуноглобулин-подобную петлю (рис. 69). Коэкспрессия мутантной $\beta 1$ -субъединицы с $\alpha 1$ -субъединицей Na-канала мозга крысы в ооциты *Xenopus* показала, что мутация замедляет инактивацию канала. Этот эффект сходен с мутациями α -субъединицы канала скелетных мышц при миотониях и объясняет нейрональную гипервозбудимость, лежащую в основе генерализованной эпилепсии с фибрилляциями. Отсутствие симптомов в сердце и скелетных мышцах, также экспрессирующих SCN1B, предполагает тканеспецифическое влияние $\beta 1$ -субъединицы на α -субъединицу Na-канала мозга.

Потенциал-независимые Na-каналы

Суперсемейство генов (SCNN), кодирующее потенциал-независимые ионные каналы, участвующие в контроле клеточного и внеклеточного объема, а также механотрансдукции, включает амилорид-чувствительные эпителиальные Na-каналы. Амилорид-чувствительный эпителиальный Na-канал представляет собой гетеромультимерный белок, состоящий из трех гомологичных субъединиц α , β , γ , каждая из которых содержит 2 трансмембранных сегмента. Функцией данного канала является ограничение скорости электрогенной натриевой реабсорбции в дистальной части почечного канальца, ободочной кишки и воздухопроводящих путях (Burch L.H., Talbot C.R., Knowles M.R. et al., 1995). Экспрессия α -субъединицы является обязательной для канальной функции. Изменение функции амилорид-чувствительного эпителиального Na-канала описано при **синдроме Лидлла** – аутосомальной доминантной формы солечувствительной гипертензии, являющейся результатом точечной мутации β или γ -субъединиц. Мутации гена, ведущие к потере функции (loss-of-function), вызывают потерю соли с гиперкалемическим ацидозом (псевдогипоальдостеронизм 1 типа) (Chang S.S., Grunder S, Hanukoglu A. et al., 1996).

5.2.2. Калиевые каналы

Генетические дефекты K-каналов приводят к целому ряду каналопатий. Наиболее изученным является заболевание, связанное с мутацией K-канала у

мышей - это мутация **weaver** (wv) гена KCNQJ6, кодирующего G-белок-связанный K-канал входящего выпрямления (GIRK). Его фенотип включает нарушение координации движений и дефекты внутреннего уха. Такие мыши характеризуются отсутствием дифференцировки мозжечковых гранулярных клеток (Patil N., Cox DR., Bhat D et al., 1995) и прогрессивной потерей нейронов черной субстанции. Нейрональная смерть при данной мутации связана с исчезновением GIRK-токов у животных с мутантными аллелями. Ввиду постнатальной дегенерации дофаминергических нейронов у мутантных wv/wv мышей они могут быть использованы в качестве модели болезни Паркинсона. (Thomas P., Ye Y., Lightner E., 1996).

Сердечные и скелетно-мышечные каналопатии

Недавние исследования обнаружили участие в развитие большинства типов LQT-синдрома (см. выше) генетических дефектов в α -субъединице K-канала.

LQT1. Это наиболее распространенный тип LQT-синдрома (50-60% случаев), связанный с мутациями короткого плеча 11 хромосомы. Клонирование обнаружило, что мутированный ген KCNQ1 имеет 30% идентичность с геном K-канала – Shaker. Коэкспрессия KCNQ1 канального белка с β -субъединицей MinK (ген KCNE1), вызывает медленный задержанный выпрямляющий K-ток, ответственный за реполяризацию кардиомиоцитов во время ПД. Большинство точечных мутаций, вызывающих LQT1 (рис. 71, табл. 1), обнаружены в области поры (S5-P-S6) и приводят к эффекту loss-of-function с уменьшением K-токов. Задержка реполяризации миокардиального ПД в результате данных мутаций приводит к удлинению ПД кардиомиоцитов и может быть причиной аритмий.

LQT5. Синдром связан с мутациями гена KCNE1, кодирующего β -субъединицу minK и экспрессирующегося в сердце и сосудистой полоске внутреннего уха (рис.71, табл. 1). Дефекты minK сопровождаются значительным уменьшением медленных задержанных выпрямляющих K-токов и снижают проводимость одиночного канала. Функциональные нарушения канального комплекса ярко выражены в ситуациях, приводящих к учащению сердечного ритма (например, при физическом и эмоциональном стрессе).

LQT1 и LQT5 с глухотой. Мутации KCNQ1 и KCNE1 (рис. 71) приводят также к синдрому Jervell и Lange-Nielsen – рецессивному наследственному заболеванию характеризуемому врожденной двухсторонней глухотой. Глухота наступает, если функционирование каналов полностью нарушается. Это редкое заболевание, которое выявляется у <1% из всех глухих детей.

LQT2. Мутации гена KCNH2, кодирующего К-канал, известный как HERG (human ether-a-go-go-related gene), были идентифицированы у больных, страдающих LQT2 (табл.1). HERG отвечает за другой важный К-ток (I_{Kr}), который участвует в реполяризации ПД сердца. Мутации локализованы в области поры канала (рис.71) и ведут к нарушению инактивации (Smith P.L., Baukrowitz T., Yellen G., 1996). Мутации HERG подавляют реполяризацию миокардиального ПД и удлиняют Q-T интервал в результате мутаций loss-of-function. Пациенты с синдромом длительного LQT2 могут неожиданно умереть от экстрасистол.

Периодический паралич. Дефекты К-каналов могут приводить к комплексным нарушениям функционирования сердечной и скелетной мышц, а также и различных систем организма. Так, например, мутации гена KCNJ2, кодирующего К-канал входящего выпрямления Kir2.1, могут вызвать приступы периодического паралича (табл. 1). Концентрации калия в плазме во время приступов может быть высокой, низкой или нормальной. Эти приступы происходят как часть аутосомально-доминантного заболевания **синдрома Андерсена** (включающего также кардиальную аритмию и черепно-лицевые аномалии). Kir2.1 каналы играют роль в гиперполяризации мембраны в скелетной и сердечной мышцах, а также влияют на миграцию клеток-предшественников остеоцитов и их слияние во время формирования костей.

Механизмы, лежащие в основе этого заболевания, слабо известны, хотя предварительные данные указывают на мутации loss-of-function, которые приводят к снижению К-токов и, как следствие, к нарушению баланса ионных токов, контролирующей возбудимость мембраны. Дополнительная причина периодического паралича – мутации добавочных субъединиц потенциал-активируемых К-каналов - MiRP2, экспрессирующихся в мышцах. Идентифицированы две мутации MiRP2, уменьшающие токи через эти каналы (Kullmann D. M., Hanna M.G., 2002).

Нейрональные калиевые каналопатии.

Эта группа заболеваний связана с дисфункцией нейрональных К-каналов.

Эпизодическая атаксия типа 1 - единственный тип атаксии, связанный с дисфункцией К-каналов (Felix R., 2000). Другие типы этого заболеваний связаны с мутациями генов Са-каналов (см. ниже).

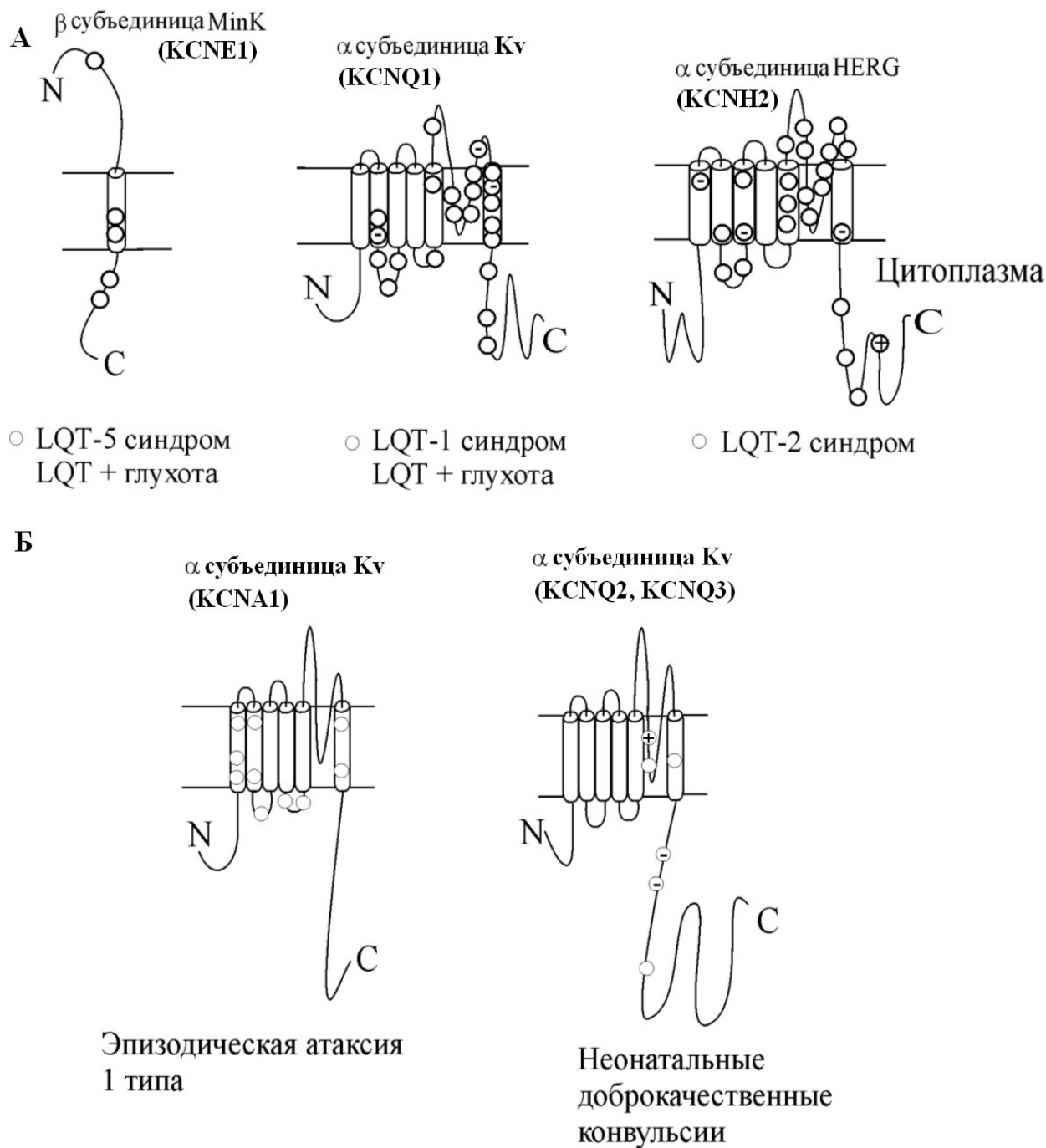


Рис. 71. Дефекты субъединиц К-каналов, приводящие к каналопатиям

Кружочками показаны точечные мутации β - и α -субъединиц некоторых кардиальных, внутреннего уха (А) и нейрональных (Б) калиевых каналов, вызывающие каналопатии (подписано снизу). Сверху указана субъединица канала и кодирующий ее ген (в скобках).

+ - вставка, - - выпадение, ○ – замена аминокислоты
(Из Lehmann-Horn F., Jurlak-Rot K., 1999 с изменениями).

Болезнь начинается в раннем детстве приступами атаксии продолжительностью 1-2 минуты, сопровождающейся некоординированными движениями головы, рук и ног между приступами, а в межприступном периоде – миокимией и непрерывной спонтанной активностью на электромиограмме (Зефилов А.Л. и др., 2000, Kullmann D. M., Hanna M.G., 2002). Эпизодическая атаксия типа 1 является результатом нескольких гетерозиготных точечных мутаций в гене нейронального потенциал-активируемого К-канала (KCNА1/Kv1.1) (рис. 71, табл. 1), являющегося гомологом Shaker. Экспрессия в ооциты *Xenopus* показала, что часть мутаций приводит к потере функции канала, а часть – к увеличению деактивации и С-типа инактивации, замедлению времени активации. Использование специфических антител показало, что каналы, кодируемые KCNА1, локализованы повсеместно в аксонах глутаматергических или ГАМК-ергических нейронов. Особенно много их в аксонах и нервных терминалях корзинчатых клеток, имеющих тормозные синапсы на нейронах Пуркинье (Wang H., Kunkel D.D., Martin D.M. et al., 1993). Регистрация методом пэтч-кламп показала необычайно высокую плотность К-каналов в этих клетках. Блокирование каналов α -дендротоксином вызывало резкое увеличение спонтанных тормозных постсинаптических потенциалов в клетках Пуркинье. Предполагается, что каналы регулируют возбудимость корзинчатых клеток. Нарушение реполяризации ГАМК-ергических аксонов в этой области оказывает вклад в развитие мозжечковой атаксии (Southan A.P., Robertson B., 1998). Дисбаланс между тормозными и возбуждающими входами будет дестабилизировать двигательные единицы при стрессах и физических упражнениях, что и приводит к атаксии. С другой стороны, миокимия может быть результатом повторных разрядов поврежденных мотонейронов вследствие уменьшения К-тока, что замедляет реполяризацию и препятствует гиперполяризации после ПД (Wang H., Kunkel DD., Martin DM et al., 1993).

Доброкачественные наследственные неонатальные конвульсии. Редкие формы эпилепсии, связанные с мутациями генов (KCNQ2 и KCNQ3), кодирующих α -субъединицы потенциал-активируемого К-канала (рис. 71, табл. 2). Эти формы эпилепсии характеризуются частыми короткими приступами, возникающими в течение первой недели жизни, которые исчезают спонтанно в течение нескольких месяцев. Фенотип приступов обычно начинается с

тонической позы и поверхностного дыхания, следующими за симптомами со стороны глаз (широко раскрытые глаза, моргание или фиксация взора), клоническими движениями и автоматизмом. Были описаны семь мутаций гена потенциал-активируемого К-канала KCNQ2 и одна - KCNQ3, которые изменяют структуру области поры и/или COOH-цитоплазматического домена (рис. 71). Экспрессия мутантного KCNQ2 - канала в ооциты *Xenopus* и исследование его активности не обнаружили какого-либо заметного тока, что предполагает отсутствие функций у гомотетрамера. Хотя потенциал-активируемые К-каналы способны реполяризовать мембрану, по видимому, присутствие мутантных К-каналов с уменьшенной проводимостью приводит к тому, что другие потенциал- и лиганд-активируемые каналы будут оставаться открытыми дольше. Показано, что гетеротетрамеры из KCNQ2 и KCNQ3 формируют так называемые М-каналы, которые регулируют подпороговую возбудимость нейрона и ингибируются мускариновыми рецепторами (Wang J.M., Trudeau M.C., Zappia A.M., Robertson G.A., 1998). Мутации KCNQ2 или KCNQ3 вызывают небольшое снижение амплитуды М-токов, которые в норме подавляют пачечную активность нейронов. Недостаточность этого механизма может приводить к снижению судорожного порога и нейрональной гипервозбудимости. Во всяком случае, гетерозиготные мыши с нулевой аллелью по KCNQ2 гену проявляли повышенную чувствительность к эпилептическим триггерам (Celesia G.G., 2001).

Приобретенная нейромиотония (синдром Исаака). Приобретенная нейромиотония характеризуется гипервозбудимостью двигательных нервов и центральными нарушениями, чем и отличается от мышечных миотоний. При этом заболевании периферические двигательные нервы становятся более возбудимыми, что ведет к повторным разрядам после активации мышцы и аномальным сокращениям скелетных мышц. Данные симптомы могут быть уменьшены применением тубокурарина. Предполагено, что в основе патогенеза данного заболевания лежит взаимодействие антител с потенциал-активируемыми К-каналами, что приводит к нарушениям функций двигательного нервного окончания. Задержка реполяризации приводит к гипервозбудимости мембраны (Lawson K, 2000).

Нефрональные и панкреатические калиевые каналопатии.

Нарушения функции $K_{ATФ}$ -каналов в невозбудимых клетках приводят к патологиям многих внутренних органов.

Синдром Барттера. Заболевание связано с мутациями гена *KCNJ1*, кодирующего $K_{ATФ}$ -канал, играющий важную роль в калиевом гомеостазе почки. Предполагается, что изменения канальной функции нарушают возврат калия в просвет канальца и тем самым ингибируется активность $Na-K-2Cl$ котранспорта.

Гиперинсулиновая гипергликемия детей. Нарушение функции $K_{ATФ}$ -каналов приводит к метаболическим изменениям многих клеток. Показано, что мутации генов *Kir 6.2* и *SUR1* субъединиц ведут гиперинсулиновой гипергликемии детей. Это относительно редкое аутосомальное рецессивное заболевание, связанное с нарушением метаболизма глюкозы, характеризующееся нерегулируемой секрецией инсулина и глубокой гипергликемией (Thomas P., Ye Y., Lightner E., 1996). Мутации *SUR1* могут вызывать две группы нарушений: 1) нарушение структуры белка с полной потерей активности $K_{ATФ}$ -канала, 2) нарушение регуляции канала $Mg-ADP$. В этом случае, канал постоянно закрыт. Вследствие этого в β -клетках поджелудочной железы отсутствует активность $K_{ATФ}$ -каналов даже при низком уровне глюкозы. Это приводит к продолжительной деполяризации β -клеток, усилению входа ионов Ca в покое, что и обеспечивает постоянную секрецию инсулина у больных с гиперинсулиновой гипергликемией.

5.2.3. Хлорные каналы

Лиганд-активируемые Cl -каналы

Лиганд-активируемые Cl -каналы относятся к большому семейству рецепторных канальных молекул и делятся на ГАМК- и глицин-активируемые. Дефекты этих рецепторов приводят к ряду неврологических заболеваний.

Нейрональные хлорные каналопатии

Наследственная гиперэкплексия – одна из первых открытых нейрональных каналопатий (Becker C.M., 1957, 1995). Недавние исследования показали, что это заболевание связано с генетическими дефектами

ионотропного **глицинового рецептора**. Известно, что у млекопитающих небольшие дозы стрихнина вызывают чрезмерную реакцию вздрагивания на неожиданный звуковой или механический стимул. Сходный симптомы наблюдаются у пациентов с аутосомальным доминантным заболеванием, известным как наследственная гиперэксплексия, характеризующимся мышечной ригидностью центрального происхождения, особенно в неонатальный период и синдромом чрезмерного вздрагивания на неожиданный звуковой или тактильный стимул. Причиной заболевания является мутация гена *GLRA1*, кодирующего α -субъединицу глицинового рецептора между доменами M2 и M3, которая затрагивает устье канала, изменяя его заряд и таким образом имеет значительный эффект на канальную функцию (рис.72 А). В настоящее время определены хромосома, ген и, по крайней мере, 3 типа мутаций, обуславливающих развитие заболевания у человека (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999). Мутации глицинового рецептора вызывают нарушение постсинаптического торможения мотонейронов глицинергическими нейронами спинного мозга (предположительно, клетками Реншоу), в результате чего возникают неконтролируемые колебания активности мотонейронов.

Генерализованная эпилепсия с фибрилляциями. Другим заболеванием, связанным с дефектами лиганд-активируемых Cl-каналов (ионотропные рецепторы ГАМК), является генерализованная эпилепсия с фибрилляциями. Ионотропный ГАМК_A рецептор представляет собой пентамер, один из распространенных рецепторов в мозге содержит $\alpha 1$, $\beta 2$ и $\gamma 2$ - субъединицы. ГАМК_A-рецепторы опосредуют быструю тормозную связь в мозге. $\gamma 2$ субъединица обычно ассоциирована с одной или более α и β субъединицами и обеспечивает локализацию ГАМК_A-рецептора в тормозных синапсах. Одна из мутаций, идентифицированных при этом заболевании, уменьшает максимальный ток через канал ГАМК_A-рецептора. Таким образом, эпилептический фенотип можно объяснить уменьшением быстрого торможения. Другая мутация не оказывает влияния на амплитуду тока, но снижает потенцирующий эффект бензодиазепинов, которые в контроле усиливают ГАМК-опосредованное торможение (Kullmann D.M., Hanna M.G., 2002).

Потенциал-активируемые Cl-каналы

Мутации генов, кодирующих ClC-каналы, вызывают целый ряд мышечных (миотонии) и почечных заболеваний у человека (Fahlke С., 2001), а также у коз и мышей. В конце 70-х г. прошлого века были обнаружены 2 спонтанные мутации у мыши (Rudel R., 1990), приводящие к одинаковым изменениям поведения. Данные мыши не могут переворачиваться на живот из положения лежа на спине, что связано с рецессивной мутацией гена, кодирующего CLC-1 канал, которая приводит к уменьшению хлорной проводимости и вызывает миотонию скелетных мышц. Через 30 лет после описания миотонии человека Томсенom в 1876 г. была описана порода коз, называемых “окоченевшими”, “падающими” или “нервными” (White G.R., Plaskett J., 1904). У таких животных приступы возникали при попытках произвести быстрое и сильное движение и сопровождались падением на землю на 5-20 секунд с вытягиванием задних ног и шеи. Данное заболевание было идентифицировано как “форма врожденной миотонии коз” (Clark S.L., Luton F.H., Cutler J.T., 1939), причиной которой является сниженная хлорная проводимость в мышечных миотонических волокнах в покое, приводящее к деполяризации и генерации повторных ПД. Показано, что заболевание связано с доминантной аутосомальной мутацией гена, кодирующего CLC-1 канал.

Скелетно-мышечные хлорные каналопатии

Болезнь Томсена или врожденная доминантная миотония - заболевание, связанное с мутациями гена CLCN1, кодирующего скелетно-мышечный хлорный CLC-1 канал, сопровождающееся уменьшением хлорной проводимости мембраны (рис.72 В, табл. 1). Мышечная ригидность является временной и ярко выражена при резком и сильном движении. Миотония уменьшается или исчезает полностью, когда одно и то же движение повторяется несколько раз (феномен согревания), но вновь развивается после нескольких минут отдыха. В редких случаях неожиданный пугающий шум может вызвать генерализованную ригидность, когда пациент падает и остается без движения в течение нескольких секунд или минут. На электромиограмме миотонических мышц обычно наблюдаются пачки повторных ПД с модуляцией амплитуды и частоты.

Рецессивная форма врожденной миотонии носит название **болезни Беккера** (Becker С.M., 1957) и вызывается мутациями того же гена, что и

доминантная форма, причем рецессивная форма является более распространенной. В развитии рецессивной генерализованной миотонии оказывает вклад и дисфункция Na-каналов (Franke C., Laizzo P.A., Hatt H. et al., 1997), аномалия которых может быть связана с плейотропным эффектом гена CLCN1. Ригидность мышц при данном заболевании вызывается тем, что после произвольного сокращения расслабления мышцы не происходит, поскольку мембрана мышечных волокон продолжает генерировать ПД в течение нескольких секунд. Такая гипервозбудимость вызывается временным уменьшением хлорной проводимости через мембрану мышечных волокон в покое. Высокая хлорная проводимость необходима для быстрой реполяризации мембраны Т-трубочек, где происходит накопление ионов К, деполяризующих мембрану, во время тетанического мышечного сокращения. Более 30 точечных мутаций и 3 делеции, вызывающих доминантную или рецессивную наследственную миотонию, было обнаружено в канальном гене (рис. 72 В, табл. 1). Известно, что в Cl-канале существуют две поры, которые по-разному вовлекаются в патологический процесс при доминантной и рецессивной миотонии (Kwieceński H., Lehmann-Horn F. Rudel R., 1988, Saviane C., Conti F., Pusch M., 1999).

Почечные хлорные каналопатии

Болезнь Дента. Заболевание включает клинические симптомы низкомолекулярной протеинурии, гиперкальциурии, нефрокальциноза и почечной недостаточности и связано с изменением проницаемости мембраны эпителия почечных канальцев с нарушением процессов реабсорбции. Причиной заболевания являются рецессивные мутации CLCN5 гена, кодирующего почечно-специфический потенциал-активируемый Cl-канал. Экспрессия мутантного канала в ооциты *Xenopus* показала снижение или отсутствие хлорной проводимости через канал. Оказалось, что ген CLCN5 экспрессируется в клетках проксимальной части почечных канальцев, которые в норме эндцитируют белки, проходящие через клубочковый фильтр. Было предположено, что Cl-каналы необходимы для процесса эндцитоза белков, так как обеспечивают электрический шунт, необходимый для закисления образующихся везикул. Нарушение функций этих каналов объясняет

протеинурию, наблюдающуюся при этом заболевании (Dworakowska B., Dolowy K., 2000).

Синдром Барттера. Клинически и генетически гетерогенное заболевание. Это аутосомальное рецессивное заболевание, характеризующееся гиперренизмом и гиперальдостеронизмом с гипокалиемическим метаболическим алкалозом, гиперкальцийурией, гипохлоремией.

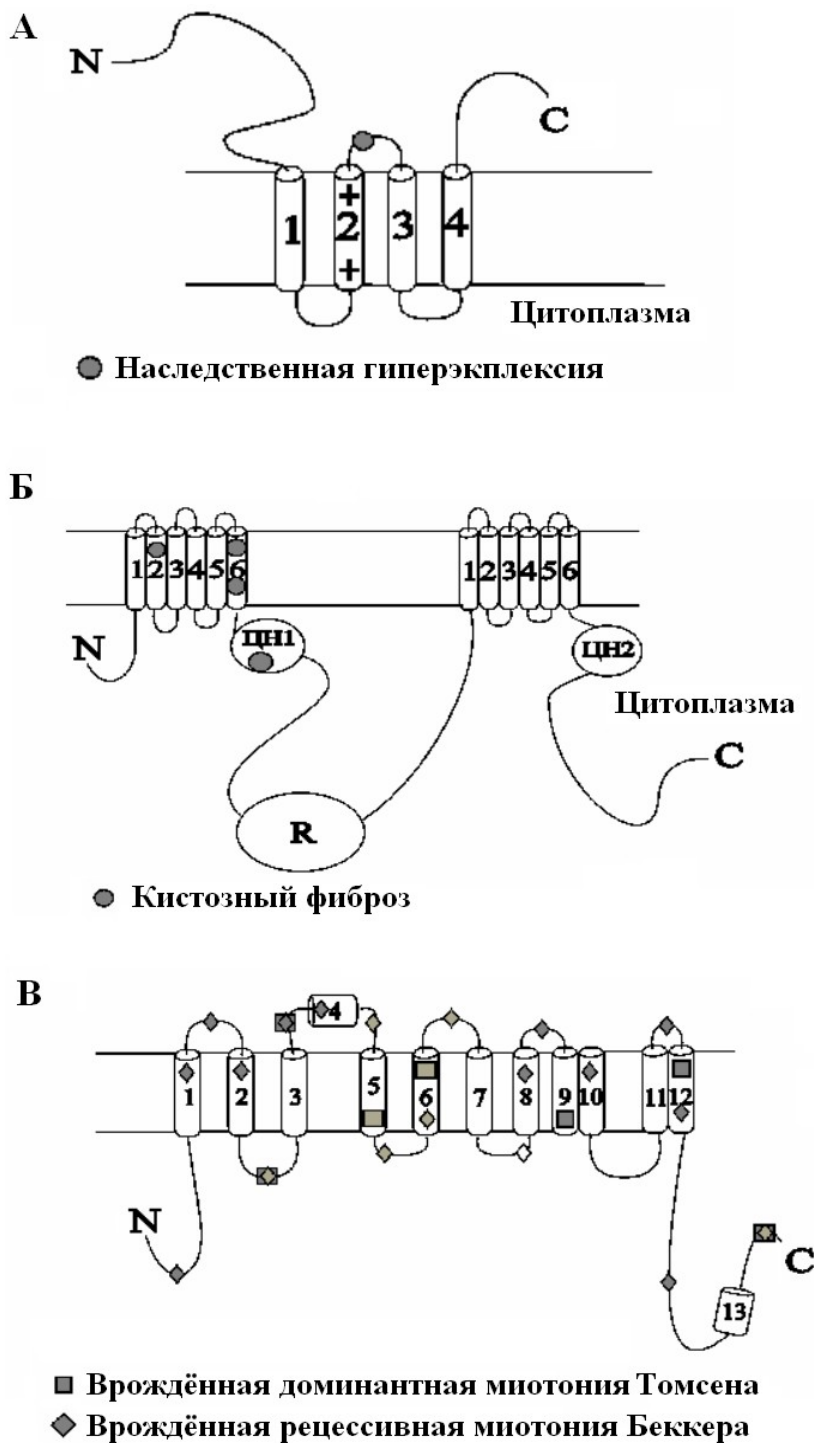


Рис. 72. Генетические дефекты субъединицы глицинового рецептора (А), CFTR –канала (Б) и скелетно-мышечного хлорного канала, CLC-1 (В), приводящие к каналопатиям

Символы указывают на точечные мутации в субъединицах каналов, приводящие к определенным каналопатиям. R – регуляторный домен, ЦН1 и ЦН2 – нуклеотид-связывающие домены, цифрами обозначены сегменты субъединиц. (Из Lehmann-Horn F., Jurlak-Rot K., 1999 с изменениями).

Клинически пациенты проявляют мышечную слабость, гипотонус. Пациенты с синдромом Барттера часто тяжело больны с рождения, что ведет к почечной недостаточности. Идентифицировано три гена, вызывающие данное заболевание, что указывает на различные механизмы патогенеза. Два из них – гены, кодирующие потенциал-независимые ионные транспортеры или каналы, мутации которых ведут к потере функции Na-K-2Cl котранспортера и АТФ-зависимого К-канала ROMK (KCNJ1). Третий генетический вариант синдрома Барттера включает 5 мутаций гена потенциал-активируемого Cl-канала CLCNKB. Предполагается, что уменьшение хлорной проводимости в результате мутаций CLCNKB приводит к уменьшению реабсорбции хлора в дистальных участках петли Генле (Dworakowska B., Dolowy K., 2000).

Секреторные хлорные каналопатии

К данному типу каналопатий можно отнести **кистозный фиброз** – заболевание, к развитию которого приводит нарушение хлорной проводимости в эпителиальных клетках. Первоначально при анализе продукта гена, ответственного за развитие заболевания, было предположено, что он является регуляторным ферментом. Отсюда он и получил свое название - **регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - CFTR)**. Функция CFTR как ионного канала длительное время обсуждалась (Devidas S., Guggina W.B., 1997). Канальная гипотеза была подтверждена экспериментами с использованием метода патч-кламп, которые показали, что CFTR является **цАМФ-активируемым каналом** с проводимостью около 8 пСм. Канал состоит из 12 трансмембранных сегментов, сгруппированных в два отдельных домена по шесть сегментов, и двух нуклеотид-связывающих гидрофильных доменов (Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C. et al., 1995). Канал имеет одну пору и регуляторный домен (R-домен) с множественными потенциальными сайтами для фосфорилирования (рис.72 Б). В норме канал открывается при фосфорилировании этих сайтов. Уровень цАМФ, определяющийся физиологическими нуждами клетки, будет регулировать нормальное функционирование данного канала. Мутации гена CFTR приводят к развитию кистозного фиброза (рис. 72 Б) - аутосомального рецессивного наследственного заболевания, приводящего часто к летальному исходу. Мутантный канал в дыхательном эпителии не отвечает на регуляцию

цАМФ и остается закрытым, не позволяя ионам Cl входить в клетку, и, следовательно, предотвращает нормальную секрецию в воздухоносных путях. Это ведет к аккумуляции густой слизи и смерти 90% пациентов до достижения ими взрослого возраста. Кроме того, наблюдается нарушение секреции эпителиальных клеток поджелудочной железы, кишечника, слюнных желез и других органов. Одно из диагностических признаков кистозного фиброза - это высокий уровень $NaCl$ в потовой жидкости (Sperelakis N., 1995). Идентифицировано около 500 мутаций гена CFTR, ведущих к задержке канального белка внутри клетки и невозможности транспортировки канала к плазматической мембране.

5.2.3. Кальциевые каналы

Генетические дефекты Ca -каналов приводят к целому ряду скелетно-мышечных и нейрональных каналопатий .

Скелетно-мышечные кальциевые каналопатии

Выявлен ряд врожденных заболеваний связанных с генетическими дефектами Ca -каналов скелетных мышц.

Гипокалиемический периодический паралич. Это довольно редкое аутосомальное доминантное заболевание, возникающее при дисфункции Ca -каналов. Симптомами заболевания являются эпизодическая слабость, возникающая в связи с пониженной внеклеточной концентрацией ионов K . Обычно приступы слабости и понижения концентрации ионов K возникают через несколько часов после приема щелочной пищи и продолжаются от 4 до 24 часов. Другими провоцирующими факторами являются отдых после физической нагрузки и ситуации, когда ионы K входят в мышечную клетку. Считается, что гипокалиемия вызывается стимуляцией Na/K -насоса, в результате чего ионы K транспортируются из вне- во внутриклеточную среду. Низкая внеклеточная концентрация ионов K может вызывать электрическую дестабильность мембраны, так как калиевый равновесный потенциал становится более отрицательным и калиевая проводимость приближается к нулю (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1994). Заболевание связано с мутациями гена $\alpha 1s$ субъединицы дигидропиридинового рецептора (CACN1A3) (Ptacek,

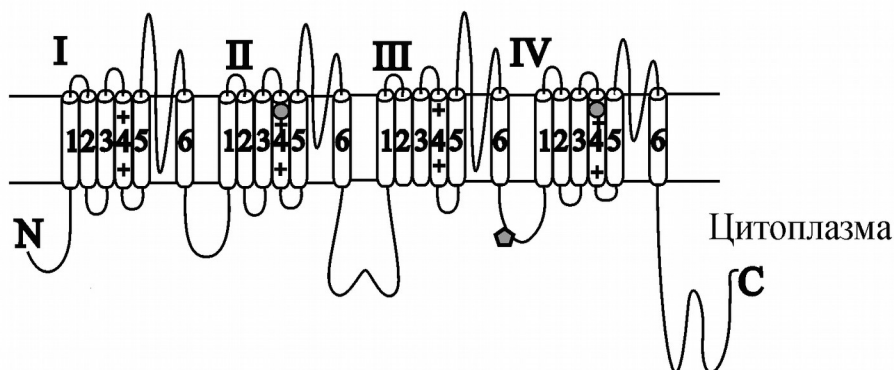
1994), где консервативный аргинин замещается на гистидин или глицин в S4-сегменте домена IV (рис. 73, табл. 1). Функциональная экспрессия этой мутантной субъединицы показала уменьшение амплитуды и изменение параметров активации L-типа Ca-тока. Каким образом измененные Ca-токи L-типа связаны с гипокалиемическими приступами мышечной слабости остается невыясненным? Так как электрическая мышечная активность, вызванная нервной стимуляцией, уменьшена или даже отсутствует во время приступов, более вероятно что при данном заболевании происходит нарушение процессов возбуждения, чем процессов электромеханического сопряжения. Новые ключи к пониманию патогенеза гипокалиемического периодического паралича могут быть получены идентификацией дополнительных казуальных генов, что предполагается в гипотезе генетической гетерогенности заболевания.

Злокачественная гипертермия. Это генетическая предрасположенность людей аномально реагировать на летучие анестетики или деполяризующие мышечные релаксанты. Считают, что патологически высокая концентрация Ca в миоплазме при действии данных агентов ведет к увеличению мышечного метаболизма, продукции тепла и мышечной ригидности. Гипертермия связана с метаболическим ацидозом, гиперкалиемией и гипоксией. Метаболические изменения обычно быстро прогрессируют и без немедленного лечения 70% пациентов умирают вследствие фибрилляции желудочков, развития неврологических или почечных осложнений. Раннее лечение дантроленом, блокирующим освобождение Ca из СПР, уменьшает количество смертельных случаев до 10%. Злокачественная гипертермия – генетически гетерогенное заболевание. В ряде случаев оно вызвано мутациями $\alpha 1$ -субъединицы дигидропиридинового рецептора в области, соединяющей домены III и IV, лежащей в основе функциональной связи между Ca-каналом и Ри-рецептором (рис. 73, табл. 1). Кроме того, описаны мутации генов, кодирующих Ри-рецепторы 1 типа скелетных мышц, при данном заболевании (рис. 74).

Описано более 20 точечных мутаций Ри- рецептора при злокачественной гипертермии у человека, находящиеся в длинном NH₂-конце белка (рис. 73, табл. 1), в так называемой ножке канального комплекса, который содержит сайты связывания для различных активирующих (кальций в микромолярных концентрациях, АТФ, кальмодулин, кофеин, рианодин в наномолярных

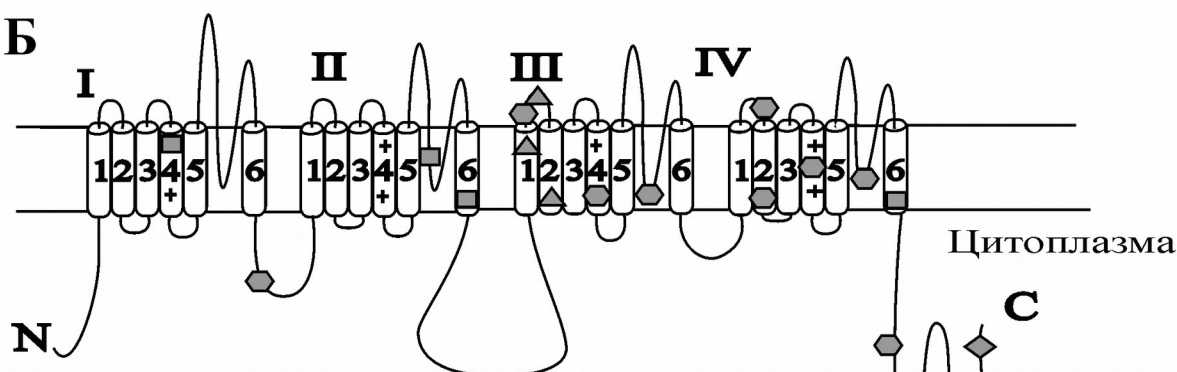
концентрациях) и инактивирующих (кальций в концентрациях превышающих 10 мкМ,

A



- ◆ Злокачественная гипертермия
- Гипокалемический периодический паралич

Б



- Семейная гемиплегическая мигрень
 - ▲ Эпизодическая атаксия 2 типа
 - ◆ Спинальная атаксия 6 типа
 - ◆ Врожденная стационарная ночная слепота
- | α_{1a}
| α_{1f}

Рис. 73. Генетические дефекты α -субъединицы потенциал-активируемого Са-канала, приводящие к каналопатиям

Символами указаны точечные мутации в α_{1s} -субъединице L-типа Са-канала скелетной мышцы (дигидропиридиновый-рецептор) (А) и в α_{1a} или α_{1f} - субъединицах P/Q-типа Са-канала мозга человека (Б), приводящие к соответствующим каналопатиям. (Из Lehmann-Horn F., Jurlak-Rot K., 1999 с изменениями).

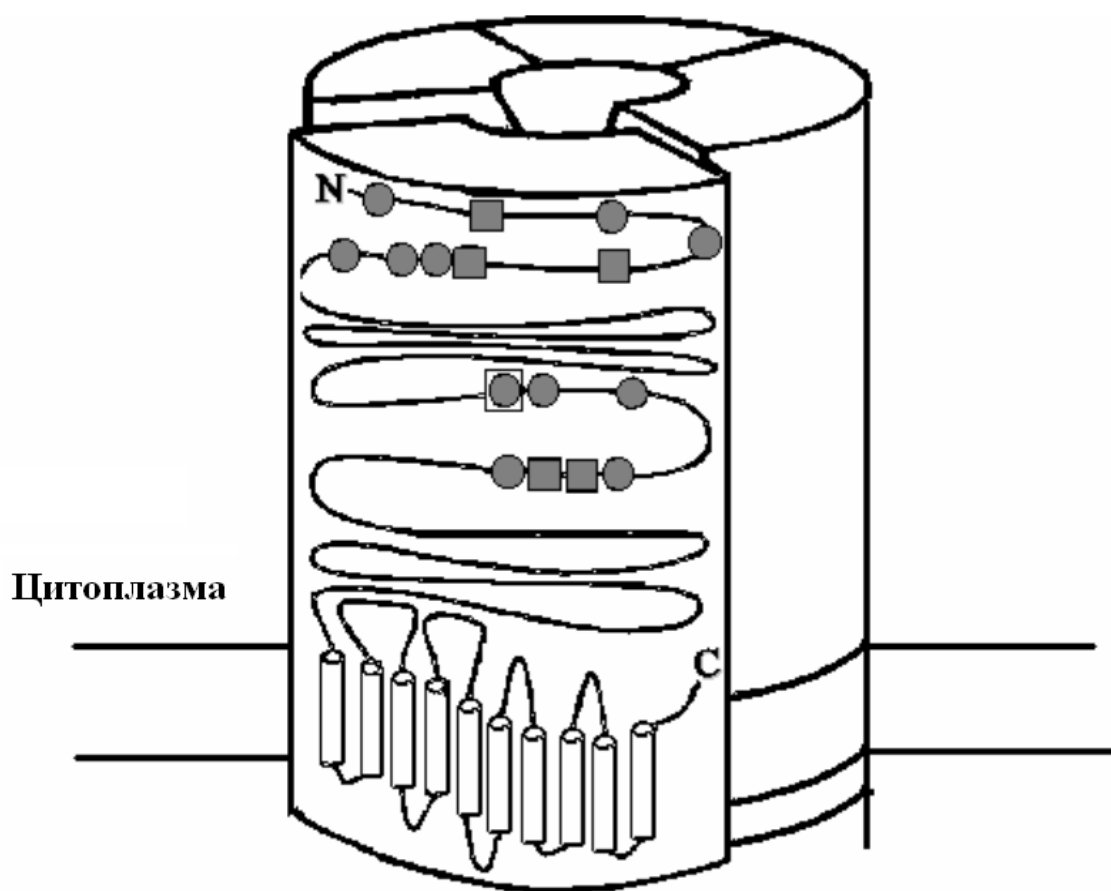
магний в миллимолярных и рианодин в микромолярных концентрациях) лигандов. Диагностически важным критерием при злокачественной гипертермии является увеличение чувствительности мышцы к кофеину, что связано с измененной функцией Ри-рецептора. Низкие концентрации кальция активируют канал выше нормального уровня и более высокие концентрации кальция требуются для ингибирования канала. Экспрессия мутантного Ри-рецептора в нормальных первичных мышечных клетках человека показала увеличенный Са-ответ при действии различных агентов, а ионы Mg оказывают значительно меньший ингибирующий эффект. Симптомы злокачественной гипертермии можно объяснить дефектами регуляции внутриклеточной концентрации ионов Са. Постоянно высокий уровень ионов Са в волокне будет вызывать контрактуру, увеличивать гликолитический и анаэробный метаболизм с истощением АТФ, глюкозы, кислорода, и, кроме того, вести к чрезмерной продукции CO₂, молочной кислоты и тепла.

Миопатия центрального стержня представляет собой врожденную аутосомальную проксимальную миопатию со структурными изменениями в мышечных волокнах 1 типа. Название болезни происходит из-за поражения центральных областей вдоль длины мышечного волокна, которые содержат структурированные и неструктурированные миофибриллы, и где отсутствуют митохондрии. У пациентов с данным заболеванием гипотония мышц отмечается с рождения. Позже мышечная сила обычно увеличивается за исключением редких случаев прогрессирующей мышечной слабости. Сообщается также о судорогах, вызванных физическими упражнениями, и некоторых симптомах, сходных со злокачественной гипертермией, что свидетельствует о нарушениях функций Ри-рецепторов. Предполагается, что развитие заболевания связано с уменьшением освобождения кальция через каналы Ри-рецептора вследствие изменения области, проводящей ионы (рис. 74, табл. 1).

Нейрональные кальциевые каналопатии

Эпизодическая атаксия 2 типа. Это аутосомальное доминантное параксизмальное мозжечковое заболевание, характеризующееся приступами атаксии (нарушением координации движения) в ответ на ацетозоламид, мигрень-подобными симптомами, межприступным нистагмом и мозжечковой атрофией. Мутации гена *CACNA1A*, кодирующего α -субъединицу

нейронального потенциал-активируемого Ca-канала P/Q-типа, при такой атаксии ведут к изменениям посттранскрипционного сплайсинга и гаплонедостаточности, при которой функционирует только одна копия гена, что соответствует мутации loss-of-function (рис. 73, табл. 2). Типичными клиническими проявлениями заболевания являются атаксия туловища и конечностей, невнятная речь, головокружение, тошнота, рвота, двусторонняя слабость конечностей, двустороннее снижение зрения. Все эти симптомы провоцируются физическим переутомлением, эмоциональным перенапряжением, приемом алкоголя (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999).



- Злокачественная гипертермия
- Злокачественная гипертермия / миопатия центрального стержня

Рис. 74. Генетические дефекты Ри-рецептора скелетной мышцы, приводящие к каналопатиям.

Представлена схема строения Ри-рецептора. Символами указаны точечные мутации, приводящие к соответствующим каналопатиям.

(Из Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999 с изменениями).

В патологический процесс при данном заболевании вовлекаются несколько структур мозга – мозжечок, ствол мозга и кора больших полушарий, что выявляется как по клинической картине, так и по данным позитронной эмиссионной томографии, определяющей снижение метаболизма глюкозы в мозжечке. Преобладание мозжечковой симптоматики можно объяснить преимущественной локализацией Ca-каналов P/Q-типа именно в мозжечке.

Спиноцеребеллярная атаксия 6 типа. Эта форма атаксии обусловлена мутациями (увеличением числа тринуклеотидных повторов) кодирующей области нейронального потенциал-зависимого Ca-канала P/Q-типа (рис. 73, табл. 2) (Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K., 1999), вследствие которой увеличивается проницаемость канала для ионов Ca. Это сопровождается повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca, что может привести к апоптозу клеток Пуркинье, клеток-зерен, клеток зубчатого ядра, нижней оливы, и проявляется в виде прогрессирующей мозжечковой дисфункции (Celesia G.G., 2001).

Семейная гемиплегическая мигрень. Редкий аутосомальный доминантный подтип мигрени, связанный с иктальным гемипарезом и в некоторых случаях с прогрессирующей атрофией мозжечка. Описано 6 мутаций в кодирующем регионе CACN1A, которые ведут к сравнимым фенотипам. Мутации gain- и loss-of-function, локализованные в сенсоре потенциала или в области поры канала, ведут к изменениям потенциал-зависимости, кинетики воротного механизма, ионной проводимости и селективности (рис. 73, табл.2). Текущая модель патогенеза мигрени включает гипотезу распространяющейся депрессии, предшествующей возникновению приступа. Возможно, что CACN1A – ген данного состояния, а не реальный ген мигрени, и боль является вторичным эффектом длительной деполяризации. Экспрессия мутантных каналов в ооцитах *Xenopus* показала легкое ускорение инактивации и времени возвращения мутантных каналов из состояния инактивации.

Врожденная стационарная ночная слепота. Рecessивное непрогрессирующее заболевание сетчатки, характеризующееся ночной слепотой, уменьшенной зрительной активностью, миопией, нистагмом, косоглазием. Нарушения связаны с мутациями гена *SACNA1F* $\alpha 1f$ -субъединицы Са-канала (рис. 73). Различают два клинических типа: 1) полная врожденная стационарная ночная слепота с нефункционирующими палочками и нормальными колбочками; 2) неполная врожденная стационарная ночная слепота с пониженной функцией палочек и колбочек. Второй тип вызывается нарушением функции L-типа Са-каналов сетчатки, что ведет к уменьшению освобождения медиатора из фоторецепторных пресинаптических терминалей.

Дисфункции Са-каналов при аутоиммунных заболеваниях

Дисфункции Са-каналов могут быть связаны не только с мутациями кодирующих их генов, но также и аутоиммунными заболеваниями.

Миастенический синдром Ламберта–Итона. Это аутоиммунное заболевание часто сопровождает злокачественные опухоли. Оно связано с уменьшением квантового освобождения АХ из двигательного нервного окончания и характеризуется слабостью, миалгиями и быстрым развитием утомления. Показано наличие антител, направленных против потенциал-активируемых Са-каналов как в опухоли, так и в двигательных нервных окончаниях. Показано, что аутоантитела плазмы пациентов с миастеническим синдромом Ламберта–Итона уменьшают Са-ток в мотонейронах в большей степени, чем в чувствительных нейронах. Антитела при миастеническом синдроме Ламберта–Итона нарушают функции L-, N-, P/Q-и T-типы Са-каналов (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999). Широкий спектр антител, по всей видимости, связывается не только с α -субъединицами Са-каналов, но также с β -субъединицами и белками экзоцитоза, в частности, синаптотагмином. Электронно-микроскопические исследования двигательных нервных окончаний при этом заболевании обнаружили уменьшение числа структур, соответствующих потенциал-активируемому Са-каналам (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2002).

Амиотрофический латеральный склероз. Это заболевание характеризуется слабостью и атрофией мышц и связано с дисфункцией

мотонейрона. При прогрессивной мышечной атрофии преимущественно повреждаются клетки передних рогов спинного мозга без изменений в чувствительных нейронах. Часто болезнь проявляется в виде спастичности и гиперрефлексии нижних конечностей, слабости и атрофии мышц верхних конечностей. Существует несколько гипотез развития амиотрофического латерального склероза: токсичность, вызванная сверхактивацией глутаматных рецепторов, мутация гена супероксиддисмутазы и продукция аутоантител к Са-каналам. Рассмотрим последнюю гипотезу. Известно, что аутоантитела к Са-каналам, приводят к дегенерации и смерти мотонейронов. Биохимическими и электрофизиологическими методами было показано связывание аутоантител с Са-каналами и изменение их функции. Обнаружено также, что иммуноглобулины пациентов с амиотрофическим латеральным склерозом связываются с L-типом Са-каналов, увеличивают Са-ток и вызывают повреждение и гибель мотонейронов *in vitro*. Более того, повышение внутриклеточного Са ведет к увеличению количества везикул в аксонных терминалях спинальных мотонейронов и бутонах, образующих синапсы на спинальных мотонейронах. Электрофизиологические исследования на животных показали, что иммуноглобулины увеличивают Са-токи и освобождение медиатора (Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al., 1999). Показано, что $\alpha 1$ -субъединица потенциал-активируемого Са-канала – основной антиген, связывающий антитела.

5.2.4. Лиганд-активируемые неселективные ионные каналы

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (Н-АХ-рецепторы).

Дисфункция Н-АХ-рецепторов лежит в основе некоторых аутоиммунных и генетических заболеваний. Гены, кодирующие различные субъединицы Н-АХ-рецепторов являются кандидатами для ряда неврологических заболеваний.

Врожденная миастения. Это аутосомальное доминантное заболевание, которое характеризуется мышечной слабостью, быстрым утомлением, прогрессивной мышечной атрофией, генерацией повторных ПД в ответ на одиночное раздражение, дегенерацией постсинаптической области мышечных волокон. Заболевание является гетерогенным, и только некоторые формы

связаны с мутациями АХ-рецепторов («постсинаптическая» врожденная миастения). При этом обнаружены мутации генов, кодирующих $\alpha 1$ (CHRNA1), $\beta 1$ (CHRNB1), δ (CHRND), ϵ (CHRNE) субъединицы (табл. 1, рис. 75). Другие формы вызываются нарушением процессов синтеза, заполнения везикулы или освобождения АХ, а также недостаточностью ацетилхолинэстеразы («пресинаптическая» врожденная миастения). В зависимости от тяжести заболевания пациенты испытывают слабость, утомляемость глазодвигательных, глоточных, дыхательных мышц или мышц конечностей. Электромиографические исследования показали увеличение латентного периода и характерное снижение ответов при ритмической стимуляции. В некоторых случаях, связанных с фенотипом медленного канала, в ответ на одиночное раздражение возникает повторный разряд волокон. Детальное исследование ответов мышечных волокон *in vitro* показало наличие вариантов патологий, названных синдромом медленного и быстрого канала. В случае синдрома быстрого канала длительность миниатюрных потенциалов концевой пластинки меньше, чем в норме, а в случае синдрома медленного канала – больше.

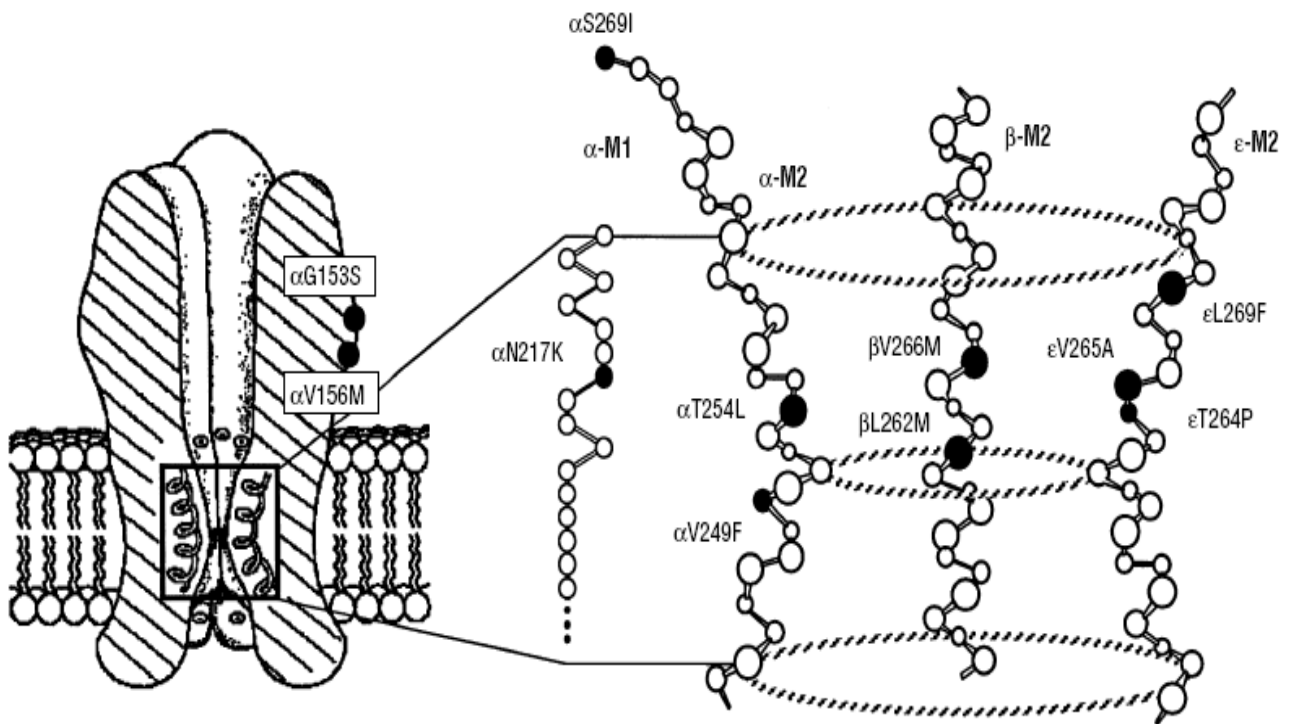


Рис. 75. Генетические дефекты никотинового ацетилхолинового рецептора, приводящие к врожденной миастении.

Слева представлен разрез ацетилхолинового (АХ) рецептора, встроенного в липидный бислой. Внеклеточная часть АХ-рецептора представляет собой воронкообразный канал, самая узкая часть которого образует воротный механизм, формируемый М2 доменами каждой субъединицы. Справа показаны М1 и М2 домены α -субъединицы, М2 домены β и ϵ субъединиц, черные кружочки с подписями указывают на мутации, приводящие к синдрому медленного канала (Из Engel A.G., Ohno K., Sine S.M., 1999 с изменениями).

Эти изменения связаны с различными нарушениями воротного механизма канала, приводящими к ускорению или замедлению процессов открытия или закрытия канала. Синдром медленного канала характеризуется увеличением аффинности рецептора к ацетилхолину, что может приводить к десенситизации рецепторов. Увеличение длительности открытого состояния канала или его повторные открытия вызывают продолжительную деполяризацию мембраны, что ведет к инактивации потенциал-активируемых Na-каналов и потере мышечной возбудимости. Продолжительная деполяризация также вызывает увеличенный вход ионов кальция, что может привести к прогрессивной деструкции постсинаптической области нервно-мышечного соединения.

Аутосомальная доминантная ночная эпилепсия фронтальной доли - редкая форма эпилепсии, которая вызывает короткие частые и интенсивные припадки исключительно во время ночного сна. Приступы обычно возникают сразу же после засыпания или непосредственно перед пробуждением. Сопровождаются гиперкинезами, клоническими подергиваниями, тоническими вытягиваниями. Исследования показали, что заболевание связано с мутациями loss-of-function или gain-of-function генов *CHRNA4* или *CHRN2*, кодирующих гетеропентамерный N-АХ-рецептор - $\alpha 4/\beta 2$ (табл. 2). В случае $\alpha 4$ -субъединицы было выявлено замещение одной аминокислоты (серина-248 на фенилаланин) во втором трансмембранном домене. Электрофизиологический анализ таких каналов, экспрессированных в ооциты *Xenopus*, показал более быструю десенситизацию по сравнению каналами дикого типа. Кроме того, наблюдалось уменьшение времени открытого состояния и снижение проводимости одиночного канала.

Нарушение функции рецептора может приводить к увеличению возбудимости постсинаптических нейронов, так как пресинаптические N-АХ-рецепторы модулируют высвобождение ГАМК. В результате нарушаются процессы пресинаптического торможения нейронов с появлением очагов эпилептического возбуждения. Позднее было выявлено, что в основе этого вида эпилепсии могут быть и другие варианты мутаций, некоторые из которых влияют также на трансмембранные переносы кальция (Зефилов А.Л. и др., 2000).

Миастения гравис. Аутоиммунное заболевание, вызываемое антителами, направленными против Н-АХ-рецепторов мышцы. Впервые данное заболевание было описано в 1877 г. Самуэлем Вилксом. В середине 20-века было показано, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы улучшают течение заболевания. В 70-х годах 20 века было обнаружено, что большинство симптомов миастении гравис связано с Т-лимфоцит-зависимыми антителами плазмы к Н-АХ-рецепторам. Пациенты с данным заболеванием испытывают мышечную слабость, которая обычно усиливается при продолжительной активности мышц. Чаще всего поражаются мышцы, контролирующие движение глаз, век, лица и глотки. При этом заболевании происходит деградация Н-АХ-рецепторов на постсинаптической мембране, изменяется геометрия концевой пластинки, что приводит к уменьшению вероятности связывания медиатора с рецептором, уменьшению амплитуды потенциала концевой пластинки, нарушению генерации ПД и сокращения мышцы. В результате блокируется нервно-мышечная передача. Оказалось, что главную роль в патогенезе миастении гравис играют антитела к α -субъединице Н-АХ-рецептора, которая имеет два сайта связывания антител: бунгаротоксин-связывающий сайт и участок, названный основной иммуногенной областью (Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M, 2000).

Каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами (ЦН-каналы)

Полная цветовая слепота – редкое аутосомальное заболевание, характеризующееся фотофобией, уменьшением остроты зрения, нистагмом и полной неспособностью различать цвета, что может быть связано с мутацией гена CNGA3 ($\alpha 3$ субъединицы), кодирующего цГМФ-зависимые катионные каналы (Dworakowska B., Dolowy K., 2000).

5.2.5. Глиальные каналопатии

Коннексин 32: Болезнь Chacot-Marie-Tooth, связанная с X-хромосомой. Известна только одна глиальная каналопатия, вызывающая неврологическое заболевание (табл.2). Болезнь Chacot-Marie-Tooth, связанная с X-хромосомой, характеризуется прогрессивной двигательной и сенсорной

нейропатией с замедлением проведения ПД. Идентифицировано множество мутаций гена коннексин 32 при этом заболевании. Коннексин 32 экспрессируется в Шванновских клетках, а также в ЦНС и участвует в формировании щелевых контактов между концентрическими слоями миелиновой оболочки, покрывающей аксон. Нарушение функций коннексонов лежит в основе данного заболевания, вероятно, вследствие нарушения цитоплазматического гомеостаза во внутренних слоях миелина (Kullmann D. M., Hanna M.G., 2002).

5.3. Принципы терапии каналопатий

В настоящее время методы лечения каналопатий обычно носят симптоматический характер и часто направлены на минимизацию факторов, провоцирующих возникновение приступа и компенсацию клеточных, мембранных и органных нарушений, возникающих при дефектах функционирования измененных ионных каналов. При этом используются обычно либо активаторы, либо блокаторы ионных каналов клетки, либо оба этих типа веществ. Для восстановления нарушенной функции довольно часто используются воздействия на нормальные, неизмененные ионные каналы. Реальный терапевтический подход часто направлен на устранение длительной деполяризации или ускорение реполяризации клеток, уменьшение внутриклеточной концентрации ионов Са и т.д. Если дефект ионного канала сопровождается нарушением синаптических функций, то используются фармакологические агенты, изменяющие секрецию медиатора и чувствительность постсинаптической мембраны к медиатору, или вещества, нарушающие инактивацию медиатора в синаптической щели. Для многих каналопатий стратегия патогенетического лечения отсутствует. Познакомиться с конкретными терапевтическими подходами в лечении каналопатий можно в специальных медицинских обзорах и книгах (Davies N.P, Hanna M.G., 2001, Kullmann D.M., Hanna M.G., 2002, Avanzini G, Franceschetti S, Avoni P, Liguori R., 2004, Venance S.L., Cannon S.C., Fialho D. et al., 2006, Graves T.D., Hanna M.G., 2007). В настоящее время нет медикаментов, способных направленно воздействовать на дефектные ионные каналы, однако возможность

фармакологической терапии, нацеленной на специфические поврежденные каналы, рассматривается. Естественно, кардинальным подходом в лечении каналопатий является использование методов генной терапии. Однако эти методы еще не разработаны, а их применение вызывает много сомнений.

Заключение

Одним из глобальных открытий прошлого века в области нейробиологии является вскрытие механизмов работы и функционального значения ионных каналов клеточных мембран. Ионные каналы – это высокоспецифичные белковые структуры, обеспечивающие проникновение ионов и некоторых других низкомолекулярных веществ через клеточную мембрану. Ионные каналы не всегда доступны для ионов и могут находиться в проводящем (открытом) и непроводящем (закрытом) состояниях. Канальная проводимость – легкость или свобода прохождения ионов через открытый канал – может быть потенциал-зависимой. Такие каналы модулируются изменениями потенциала на мембране. Другие классы каналов открываются при взаимодействии со специфическими лигандами или при деформации мембраны. На работу каналов могут также влиять вне- и внутриклеточные лиганды и метаболиты, процессы фосфорилирования и дефосфорилирования и другие факторы.

Функции ионных каналов мембран живой клетки трудно переоценить. Они регулируют рН и объем клетки, обеспечивают пассивный транспорт ионов и воды через мембрану, определенную внутриклеточную концентрацию ионов Са. В возбудимых клетках ионные каналы обеспечивают создание высокого МП покоя, возбудимость, инициируют выделение гормонов и сокращение мышечных волокон. Каналы принимают участие в формировании всех видов электрических сигналов в нервной системе (ПД, синаптические и рецепторные сигналы), обеспечивая процессы восприятия сенсорной информации, передачи информации с одной возбудимой клетки на другую.

В настоящее время мы достаточно много знаем о структуре и функциональном значении молекулярных элементов большинства известных ионных каналов. Оказалось, что практически любой канал состоит из нескольких структурно-функциональных частей, отвечающих за открытие,

закрытие, селективность, активацию и инактивацию, регуляцию. Порообразующая часть ионного канала может представлять собой единый полипептид, организованный в виде нескольких идентичных трансмембранных доменов, или состоять из нескольких белковых субъединиц. Каждая порообразующая субъединица или домен обычно представлены несколькими трансмембранными α -спиральными сегментами с N- и C-терминальными участками белка, направленными внутрьклеточно или внеклеточно. Один из трансмембранных сегментов субъединицы потенциал-активируемых каналов содержит уникальный набор положительных зарядов и функционирует как сенсор потенциала (Armstrong C.M., Hille B., 1998, Hille B., 2001). Лиганд-активируемые каналы содержат специализированный рецепторный участок.

К настоящему времени ионные каналы представляют собой большое семейство, состоящее из более, чем 400 белковых молекул, кодирующихся 1-2% генома человека. Многие каналные гены экспрессируются тканеспецифичным образом, тогда как другие экспрессируются повсеместно. Развитие методов молекулярной биологии позволило идентифицировать и клонировать гены, кодирующие различные ионные каналы, выявить особенности их функционирования с использованием электрофизиологических методов.

Прогресс молекулярной генетики и электрофизиологии конца прошлого века показал, что многие нервные и мышечные расстройства, включая миотонии и периодические параличи, вызваны дисфункциями ионных каналов в мембране. Эта увеличивающаяся группа заболеваний, названная каналопатиями, в настоящее время затрагивает и сердечную мышцу, приводя к аритмиям, центральные нейроны, приводя к пароксизмальным болезням мозга – эпилепсии, мигрени и атаксии. Оказалось, что дефекты функционирования ионных каналов, лежащие в основе различных заболеваний, могут возникнуть при мутации генов, кодирующих молекулярную структуру канала или его регуляторов, а также при связывании с аутоантителами. При нарушении функционирования ионного канала мы наблюдаем дисфункцию не только возбудимых клеток (нервных, мышечных, эндокринных), но и проблемы с ионным транспортом в невозбудимых тканях. Для многих болезней, связанных с дефектами ионных каналов, существуют подробные клинические описания. Появление новых подходов - генетического анализа и функциональной

экспрессии, дают нам возможность проникнуть в патофизиологические механизмы, лежащие в основе клинических проявлений этих расстройств.

Список литературы

1. Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. Механизмы функционирования и регуляции синоатриального узла млекопитающих // Успехи физиол. наук. – 2009. – Т.40, № 4. – С. 20-40.
2. Альтман Я.А. и др. Физиология сенсорных систем и высшей нервной деятельности в 2-х т. //М.: Академия, 2009. - 288 с.
3. Архипова О.В., Гришин С.Н., Ситдикова Г.Ф., Зефиоров А.Л. Пресинаптические эффекты арахидоновой кислоты и простагландина E2 в нервно-мышечном синапсе лягушки // Росс. физиол. журн. им. Сеченова И.М.. – 2005. - т.91,№3. – С. 268-276.
4. Балезина О.П. Роль внутриклеточных кальциевых запасов в нервных терминалях в регуляции секреции медиатора // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33. N 3. - С. 1-31.
5. Балезина О.П., Букия А.Н., Лаптева В.И. Вызванная активность нервно-мышечных синапсов мышцы на фоне действия дантролена и рианодина // Рос. физиол. журн. им. Сеченова. - 2001. - Т. 87, № 11. - С.1511-1518.
6. Балезина О.П., Сурова Н.В., Лаптева В.И. Изменение спектра спонтанно секретлируемых квантов медиатора под действием кофеина и рианодина в нервно-мышечном синапсе мышцы // ДАН. - 2001. - Т.380. - С.1-3.
7. Безгина Е.Н., Кашапова Л.А., Мошков Д.А., Зефиоров А.Л. Отдельная нервная терминаль портняжной мышцы лягушки: ультраструктурные особенности и секреция медиатора // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1987. - Т. 103. - С. 617-621
8. Бениш Т.В., Зефиоров А.Л., Фаткуллин Н.Ф. Определение места освобождения медиатора в двигательном нервном окончании лягушки при помощи трех внеклеточных микроэлектродов // ДАН. - 1988. - Т. 302, N 2. - С. 477-480.
9. Ведерникова Е.А., Старущенко А.В., Негуляев Ю.А. Идентификация

- механо-активируемых каналов клеток лейкемии человека // Цитология. - 2001.- – V.43, № 4. – P. 326–327.
10. Головки А.И., Бурякова Л.В., Куценко Ц.А., Свидерский О.А. Молекулярные аспекты функциональной гетерогенности ГАМК-рецепторов // Успехи физиол. наук. - 1999. - Т.30, N1. - С. 29-38.
 11. Зефирова А.Л. Везикулярная гипотеза освобождения медиатора в синапсе // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, N 9. - С.1-7.
 12. Зефирова А.Л. Исследование процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. - Т.90, № 8. – С. 252-253.
 13. Зефирова А.Л. Медиаторы, эволюция представлений // Вестник Российской АМН. – 2005. - Т. 1. – С. 1-4.
 14. Зефирова А.Л., Бениш Т.В., Фаткуллин Н.Ф., Черанов С.Ю. Анализ секреции медиатора в активной зоне двигательного нервного окончания // Нейрофизиология. -1990. - Т. 22, N 3. - С. 318-327.
 15. Зефирова А.Л., Богданов Э.И., Заббарова М.А., Мухамедьяров М.А. Генетические дефекты ионных каналов и неврологические заболевания в клиническом, генетическом и физиологическом аспектах // Неврол. вестник. - 2000. - Т. 32, N 1-2. -С. 52-61.
 16. Зефирова А.Л., Гафуров Б.Ш. Исследование кинетики ионных токов нервного окончания с неоднородным распределением плотности ионных каналов // Биофизика. 1996. - Т. 41, N 2. - С. 384-392.
 17. Зефирова А.Л., Гафуров Б.Ш., Шакирьянова Д.М. Ионные токи двигательного нервного окончания мышцы (электрофизиология и компьютерное моделирование) // Нейрофизиология. - 1997. - Т.1. - С.70-78.
 18. Зефирова А.Л., Каталымов Л.Л., Усмендеева И.В., Халиуллина Р.Р. Изменения электрогенеза миелинизированных и немиелинизированных нервных волокон под влиянием экзогенного оксида азота // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2001. - Т.131, N 6. - С. 604-607.
 19. Зефирова А.Л., Мухамедзянов Р.Д., Минлебаев М.Г. и др. Секреция медиатора в нервно-мышечном синапсе у лягушки после длительного воздействия бескальциевых растворов // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 2002. - Т. 88, N2. - С. 191-204.

20. Зефирова А.Л., Мухамедьяров М.А. Механизмы кратковременных форм синаптической пластичности // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 8. - С. 1041-1059.
21. Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф. Ионные каналы нервного окончания // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33, N 4. - С. 3-33.
22. Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф. Каналопатии // глава 5 в книге "Дизрегуляторная патология нервной системы" под ред. акад. РАМН Е.И.Гусева и акад.РАМН Г.Н.Крыжановского, М.:Медицинское информационное агентство, 2009, С. 275-323.
23. Зефирова А.Л., Хазипов Р.Н., Бен-Ари Е. ГАМК-основной медиатор возбуждения на ранних этапах развития гиппокампа//Успехи физиол. наук. - 1998. - Т.29, N2. - С.55-67.
24. Зефирова А.Л., Халилов И.А. Ионные токи нервного окончания лягушки // Нейрофизиология. - 1985. - Т.17, N 6. - С.771-779.
25. Зефирова А.Л., Халилов И.А. Ионные токи нервного окончания портняжной мышцы лягушки // Нейрофизиология. – 1987. – Т.17. - С.344-349.
26. Зефирова А.Л., Халилов И.А. Особенности электрической активности в различных участках нервного окончания лягушки // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1985. - Т.49, N 1. - С.7-10.
27. Зефирова А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С. Кальциевые и кальцийактивируемые калиевые токи в двигательной нервной терминали лягушки // Нейрофизиология. -1987. - Т. 19, N 4. - С. 525-532.
28. Зефирова А.Л., Халилов И.А., Хамитов Х.С. Кальциевый ток нервного окончания лягушки // ДАН СССР. – 1985. - Т.287, №3. - С.744-746.
29. Зефирова А.Л., Халиуллина Р.Р., Анучин А.А. Эффекты экзогенного оксида азота на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного окончания // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1999.- Т. 128, №8. – С. 144-147.
30. Зефирова А.Л., Черанов С.Ю. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе // Успехи физиол. наук. - 2000. - Т. 31, N 3. - С. 3-22.
31. Зефирова А.Л., Шакирьянова Д.М. Действие экзогенного ацетилхолина на калиевые токи двигательного нервного окончания лягушки // Нейрофизиология. - 1992. - Т.24. N 6. - С.678-683.
32. Зефирова А.Л., Шакирьянова Д.М., Халилов И.А., Никольский Е.Е. Влияние

- экзогенного ацетилхолина на ионные токи двигательного нервного окончания лягушки и мышцы // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1992. - N 8. - С. 124-126.
33. Зефирова А.Л., Шакирьянова Д.М., Черанов С.Ю., Мухамедзянов Р.Д. Пресинаптические механизмы эффектов цинка на нервно-мышечную передачу // Физиол. журн. им. Сеченова. - 1999. - Т. 85, N 5. - С.646-653.
34. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. P2-рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств // М.:Гэотар, 2009. – 136 с.
35. Каламкар Г.Р., Лунгина О.Г. Ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами // Сенсорные системы. - 2001. - Т.15, N 4. - С. 275-287.
36. Каламкар Г.Р., Островский М.А. Молекулярные механизмы зрительной рецепции // М.:Наука, 2002. - 279 с.
37. Камкин А.Г., Киселева И.С., Ярыгин В.Н. Новый тип ионных каналов // Природа. - 2002. - №3. -С.13-20
38. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Медведев М.А. Роль оксида азота во внутриклеточной регуляции гладкомышечных клеток // Вестник СибГМУ. - 2000. – № 1. – С. 7–19.
39. Кирзон М.В., Каменская М.А. Влияние норадреналина на синаптические процессы в скелетной мышце, утомленной раздражениями двигательного нерва // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. - 1969. - N.1. - С. 31-37.
40. Костюк П.Г. Ионы кальция как вторичные посредники в нервной клетке // Журн. эвол. биохимии и физиологии. - 1992. - Т.28, N 2. - С. 150-155.
41. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология: руководство для врачей и биологов. – М: Медицина, 2002. - 637 с.
42. Магазаник Л.Г. Строение и функции центральных и нервно-мышечных синапсов // из кн. Современный курс классической физиологии по ред Ю.В. Наточина и В.А.Ткачукаю – М.:Гэотар-Медиа, 2007. – С.59-99.
43. Магазаник Л.Г, Большаков К.В., Булдакова С.Л. и др. Структурные особенности ионотропных глутаматных рецепторов, выявляемых блокадой каналов // Рос. физиол. журнал им. Сеченова. - 2000. - Т. 86, N 9. - С.1138-1151.
44. Магазаник Л.Г, Тихонов Д.Б., Большаков К.В., Гмиров В.Е., Булдакова С.Л.,

- Самойлова М.В. Исследование строения ионных каналов рецепторов глутамата и механизмов их блокады органическими катионами // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. 2001. Т. 87. С. 1026–1039.
45. Малышев И.Ю., Смирин Б.В., Манухина Е.Б. и др. Гипоксия и оксид азота // Вестник Российской АМН. – 2000. - № 9. – С. 44-48.
46. Матюшкин Д.П. Функциональные клеточные взаимодействия в нервно-мышечном аппарате // Л.: Наука, 1980. - 183 с.
47. Меньшиков Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т.65, № 4. – С. 485-503.
48. Мухамедьяров М.А., Минлебаев М.Г., Зефирова А.Л. Влияние блокаторов потенциалзависимых и кальцийактивируемых калиевых каналов на развитие облегчения нервно-мышечной передачи // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2004. - Т. 137, № 4. - С. 364-368.
49. Наточин Ю.В. Физиология почки // из кн. Современный курс классической физиологии по ред Ю.В. Наточина и В.А.Ткачука – М.:Гэотар-Медиа, 2007. – С. 135-168.
50. Николс Дж. Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу М.:Изд-во научной и учебной лит-ры, 2003. - 672 с.
51. Полетаев Г.И. К механизму действия пирокатехина на функцию мионевральных синапсов в скелетных мышцах лягушек // Физиол. журн. СССР. - 1972. - Т.58, N2. - С. 179-186.
52. Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ванин А.Ф. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестник РАМН. – 2000. - № 4. – С. 11-15.
53. Розенштраух Л.В. Быстрые и медленные потенциалы действия в кардиомиоцитах. Автоматия сердца // из кн. Современный курс классической физиологии по ред Ю.В. Наточина и В.А.Ткачука. – М.:Гэотар-Медиа, 2007. – С. 224-261.
54. Рубцов А.М., Батрукова М.А. Кальциевые каналы (рианодиновые рецепторы) саркоплазматического ретикулума: структура и свойства // Биохимия. - 1997. - Т. 62, № 9. - С. 1091-1105.
55. Ткачук В.А. Рецепция и внутриклеточная сигнализация // из кн.

- Современный курс классической физиологии по ред Ю.В. Наточина и В.А.Ткачука – М.:Гэотар-Медиа, 2007. – С. 325-348
56. Ситдикова Г.Ф., Халилов И.А., Зефирова А.Л. Влияние фенола на ионные токи двигательного нервного окончания лягушки // Физиол. журн. им. Сеченова. - 1996. -Т.82, N 7. - С.78-84.
 57. Солнцева Е.И., Буканова Ю.В., Скребицкий В.Г. Память и калиевые каналы // Успехи физиол. наук.- 2003. - Т. 34, № 4. – С. 16-25.
 58. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образовательный журнал. - 2000. – Т.6, № 12. - С. 27-34.
 59. Уразаев А.Х., Зефирова А.Л. Физиологическая роль оксида азота // Успехи физиол. наук. - 1999. - Т. 30, N1. - С. 54-72.
 60. Халилов И.А., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Влияние пирокатехина на нервно мышечную передачу // Нейрофизиология. - 1993. - Т. 1, N 6. - С.405-408.
 61. Ходоров Б.И. Общая физиология возбудимых мембран // М.: Наука, 1975. - 406 с.
 62. Чайлахян Л.М., Балезина О.П. Электрофизиология возбудимых систем. Потенциал покоя // Элиста : ЗАОр НПП «Джангар», 2009. – 171 с.
 63. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Роль циклических нуклеотидов в реализации эффектов оксида азота (11) на секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания // ДАН. 2002. - Т.382, N 2. - С.1-4.
 64. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф., Зефирова Внутриклеточные пресинаптические механизмы эффектов оксида азота (II) в нервно-мышечном соединении лягушки // Нейрохимия. – 2005. - Т.22, №1. - С. 81-87.
 65. Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф., Герасимова Е.В., Зефирова А.Л. Жирные кислоты модулируют процессы секреции медиатора и функционирования калиевых каналов в двигательном нервном окончании // Нейрохимия. – 2006. - Т. 23, №4. – С. 310-316.
 66. Abbott L.F., Regehr W.G. Synaptic computation //Nature. - 2004. - V.431. - P.796-803
 67. Abdul Ghani M., Meiri H., Rahamimoff R. The action of neuropeptides on trans-

- mitter release at the neuromuscular synapse // *Exp. Brain Res.* - 1991. - V. 515. - P.355–357.
68. Abram S.E. L., Yaksh T.L. Systemic lidocaine blocks nerve injury-induced hyperalgesia and nociceptor-driven spinal sensitization in the rat//*Anesthesiology.* – 1994. – V. 80. - P.383-391.
69. Abramochkin D.V., Kuzmin V.S., Sukhova G.S., Rosenshtraukh L.V. Modulation of rabbit sinoatrial node activation sequence by acetylcholine and isoproterenol investigated with optical mapping technique // *Acta Physiol (Oxf).* – 2009. - V. 196, №4. –P.385-394.
70. Adelman J.P., Shen K.-Z., Kavanaugh M.P. et al. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs // *Neuron.* - 1992. - V.9. - P.209–216.
71. Agre P. Aquaporin Water Channels in Kidney // *J Am Soc Nephrol.* – 2000. – V. 11. – P. 764–777.
72. Agre P., Bonhivers M., Borgnia M.J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems//*J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273, № 24. – P. 14659-62.
73. Aguilar-Bryan L., Clement J.P.I., Gonzalez G. et al. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels // *Physiol. Rev.* - 1998. - V.78. - P. 227-245.
74. Akopian A.N., Chen C.C., Ding Y., Cesare P., Wood J.N. A new member of the acid-sensing ion channel family // *NeuroReport/* - 2000 – V. 11. – P. 2217–2222.
75. Albertson T.E., Walby W.F., Stark L.G., Joy R.M. The effect of propofol on CA1 pyramidal cell excitability and GABA_A mediated inhibition in the rat hippocampal slice // *Life Sci.* - 1996. - V.58. - P. 2397–2407.
76. Anderson A.J., Harvey A.L. Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity//*Br. J. Pharmacol.* – 1988. – V.93, № 1. – P. 215-219.
77. Angaut-Petit D., Benoit E., Mallart A. Membrane currents in lizard motor nerve terminals and nodes of Ranvier // *Pfluegers Arch.* – 1989. - V.415. - P.81-87.
78. Armstrong C.M. Sodium channels and gating currents // *Physiol Rev.* - 1981. - V.61. - P. 644-683.
79. Armstrong C.M., Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability// *Neuron.* – 1998. - V. 20, № 3. – P. 371-380.

80. Atchinson W.D., Luke V.S., Narahashi T., Vogel S.M. Nerve membrane sodium channels as the target site of brevetoxins at neuromuscular junctions // *Br. J. Pharmacol.* -1986. -V.89. - P.731–738.
81. Atkinson N. S., Robertson G. A., Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus // *Science.* - 1991. - V.253. -P.551–555.
82. Augustine G.J. How does calcium trigger neurotransmitter release?//*Curr. Opin. Neurobiol.* – 2001. – V. 11. - P. 320-326.
83. Augustine G.J., Adler E.M., Charlton M.P. The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals // *Ann N Y Acad Sci.* – 1991. – V. 635. – P. 365-381.
84. Avanzini G, Franceschetti S, Avoni P, Liguori R. Molecular biology of channelopathies: impact on diagnosis and treatment // *Expert Rev Neurother.* – 2004. – V. 4, № 3. – P. 519-539.
85. Babenko A.P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. A view of SUR/KIR6.X, K_{ATP} channels // *Annu Rev Physiol.* - 1998. - V. 60. - P. 667-687.
86. Barnes M., Hales T.G., Lummis S.C.R., Peters J.A. The 5-HT₃ receptor – the relationship between structure and function// *Neuropharmacology.* – 2009. – V. 56. – P. 273–284.
87. Bartschat D.K., Blaustein M.P. Calcium-activated potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain // *J. Physiol. (Lond.).* - 1985. - V.361. - P. 41–457.
88. Baukowitz T., Fakler B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids // *Eur. J. Biochem.* - 2000. - V. 267. - P. 5842-5848.
89. Becerril B., Corona M., Coronas F.I. et al. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus* // *Biochem. J.* - 1996. - V. 313. - P.753–760.
90. Becker C.M. Glycine receptors: molecular heterogeneity and implication for disease // *Neuroscientist.* - 1995. - V. 1. - P. 130-141.
91. Becker P.E. Zur Frage der Heterogenie der erblichen Myotonien. // *Nervenarzt.* - 1957. -V. 28. - P. 455-460.
92. Bennet J.A., Dingledine R. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop // *Neu-*

- ron. - 1995. - V.14. - P.373–384.
93. Bennet M.R., Ho S. Adenosine modulation of potassium currents in preganglionic nerve terminals of avian ciliary ganglia // *Neurosci. Lett.* - 1992. - V. 137. - P. 41–44.
 94. Bennett P.B., Yazawa K., Makita N., George A.L. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia // *Nature.* - 1995. - V. 376. - P. 683-685.
 95. Benoit E., Juzans P., Legrand A.M., Molgo J. Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers // *Neuroscience.* - 1996. - V. 71. - P. 1121–1131.
 96. Benoit P.R., Mambrini J. Modification of transmitter release by ions which prolong the presynaptic action potential // *J.Physiol.* – 1970. – v.210. – P.681-695.
 97. Beress L., Beress R., Wunderer G. Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata* // *FEBS Lett.* - 1975. - V.50. - P. 311–314.
 98. Betz H. Ligand gated ion channels in the brain // *Neuron.* - 1990. - V.5. - P.383–392.
 99. Beutner D.T., Voets E., Neher T., Moser F. Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse // *Neuron.* – 2001. – V. 29. – P. 681-690.
 100. Bevan S., Yeats J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurons // *J. Physiol.* – 1991. – V. 433. – P. 145-161.
 101. Bezprovanny I., Scheller R.H., Tsien R.W. Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels // *Nature.* – 1995. - V.378. - 623–626.
 102. Biel M., Schneider A., Wahl C. Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2002. – V. 12, №5. – P.206-212.
 103. Bielefeldt K., Jackson M. B. A calcium-activated potassium channel causes frequency-dependent action-potential failures in a mammalian nerve terminal // *J. Neurophysiol.* - 1993. - V.70. - P.284–298.
 104. Bielefeldt K., Jackson M. B. Phosphorylation and dephosphorylation modulate a Ca^{2+} -activated K^+ channel in rat peptidergic nerve terminals // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1994. - V. 475. - P. 241–254.
 105. Bielefeldt K., Rotter J.L., Jackson M.B. Three potassium channels in rat poste-

- rior pituitary nerve terminals // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. - V.458. - P.41–67.
106. Bindakas V.P., Vehema V.J., Adams M.E. Differential antagonism of transmitter release by subtypes of omega-agatoxins // *J. Neurophysiol.* - 1991. - V. 66. - P. 590–601.
107. Black J.A., Sulayman D., Theodore R.C. et al. Sodium channels as therapeutic targets in neuropathic pain//In: *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment*. Hanson P.T., Fields H.L., Hill R.G., Marchettini P. (Eds) JASP Press. - 2001. - P. 19-36.
108. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path//*J. Physiol.* - 1973. – V.232, № 2. - P.331–356.
109. Boehning D., Snyder S.H. Novel neural modulators//*Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 26. – P. 105-131.
110. Bollmann J., Sakmann B., Borst J. Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal // *Science*. – 2000. – V. 289. - P. 953-957.
111. Bolotina V.M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // *Nature*. - 1994. – V. 368. –P. 850–853.
112. Bormann J., Feigenspan A. GABA_C receptors//*Trends Neurosci.* 1995. V.18: P. 515–519.
113. Bormann J., Hamill O. P., Sakmann B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1987. - V. 385. - P.243–286.
114. Boron W.F., Boulpaep E.L. *Medical physiology*. - 2003. - Elsevier Science (USA). – 1319 p.
115. Borst J. G., Sakmann B. Calcium current during a single action potential in a large presynaptic terminal of the rat brainstem// *J. Physiol.* – 1998. –V. 513. - P. 149-155.
116. Bossu J.L., Feltz A., Thomamm J.M. Depolarization elicits two distinct calcium current in vertebrate sensory neurons//*Pfluegers Arch.* -1985. - V.403. - P.360-368.
117. Boue Grabot E., Dufy B., Garret M. Molecular diversity of GABA-gated chloride channels in the rat anterior pituitary // *Brain Res.* - 1995. - V.704. - P.125–

- 129.
118. Bourque C.W., Oliet S.H. Osmoreceptors in the central nervous system // *Annu. Rev. Physiol.* - 1997. - V. 59. - P.601–619.
119. Brigant J.L., Mallart A. Presynaptic currents in mouse motor endings//*J. Physiol. (Lond.)*. – 1982. - V.333. - P.619-636.
120. Brown C.D.A., Dudley A.J. Chloride channel blockers decrease intracellular pH in cultured renal epithelial LLC PK1 cells// *Br. J. Pharmacol.* - 1996. - V. 118. – P.443–444.
121. Brown H.F., DiFrancesco D., Noble S.J. How does adrenaline accelerate the heart? // *Nature*. - 1979. - V.280. - P.235-236.
122. Browning M.D., Bureau M., Dudek E.M., Olsen R.W. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase phosphorylate the beta subunit of the purified gamma-aminobutyric acid A receptor// *Proc. Natl.Acad. Sci.USA*. - 1990. - V.87. - P.1315–1318.
123. Bu G., Adams H., Berbari E.J., Rubart M. Uniform action potential repolarization within the sarcolemma of in situ ventricular cardiomyocytes // *Biophys. J.* - 2009. – V. **96**, №6. – P.2532–2546.
124. Burch L.H., Talbot C.R., Knowles M.R. et al. Relative expression of the human epithelial Na⁺ channel subunits in normal and cystic fibrosis airways // *Am J Physiol.* - 1995. - V. 269. - P. 511-518.
125. Burgess D.L., Korman D.C., Galt J. et al. Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in mouse mutant ‘motor endplate disease’//*Nat.Genet.* - 1995. - V.10. - P.461-465.
126. Burgess G.M., Mullaney I., McNeill M. et al. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture// *J. Neurosci.* – 1989. – V. 9. - 3314-3325.
127. Butler A., Tsunoda S., Mccobb D. P., Wei A. et al. mSLO, a complex mouse gene encoding “maxi” calcium-activated potassium channels // *Science*. - 1993. - V.261. - P.221–224.
128. Carvalho C. M., Ferreira I. L., Duarte C. B. et al. Relation of [Ca²⁺]_i to dopamine release in striatal synaptosomes: role of Ca²⁺ channels //*Brain Res.* - 1995. - V.669. - P. 234–244.
129. Catterall W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and

- function of voltage-gated sodium channels // *Neuron*. - 2000. - V.36. - P. 13-25
130. Catterall W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1980. - V.20. - P.15–43.
131. Catterall W.A. Cooperative activation of action potential Na^+ ionophore by neurotoxins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1975. - V.72. - P.1782–1786.
132. Catterall W.A., Dib-Hajj S., Meisler M.H., Pietrobon D. Inherited Neuronal Ion Channelopathies: New Windows on Complex Neurological Diseases // *J. Neuroscience*. – 2008. - V.28, №46. – P.11768 –11777.
133. Catterall W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2000. - V. 16. - P. 521-555.
134. Ceccarelli B., Gronovaz F., Hurlbut W.P. Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. I. Effects of black widow spider venom and Ca^{2+} -free solutions on the structure of the active zone//*J. Cell Biol.* - 1979. –V.81, №1. P.163-77 a.
135. Ceccarelli B., Gronovaz F., Hurlbut W.P. Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. II. Effects of electrical stimulation and high potassium // *J. Cell Biol.* – 1979. – V.81, №1. – P. 178-192 б.
136. Ceccarelli B., Hurlbut W.P., Mauro A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction // *J. Cell Biol.* – 1973. - V. 57. - P. 499-524.
137. Celasco G.G. Disorders of membrane channels or channelopathies // *Clin. Neurophysiol.* – 2001. –V. 112. – P. 2-18.
138. Cestele S., Catterall W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels // *Biochimie*. - 2000. - V. 82, № 9-10. - P. 883-892.
139. Chabal C., Jacobson L., Mariano A. et al. The use of oral mexiletine for the treatment of pain after peripheral nerve injury // *Anesthesiology*. – 1992. – V. 76. - 513-517.
140. Chad J.E., Eckert R. Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of Ca -dependent responses // *Biophys J.* – 1984. – V. 45:- P. 993-999.
141. Chandy K.G., Gutman G.A. Voltage-gated K channel genes. In *Handbook of*

- receptors and channels. Ligand- and voltage-gated ion channels, edited by Alan North. // Boca Raton. - Fl:CRC. - 1995. - P. 1-71.
142. Chang S.S., Grunder S., Hanukoglu A. et al. Mutations in subunits of epithelia sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1 // *Nature Genet.* - 1996. - V. 12. - P.248-253.
 143. Chen C.C., England S., Akopian A.N., Wood J.N. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1998. – V. 95. – P. 10240–10245.
 144. Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D. et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation // *Nature* . - 1988. - V.392. - P. 293-295.
 145. Chen Z.P., Levy A., Lightman S.L. Nucleotides as extracellular signalling molecules // *J. Neuroendocrinol.* - 1995. - V.7. - P. 83–96.
 146. Chung J.M., Dib-Hajj S.D., Lawson S.N. Sodium channel subtypes and neuropathic pain // *In Progress in Pain research and Management.* – 2003. - JASP Press, Seattle. – P. 99-114.
 147. Clark S.L., Luton F.H., Cutler J.T. A form of congenital myotonia in goats // *J. Nerv. Ment. Dis.* - 1939. - V.90. - P.297-309.
 148. Clarke P.B., Reuben M. Release of [³H] noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [³H] dopamine release // *Br. J. Pharmacol.* -1996. - V.117. - P.595–606.
 149. Cohen M. W., Jones O.T., Angelides K.J. Distribution of Ca²⁺ channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin // *J. Neurosci.* – 1991. – V. 11, №4. – P.1032-1039.
 150. Cole K. S. The Advance of Electrical Models for Cells and Axons"Arma virumque cano"//*Biophys. J.* – 1955. - V.2, Issue 2. – P.101-119.
 151. Connor J.A., Stevens C.F. Voltage clamp studies of transient outward membrane current in gastropod neural somata // *J. Physiol. (Lond.).* - 1971. - V. 213. - P.21–30.
 152. Cook SP. et al. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons // *Nature.* – 1997. – V. 387, № 6632. – P.505-508.
 153. Cooper E., Couturier S., Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal acetylcholine receptor // *Nature.* - 1991. - V.350. -

P.235–238.

154. Correia De Sa. P., Ribeiro J.A. Potentiation by tonic A_{2a}-adenosine receptor activation of CGRP-facilitated [³H]-ACh release from rat motor nerve endings // Br. J. Pharmacol. - 1994. - V.111. - P.582–588.
155. Costa M.R., Catterall W.A Phosphorylation of the of alpha-subunit of the of the sodium channel by protein kinase C // Cell Mol. Neurobiol. - 1984. - V. 4. - P. 291-297 a.
156. Costa M.R., Catterall W.A. Cyclic AMP-dependent phosphorilation of alpha-subunit of the of the sodium channel in synaptic nerve ending particles // J. Biol. Chem. - 1984. - V. 259. - P. 8210-8218.6
157. Couteaux D.E.M., Pecot-Dechavassine M. Vesicules synaptiques et poches au niveau des «zones actives» de la jonction neuromusculaire // C. R. Acad. Sci. Paris. - 1970. - V. 74. - P. 411-416.
158. Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C.F. Synapses // The John Hopkins University Press: Baltimore and London. - 2000. - 767 p.
159. Crespi D., Gobbi M., Mennini T. 5-HT₃ serotonin receptors inhibit [³H] acetylcholine release in rat cortical synaptosomes // Pharmacol. Res. - 1997. - V.35. - P.351–354.
160. Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M. et al. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels // J. Biol. Chem. - 1985. - V.260. - P. 9280–9288.
161. Cruz L.J., Johnson D.S., Olivera B.M., Characterization of the omega-conotoxin target. Evidence for tissue-specific heterogeneity in calcium channel types // Biochemistry. – 1987. – V.26, №3 – P. 820-824.
162. Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Black J.A. et al. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in small primary sensory neurons // J. Neurosci. – 1999. - V.19. - RCA 43.
163. Cummins T.R., Waxman S.G. Low regulation of tetrodotoxin-resistance sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury//J. Neurosci. – 1997. - V. 17. - P.3503-3514.
164. Daut J. Modulation of the excitatory synaptic response by fast transient K⁺ current in snail neurons // Nature New Biol. - 1973. - V. 246. - P. 193–196.

165. Davies N.P, Hanna M.G. The skeletal muscle channelopathies: basic science, clinical genetics and treatment // *Curr Opin Neurol.* – 2001. – V.14, № 5. – P. 539-551.
166. De Blasi M., Hartmann H.A., Drewe J.A. et al. Inactivation determined by a single site in K⁺ pores // *Pflugers Arch.* - 1993. - V. 422. - P.354-363.
167. De Camilli P., Haucke V., Takei K., Mugnaini E. The structure of synapses / *Synapses.* - Baltimore, 2001. - P. 89–133.
168. De Sarno P., Giacobini E. Modulation of acetylcholine release by nicotinic receptors in the rat brain // *J. Neurosci. Res.* - 1989. - V. 22. - P. 194–200.
169. Deist M., Repp H., Dreyer F. Sulfonylurea-sensitive K⁺ channels and their probable role for membrane potential of mouse motor nerve endings // *Pflugers Arch.* - 1992. - V.421. - P. 292–294.
170. Del Castillo J., Katz B. Quantal components of the end-plate potential // *J. Physiol.* – 1954. –V. 124, №3. – P. 560-573.
171. Denac H., Mevissen M., Scholtysik G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* - 2000. - V. 362. - P. 453-479.
172. Devidas S., Guggina W.B. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP // *Curr Opin. Cell. Biol.* - 1997. - V. 9. - P. 547-552.
173. Devor M., Wall P.D., Catalan W. Systemic lidocaine silence ectopic neuronal and DRG discharge without blocking nerve conduction // *Pain.* – 1992. – V.48. - 261-268.
174. DiGregorio D.A., Peskoff A., Vergara J. L. Measurement of Action Potential-Induced Presynaptic Calcium Domains at a Cultured Neuromuscular Junction // *J. Neurosci.* – 1999. - V.19. – P.7846–7859.
175. DiFrancesco D. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibers // *J. Physiol.* - 1981. - V.314. - P.377-393.
176. Dodge F.A., Frakenhaeuser B. Sodium currents in the myelinated nerve fibre of *Xenopus laevis* investigated with the voltage clamp technique // *J.Physiol.* – 1959. – V. 148. – P.188-200.
177. Dolphin A. C. The G. L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins // *Exp. Physiol.* - 1995. - V. 80. -P. 1–36.

178. Dong C. J., Werblin F. S. Dopamine modulation of GABA-C receptor function in an isolated retinal neuron // *J. Neurophysiol.* - 1994. - V.71. - P. 1258–1260.
179. Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A. et al. The structure of the potassium channel:molecular basis of K⁺ conduction and selectivity // *Science.* – 1998. - V.280. – P. 69-77.
180. Drapeau P., Nachshen D. A. Effects of lowering extra-cellular and cytosolic pH on calcium fluxes, cytosolic calcium levels, and transmitter release in presynaptic nerve terminals isolated from rat brain // *J. Gen. Physiol.* - 1988. - V. 91. - P. 305–315.
181. Dreyer F., Penner B. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals // *J. Physiol. (Lond.).* - 1987. - V. 386. - P. 455–463.
182. Dreyer F., Peper K., Akert K., Sandri C., Moor H. Ultrastructure of the «active zone» in the frog neuromuscular junction // *Brain Res.* - 1973. - V. 62. - P. 373-380.
183. Duarte C. B., Ferreira I. L., Carvalho A. P., Carvalho C. M. Relation of exocytotic release of gamma-aminobutyric acid to Ca²⁺ entry through Ca²⁺ channels or by reversal of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in synaptosomes // *Pflugers Arch.* - 1993. - V. 423. - P.314–323.
184. Dudel J., Kuffler W. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction // *J. Physiol. (Lond.).* - 1961. - V. 155. - P. 542–562.
185. Dworakowska B., Dolowy K. Ion channels-related diseases // *Acta Biochim. Pol.* - 2000. - V. 47, №. 3. - P. 685-703.
186. Dzoljic M., Erdmann W., Dzoljic M. R. Visual evoked potentials and nitric oxide-induced neuronal depression: role for benzodiazepine receptors // *Br. J. Anaesth.* - 1996. - V. 77. - P. 522–525.
187. Eccles J. C. The physiology of synapses // Springer-Verlag Berlin Gottingen. – 1963. - 396 p.
188. Edry-Schiller J., Ginsburg S., Rahamimoff R. Chloride channels in isolated fused synaptosomes from Torpedo electric organ // *J. Physiol. (Lond.).* - 1991. - V. 438. - P. 627–647.
189. Edry-Schiller J., Rahamimoff R. Activation and inactivation of the bursting

- potassium channel from fused Torpedo synaptosomes // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. - V. 471. - P. 659–678.
190. Edwards G., Weston A.H. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels // *Anne. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1993. - V. 33. - P. 597-637.
191. Ehrlich B., Kaftan E., Besprozvannaja S., Besprozvanniy I. The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels // *TIPS*. - 1994. - V. 15. - P. 145-149.
192. Eliot L. S., Kandel E. R., Siegelbaum S. A., Blumenfeld H. Imaging terminals of *Aplysia* sensory neurons demonstrates role of enhanced Ca^{2+} influx in presynaptic facilitation // *Nature*. - 1993. - V. 361. - P. 634–637.
193. Elkins T., Ganetzky B., Wu C.-F. A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1986. - V. 83. - P. 8415–8419.
194. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release // *Neuron*. - 2001. - V. 29. - P.197-208.
195. Engblom A. C., Eriksson K. S., Akerman K. E. Glycine and GABA_A receptor-mediated chloride fluxes in synaptoneuroosomes from different parts of the rat brain // *Brain Res.* - 1996. - V. 712. - P.74–83.
196. Engel A.G., Ohno K., Sine S.M. Congenital Myasthenic Syndromes // *Arch Neurol.* – 1999. –V. 56. – P. 163-167.
197. Enz R., Branstatter J. H., Wassle H., Bormann J. Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor rho subunits in the mammalian retina // *J. Neurosci.* - 1996. - V.16. - P. 4479–4490.
198. Fahlke C. Ion permeability and selectivity in ClC0 type chloride channels // *Am. J. Renal Physiol.* - 2001. - V. 280. - P. 748-757.
199. Fakler B., Schultz J.H., Yang J. et al. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH // *EMBO J.* - 1996. - V.15. - P.4093-4099.
200. Farinas I., Solona C., Marsal J. Omega-conotoxin differentially blocks acetylcholine and adenosine triphosphate releases from Torpedo synaptosomes // *Neuroscience.* - 1992. -V. 47. - P. 641–648.
201. Farley J., Rudy B. Multiple types of voltage-dependent Ca^{2+} -activated K^+ channels of large conductance in rat brain synaptosomal membranes // *Biophys.*

- J. - 1988. - V.53. - P. 919–934.
202. Fatt P, Katz. B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode // *J. Physiol.* – 1951. - V. 115. – P. 320-370.
203. Fatt P., Katz B. Some observations on biological noise // *Nature.* – 1950. - V. 166. - P. 597-598.
204. Fatt P., Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1952. - V. 117. - P.109–128.
205. Felix R. Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders // *J. Med Genet.* - 2000. - V. 37, №10. - P. 729-740.
206. Finch E.A., Turner T.J., Goldin S.M. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release // *Science.* - 1991. - V. 252. - P.443–446.
207. Finger W., Martin C. Presynaptic effect of gamma-aminobutyric acid on the inhibitory nerve and nerve terminals in the crayfish neuromuscular junction // *Neurosci. Lett.* - 1989. - V.97. - P.129–134.
208. Fisher S.A., Fischer T.M., Carew T.J. Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement // *Trends Neurosci.* – 1997. – V. 20. – P. 170-177.
209. Fleidervish I. A., Gutnick M. J. Kinetics of slow inactivation of persistent sodium current in layer V neurons of mouse neocortical slices // *J. Neurophysiol.* - 1996. - V.76. - P. 2125–2130.
210. Forsythe I. D. Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1994. - V. 479. - P.381–387.
211. Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels // *Physiol. Rev.* - 2007. – V.87. – P. 593–658.
212. Fossier P., Baux G., Poulan B., Tauc L. Receptor-mediated presynaptic facilitation of quantal release of acetylcholine induced by pralidoxime in *Aplysia* // *Cell. Mol. Neurobiol.* 1990. V.10. P. 383–404.
213. Franke C., Laizzo P.A., Hatt H. et al. Altered Na channel activity and reduced Cl conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker) // *Muscle Nerve.* - 1997. - V. 14. - P. 762-729.
214. Furman R.E., Barehi P.L. 20,25-diazacholesterol myotonia: an electrophysiological study // *Ann. Neurol.* – 1981. – V. 10. – P.251-260.

215. Gargus J.J. Ion Channel Functional Candidate Genes in Multigenic Neuropsychiatric Disease // *Biol. Psychiatry*. – 2006. – V.60. – P.177–185.
216. Gargus J.J. Unraveling monogenic channelopathies and their implication for complex polygenic disease // *Am. J. Hum Genet.* - 2003. - V. 72. - P.785-803.
217. Garthwaite J. Concepts of neuronal nitric oxide-mediated transmission // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. -V. 27. – P. 2783-2802
218. Gaudry Talarmain Y.M. The effect of lactate on acetylcholine release evoked by various stimuli from Torpedo synaptosomes // *Eur. J. Pharmacol.* - 1986. - V. 129. - P. 235–243.
219. Gilbertson T.A. et al. Proton currents through amiloride-sensitive Na-channels in hamster taste cells. Role in acid transduction // *J.Gen.Physiol.* – 1992. – V.100. – P. 803-824.
220. Giniatullin R.A., Sokolova E.M. ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors // *Br. J. Pharmacol.* - 1998. – vol. 124. – pp. 839-844.
221. Golard A., Witkovsky P., Tranchina D. Membrane currents of horizontal cells isolated from turtle retina // *J. Neurophysiol.* - 1992. - V. 68. - P. 351–361.
222. Goldstein S.A.N., Bockenbauer D., O’Kelly I., Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits // *Nature Rev. Neurosci.* - 2001. - V.2. - P.175-184.
223. Graves T.D., Hanna M.G. Neurological channelopathies // *Postgrad Med J.* – 2005. – V. 81. – P. 20-32.
224. Greenamyre J.T., Porter R.H. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS // *Neurology.* - 1994. - V.44. - P. 7-13.
225. Grippo L., Grippo T. Channelopathies in neurology // *Rev. Neurol.* – 2001. - V.33, N 7. - P. 643-647.
226. Grossman Y., Colton J. S., Gilman S. C. Interaction of Ca-channel blockers and high pressure at the crustacean neuromuscular junction // *Neurosci. Lett.* - 1991. - V. 125. - P. 53–56.
227. Gundersen C.B., Katz B., Miledi R. The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1982. - V.216. - P.369-376.
228. Gyermek L. 5-HT₃ receptors: pharmacologic and therapeutic aspects // *J. Clin.*

- Pharmacol. - 1997. - V. 35. - P. 845–855.
229. Hamill O.P. Twenty odd years of stretch-sensitive channels // *Pflügers Arch. - Eur J Physiol.* – 2006. – V. 453. – P.333–351.
230. Hamill O.P., Martinac B. Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells // *Physiol. Rev.* – 2001. - V. 81, N. 2. – P. 685-740.
231. Hamilton B.R., Smith D.O. Autoreceptor-mediated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in the rat // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1991. - V.432. - P.327–341.
232. Hamilton B.R., Smith D.O. Calcium currents in rat motor nerve terminals // *Brain Res.* - 1992. - V. 584. - P.123–131.
233. Harlow M.L., Ress D., Stoschek A., Marshall R.M., McMahan U.J. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction // *Nature.* – 2001.- V. 409, № 6819. – P. 479-484.
234. Heck G.L., Mierson S., DeSimone J.A. Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway // *Science.* – 1984. – V. 223. – P. 403-405.
235. Heidelberg R., Matthews G. Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. - V. 447. - P. 235–256.
236. Hennig R., Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats // *Nature.* – 1985. - V. 314, N 6007. - P. 164-166.
237. Henzi V., MacDermott A.B. Characteristics and function of Ca^{2+} and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons // *Neurosci.* - 1992. - V. 46. - P. 251-274.
238. Heuser J. E. Review of electron microscopic evidence favoring vesicle exocytosis as the structural basis of quantal release during synaptic transmission // *J. Exp. Physiol.* -1989. - V.74. - P.1051-1069.
239. Heuser J.E., Reese T.S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction // *J. Cell Biology.* – 1973. - V. 57. - P. 315-344.
240. Heuser J.E., Reese T.S. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction // *J. Cell Biol.* – 1981. – V. 88, №3. –P. 564-580.
241. Heuser J.E., Reese T.S., Landis D.M., Functional changes in frog neuromuscu-

- lar junctions studied with freeze-fracture // *J. Neurocytol.* – 1974. –V. 3, №1. P.109-131.
242. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes* // 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer. - 2001. – 814 p.
243. Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors // *Trends Neurosci.* - 1994. - V. 17. - P. 531–536.
244. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1952. - V. 117. - P. 500–544 б.
245. Hodgkin A.L., Huxley A.F. Resting and action potentials in single nerve fibres // *J. Physiol.* – 1945. – V.104, №2. – P.176-195.
246. Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* – 1952. – V. 116, №4. – P.424-448.
247. Hodgkin, A. L., Huxley A. F. The components of conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1952. -V.116. - P. 473–496 a.
248. Hoffmann E.K., Simonsen L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells // *Physiol. Rev.* - 1989. - V.69. - P.315–382.
249. Hofmann E. K., Dunham P. B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation // *Int. Rev. Cytol.* - 1995. - V. 161. - P.173–262.
250. Holz G.G.T., Kream R.M., Spiegel A., Dunlap K.G proteins couple alpha-adrenergic and GABA_B receptors to inhibition of peptide secretion from peripheral sensory neurons // *J. Neurosci.*- 1989. - V. 9. - P. 657–666.
251. Hong S.J., Chang C.C. Use of geographutoxin II (mu-conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse // *Br. J. Pharmacol.* – 1989. – V.97, № 3. – P. 934-40.
252. Hong S.J., Lee S. H., Chang C.C. Physiological and regenerative acetylcholine release from motor nerve: differential inhibitions by vesamicol and omega-agatoxin IVA // *Neuroscience.* - 1995. - V.67. - P.169–175.
253. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation // *Science.* - 1990. - V. 250. - P. 533-538.
254. Hsu S.F., Augustine G.J., Jackson M.B. Adaptation of Ca²⁺-triggered exocy-

- toxis in presynaptic terminals // *Neuron*. – 1996. - V.17. - P. 501-512.
255. Hubner C., Stein V., Hetrmanns-Borgmeyer I., Meyer T. et al. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl-cotransport already in early synaptic inhibition // *Neuron*. -2001. – V. 30. – P. 515–524.
256. Hudspeth A.J. How the ear's works work // *Nature*. – 1989. – V.342. – P.397-404.
257. Hudspeth A.J. How hearing happens // *Neuron*. - 1997. – V.19, №5. –P. 947-950.
258. Huser J., Blatter L.A., Lipsius S.L. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells // *J. Physiol*. – 2000. – V.524. – P.415–422.
259. Hussy N. Calcium-activated chloride channels in cultured embryonic *Xenopus* spinal neurons // *J. Neurophysiol*. - 1992. - V.68. - P. 2042–2050.
260. Ikeda S.R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits // *Nature*. - 1996. - V. 380. - P. 255–258.
261. Ingber D.E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction // *Annu. Rev. Physiol*. - 1997. - V. 59. - P. 575–599.
262. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuty T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane // *Nature*. - 1991. - V. 352. - P. 244-247.
263. Iversen L.L., Kravitz E A., Otsuka M. Release of gamma-aminobutyric acid (GABA) from lobster inhibitory neurones (Abstract) // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1967. - V. 188. - P. 21-22.
264. Jackel C., Krenz W.D., Nagy F.A receptor with GABA_C-like pharmacology in invertebrate neurones in culture // *Neuroreport*. - 1994. - V.5. - P.1097–1101.
265. Jackson M. B. Presynaptic excitability // *Int. Rev. Neurobiol*. - 1995. - V.38. - P. 201–251.
266. Jackson M.B., Konnerth A., Augustine G.J. Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1991. - V. 88. - P.380-384.
267. Jackson M.B., Yakel J.L. The 5-HT₃ receptor channel // *Annu. Rev. Physiol*. - 1995. -V.57. - P. 447–468.
268. Jaffe E. H., Hernandez N. Release of [³H]dopamine from rat prefrontal cortex: modulation through presynaptic cholinergic heteroreceptors // *Neurosci. Lett*. -

1989. -V.105. - P. 189–194.
269. Jan L.Y., Jan Y.N. Potassium channels and their evolving gates // *Nature*. - 1994. - V. 371. - P. 119–122.
270. Jan L.Y., Jan Y.N. Tracing the roots of ion channels // *Cell*. - 1992. - V. 69. - P.715–718.
271. Jansson S.E., Albuquerque E.X., Daly J. The pharmacology of batrachotoxin. VI. Effects on the mammalian motor nerve terminal // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1974. - V.189. - P. 525–537.
272. Jenkinson D.H. Potassium channels – multiplicity and challenges // *Br. J. Pharmacol.* - 2006. - V.147. P. 63–71.
273. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. A. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels // *Physiol. Rev.* - 2002. - V. 82. - P. 503–568.
274. Jentsch T.J., Steinmeyer K., Pusch M., Schwappach S. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family // *J. Physiol. (Lond)*. - 1995. - V. 482. - P.19-25.
275. Jentsch T.J., Steinmeyer K., Schwarz G. Primary structure of *Torpedo maeomorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes* // *Nature*. - 1990. - V. 348. - P. 510-514.
276. Jiang Y., Lee A., Chen J. et al. X-ray structure of a voltage-dependent Kv channel // *Nature*. – 2003. – V. 423, № 6935. – P. 33-41.
277. Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel// *Nature*. – 2003. – V. 423, № 6935. – P. 42-48.
278. Johnston G.A.R., Curtis D.R., Beart P.M et al. Cis and trans-4-amino-crotonic acid as GABA analogues of restricted conformation // *J. Neurochem.* - 1975. - V.24. - P. 157–160.
279. Julius D., Basbaum A. Molecular mechanisms of nociception // *Nature*. – 2001. – V. 413. - P. 203-210.
280. Jurkat-Rott K., Lehmann-Horn F. Human muscle voltage-gated ion channels and hereditary disease // *Curr. Opin. Pharmacol.* - 2001. - V. 1, № 3. - P. 280-287.
281. Kalinina N.I., Kurchavyi G.G., Amakhin D.V., Veselkin N.P. Differences in the

- activation of inhibitory motoneuron receptors in the frog *Rana ridibunda* by GABA and glycine and their interaction // *Neurosci Behav Physiol.* – 2009. – V.39, № 8. – P. 775-783/
282. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. *Principals of neural science* // The McGraw-Hill Companies. - 2002. - 1321 p.
283. Kasai H., Kameyam D., Yamaguchi K., Fukuda J. Single transient K channels in mammalian sensory neurons // *Biophys. J.* - 1986. - V. 49. - P.1243–1247.
284. Katz B, Miledi R. Released of acetylcholine from nerve terminal by electric pulses of variable strength and duration // *Nature.* – 1965. – V. 207. - P. 1097-1098 a.
285. Katz B. Quantal Mechanism of Neural Transmitter Release // *Science.* – 1971.- V. 173, № 3992. - P. 123-126.
286. Katz B., Miledi R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses // *J. Physiol. (Lond.).* - 1967. - V. 192. - P. 407–436 a.
287. Katz B., Miledi R. Propagating of electric activity in motor nerve terminal // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 1965. - V.161. - P.453-483 б.
288. Katz B., Miledi R. Tetrodotoxin and neuromuscular transmission // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 1967. - V. 167. - P. 8–22 б.
289. Katz B., Miledi R. The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 1967. - V. 167. - P. 23–38 б.
290. Katz B., Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation // *J. Physiol.* – 1968. – V. 195, N 2. – P. 481-492.
291. Katzuki H., Okuda S. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance // *Prog. Neurobiol.* – 1995. - V.46. – P. 607-636.
292. Kaznacheeva E.V., Zubov A., Gusev K. et al. Activation of calcium entry in human carcinoma A 431 cells by calcium store depletion and phospholipase C-dependent mechanism converge on I_{CRAC} – like calcium channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2001. - V. 98, N 1. - P. 148-153.
293. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C. et al. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2x receptors and their subunits // *Pharmacol Rev.* – 2001. – V.53. – P. 107-118.
294. Kilic G., Stolpe A., Lindau M. A slowly activating voltage-dependent K^+ current in rat pituitary nerve terminals // *J. Physiol. (Lond.).* - 1996. - V. 497. - P.

711–725.

295. Kirk I.P., Richardson P.J. Inhibition of striatal GABA release by the adenosine A_{2a} receptor is not mediated by increases in cyclic AMP // *J. Neurochem.* - 1995. - V. 64. - P. 2801–2809.
296. Kiselev K., Muallem S. Fatty acids, diacylglycerol, Ins(12,3,5)p₃ receptors and Ca²⁺-influx // *TINS.* - 1999. - V. 22, № 8. - P. 334-337
297. Klein M., Camardo J., Kandel E.R. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1982. - V.79. - P. 5713–5717.
298. Kleopa J.A., Barchi R.L. Genetic disorders of neuromuscular ion channels // *Muscle&Nerve.* - 2002. - V. 9. - P. 299-325
299. Konishi T. Electrical excitability of motor nerve terminals in the mouse // *J. Physiol.* – 1985. – V. 366. - P. 411-421.
300. Konishi T., Sears T.A. Electrical activity of mouse motor nerve terminals // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 1984. - V. 222. - P.115–120.
301. Kraus-Friedmann N. Cyclic nucleotide-gated channels in non-sensory organs // *Cell Calcium.* - 2000. - V.27, N 3. - P.127-138.
302. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? // *Trends Neurosci.* -2003. – V. 26. – P.477– 483.
303. Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. A receptor for protons in the nerve cell membrane // *Neuroscience.* – 1980. – V. 5. – P.2325–2327.
304. Kubo Y., Reuveny E., Slesinger P.A. et al. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel // *Nature* - 1993. - V.364. -P. 802-806.
305. Kuffler SW, Yoshikami D. The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse // *J. Physiol.* – 1975. – V.251, №2. – P. 465-482.
306. Kulmann D.M., Hanna M.G. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutation // *The Lancet Neurology.* – 2002. - V.1. - P. 157-166.
307. Kwiecinski H., Lehmann-Horn F., Rudel R. Drug-induced myotonia in human intercostal muscle // *Muscle & Nerve.* – 1988. - V. 11. - P. 576-581.
308. Lando L., Zucker R.S. Ca²⁺ cooperativity in neurosecretion measured using photolabile Ca²⁺ chelators // *J. Neurophysiol.* - 1994. – V. 72. – P. 825-830.

309. Lawson K. Is there a role for potassium channel openers in neuronal ion channel disorders // *Exp. Opin. Invest. Drugs*. - 2000. - V.9, N 10. - P. 1-11.
310. Lazdunski M. Apamin, a neurotoxin specific for one class of Ca^{2+} -dependent K^+ channels // *Cell Calcium*. - 1983. - V. 4. - P.421–428.
311. Lazdunski M. ATP-sensitive potassium channels: an overview // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1994. - V. 24. - P.1- 5.
312. Lazdunski M., Renaud J.F. The action of cardiotoxins on cardiac plasma membrane // *Annu. Rev. Physiol.* - 1982. - V. 44. - P. 463-473.
313. Lee C.J., Dayanithi G., Nordmann J.J., Lemos J.R. Possible role during exocytosis of a Ca^{2+} -activated channel in neurohypophysial granules//*Neuron*. - 1992. - V.8. - P.335–342.
314. Lee K., Dixon A. K., Rowe I. C. et al. Direct demonstration of sulfonylurea-sensitive K_{ATP} channels on nerve terminals of the rat motor cortex // *Br. J. Pharmacol.* - 1995. - V. 115. - P. 385–387.
315. Lee K., Dixon A. K., Rowe I.C. et al. The high-affinity sulphonylurea receptor regulates $\text{K}(\text{ATP})$ channels in nerve terminals of the rat motor cortex // *J. Neurochem.* -1996. - V. 66. - P. 2562–2571.
316. Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary diseases // *Physiol Rev.* - 1999. - V. 79, N 4. - P. 1317-1372.
317. Levenes C, Daniel H, Crépel F. Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanisms revisited // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – V.55, №1. - P. 79-91.
318. Lilly M.R., Kreber R., Ganetzky B., Carlson J.R. Evidence that the *Drosophila* olfactory mutant smellblind defines a novel class of sodium channel mutation // *Genetics*. -1994. - V. 136. - P. 1087-1096
319. Linden D.J., Conner J.A. Long-term synaptic depression // *Annu Rev Neurosci.* - 1995. – V.18. – P. 319-357.
320. Lindgren C.A., Moore J. W. Calcium current in motor nerve endings of the lizard // *Ann. NY Acad. Sci.* - 1991. - V. 635. - P. 58–69.
321. Lindgren C.A., Moore J.W. Identification of ionic currents at presynaptic nerve endings of the lizard // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1989. - V. 414. - P. 201–222.
322. Lindgren S.A., Laird M.W. Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction // *NeuroReport*. - 1994. - Vol. 5, № 16. - P.

2205-2208.

323. Ling G, Gerard R.W. The normal membrane potential of frog sartorius fibers // *J. Cell Physiol.* – 1949. – V.34, №3. – P.383-396.
324. Lisman J.E. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable // *Trends Neurosci.* – 1997. – V.20, N 1. – P. 38-43.
325. Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse // *Biophys. J.* – 1981. – V.33, №3. – P. 289-321.
326. Llinas R., Sugimori M., Silver R.B. The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission // *Neuropharmacology.* – 1995. - V. 34 – P. 1443-1451
327. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols Potassium channels block by cytoplasmic polyamines as mechanism of intrinsic rectification // *Nature.* - 1994. - V. 372.- P. 366-369.
328. Lopez-Barneo J., Hoshi T., Heinemann S.H., Aldrich R.W. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels // *Receptors Channels.* - 1993. - V. 1. - P. 61-71.
329. Loughney K., Kreber R., Ganetzky B. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila* // *Cell.* - 1998 - V. 58. - P. 1143-1154.
330. Lowe G., Gold G.H. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells // *Nature.* – 1993. – V. 366. – P. 283–286.
331. Ludwig J., Margalit T., Eismann E., Lancet D., Kaupp U.B. Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium // *FEBS Lett.* - 1990. - V. 270, № 1-2. - P. 24-29.
332. Luebke J.I., Dunlap K., Turner T.J. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus // *Neuron.* - 1993. - V. 11. - P. 895–902.
333. Lukasiewicz P.D. GABA_C receptors in the vertebrate retina // *Mol. Neurobiol.* - 1996. - V. 12. - P. 181–194.
334. Lukasiewicz P.D., Maple B.R., Werblin F.S. A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina // *J. Neurosci.* - 1994. - V. 14. - P. 1202–1212.
335. Malenka R.C., Nicoll R.A. Long-term potentiation: decade of progress? // *Science.* – 1999. – V. 285. - P. 1870-1874.

336. Malik K.U., Sehic E. Prostaglandins and the release of the adrenergic transmitter // *Ann. NY Acad. Sci.* - 1990. - V. 604. - P. 222–236.
337. Mallart A. A calcium-activated potassium current in motor nerve terminals of the mouse // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1985. - V. 368. - P. 577–591 a.
338. Mallart A. Electrical current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves // *J. Physiol. Lond.* – 1985. - V.368. - P.565-575 б.
339. Mallart A. Presynaptic currents in frog motor endings // *Pfluegers Arch.* - 1984. - V. 400. - P. 8-13.
340. Mallart A. Studies on the ionic properties of presynaptic membranes// *Neuromuscular Junction.* – 1989. - P.161-170.
341. Mallart A., Brigant J.L. Electrical activity at motor nerve terminals of the mouse // *J. Physiol. Paris.* – 1982. - V.78. - P. 407-411.
342. Malouf N.N., McMahon D.K., Heinsworth C., Kay B.K. A two-motif isoform of the major calcium channel subunit in skeletal muscle // *Neuron.* - 1992. - V. 8. - P. 899-906.
343. Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J. et al. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel // *Science.* - 1991. - V. 254. - P. 432– 437.
344. Margolskee R.F. Molecular Mechanisms of Bitter and Sweet Taste Transduction // *J. Biol. Chem.* – 2002. -V. 277, № 1. - P. 1–4.
345. Mark M.D., Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K channels // *Eur.J.Biochem.* - 2000. - V. 267. - P. 5830-5836.
346. Maura G., Andrioli G.C., Cavazzani P., Raiteri M. 5-Hydroxytryptamine₃ receptors sited on cholinergic axon terminals of human cerebral cortex mediate inhibition of acetylcholine release // *J. Neurochem.* - 1992. - V. 58. - P. 2334–2337.
347. McIntosh J.M., Hasson A., Spira M.E. et al. A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V. 270. - P. 16796–16802.
348. Mcmanus O.B., Helms L.M., Pallanck L. et al. Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels // *Neuron.* - 1995. - V. 14. - P. 645–650.
349. Meir A., Ginsburg S., Butkevich A. et al. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release // *Physiol. Rev.* - 1999. - V.79, N3. -

P. 1019-1089.

350. Meir A., Rahamimoff R. Multitude of ion channels in the regulation of transmitter release // *Phil. Trans.R.Soc.Lond. B.* - 1999. - V. 354. - P. 281–288.
351. Mendeowitz D., Reynolds P.J., Andersen M. C. Heterogeneous functional expression of calcium channels at sensory and synaptic regions in nodose neurons // *J. Neurophysiol.* - 1995. - V. 73. - P. 872–875.
352. Mindell J.A., Maduke M. ClC chloride channels // *Genome Biology.* - 2001. - V.2, N 2. - P. 3003.1-3003.3.
353. Mintz I.M., Sabatini B.L., Regehr W.G. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse // *Neuron.* - 1995. - V. 15. -P. 675–688.
354. Mirrales F., Solsona C. Activity-dependent modulation of the presynaptic potassium current in the frog neuromuscular junction // *J. Physiol. (Lond.).* - 1996. - V. 495. - P. 717–732.
355. Molgo J., Comella J.X., Legrand A.M. Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals // *Br. J. Pharmacol.* - 1990. - V. 99. - P. 695–700.
356. Molgo J., del Pozo E., Banios J., Angaut-Petit D. Changes of quantal transmitter release caused by gadolinium ions at the frog neuromuscular junction // *Br. J. Pharmacol.* – 1991 – V. 104. – P. 133-138.
357. Molgo J., Mallart A. Effects of *Anemonia sulcata* toxin II on presynaptic currents and evoked transmitter release at neuromuscular junctions of the mouse // *Pflugers Arch.* - 1985. - V. 405. - P. 349–353.
358. Montague P.R., Gancayco C.D., Winn M.J. et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex // *Science.* - 1994. - V. 263. - P. 973–977.
359. Morales M.J., Wee J.O., Wang S. et al. The N- of a K⁺ channel β -subunit increases the rate of C-type inactivation from cytoplasmic side of the channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -1996. - V. 93. - P. 15119-15123.
360. Morita K., Barret E. F. Evidence for two calcium-dependent potassium conductances terminal domain in lizard motor nerve terminals // *J. Neurosci.* - 1990. - V.10. - P. 2614–2625.
361. Morris C.E. Mechanosensitive ion channels // *J. Membr. Biol.* - 1990. - V. 113. - P. 93-107.

362. Mosher H.S., Fuhrman F.A. Occurrence and origin of tetrodotoxin// ACS Symposium Series, No. 262, Seafood Toxins. Washington, DC: Am. Chem. Soc. - 1984. - P. 333–334.
363. Motin L., Bennet M. R. Effect of P₂-purinoceptor antagonists on glutamatergic transmission in the rat hippocampus // Br. J. Pharmacol. - 1995. - V. 115. - P. 1276–1280.
364. Mukhtarov M.R., Vyskocel F., Urazaev A.Kh., Nikolsky E.E. Non-quantal acetylcholine release in increased after nitric oxide synthase inhibition // Physiol. Res. - 1999 – V. 48 - P. 315-317.
365. Natochin Iu.V. [Evolution of water-salt exchange: from phenomenology to mechanisms of physiological function] // Zh Evol Biokhim Fiziol. – 2002. – V. 38, №5. –P.460-8. [Article in Russian].
366. Nayeem N., Green T. P., Martin I. L., Barnard E. A. Quaternary structure of the native GABA-A receptor determined by electron microscopic image analysis // J. Neurochem. - 1994. - V.62. - P. 815- 818.
367. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres // Nature. – 1976. – V. 260, № 5554. - 799-802.
368. Neher E.; Sakmann B. The patch clamp technique // Sci. Am. – 1992. – V.266, № 3. – P. 44-51.
369. Nerbonne J.M., Kass R.S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization // Physiol Rev. – 2005. – V. 85. – P. 1205–1253.
370. Neuroscience. Edited by Purves D. et al. - 2001 - 681 p.
371. Nicholls J.G., Martin A.R., Bruce G. Wallace B.G., Fuchs P.A. From neuron to brain // Sinauer Associates, 2003, 671 p.
372. Nicoll R.A., Malenka R.C., Kauer J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system // Physiol Rev. - 1990. - V. 70. - P. 513-565.
373. Nishimura M., Tsubaki K., Yagasaki O., Ito K. Ryanodine facilitate calcium-dependent release of transmitter at mouse neuromuscular junction // Br. J Pharmacol. - 1990. - V. 100, N1. - P. 114-118.
374. Noble D., Tsien R. W. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibers // J. Physiol. (Lond.). - 1969. - V. 200. - P. 205–231.

375. Nochols R.A., Mollard P. Direct observation of serotonin 5-HT₃ receptor-induced increases in calcium levels in individual brain nerve terminals // *J. Neurochem.* - 1996. - V. 67. - P. 581–592.
376. Nomura K., Naruse K., Watanabe K., Sokabe M. Aminoglycoside blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channel from rat brain synaptosomal membranes incorporated into planar bilayers // *J. Membr. Biol.* - 1990. - V. 115. - P. 241–251.
377. Nordberg A., Nilsson N., Hakansson L., Adem A. et al. Multiple actions of THA on cholinergic neurotransmission in Alzheimer brains // *Prog. Clin. Biol. Res.* - 1989. - V. 317. - P. 1169–1178.
378. Owens D.F., Boyce L.H., Davis M.B., Kriegstein A.R. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging // *J. Neurosci.* - 1996. - V. 16. - P. 6414–6423.
379. Papazian D.M., Schwartz T.L., Tempell B.L. et al. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila* // *Science.* - 1987. - V. 237. - P. 749-753.
380. Passafaro M., Rosa P., Sala C. et al. N-type Ca²⁺ channels are present in secretory granules and are transiently translocated to the plasma membrane during regulated exocytosis // *J. Biol. Chem.* - 1996. - V. 271. - P. 30096–30104.
381. Patil N., Cox D.R., Bhat D. et al. A potassium channel mutation in weaver mice implicated membrane excitability in granule cell differentiation // *Nature Genet.* - 1995. - V. 11. - P. 126-129.
382. Penner R., Dreyer F. Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals // *Pflug Arch.* - 1986. - V.406. - P.190-197.
383. Peper K. [et al.] Structure and ultrastructure of the frog motor end-plate // *Cell Tiss.Res.* - 1974. - V. 149. - P. 437-455.
384. Perez-Reyes E. Three for T: molecular analysis of low voltage-activated calcium channel family // *Cell Mol Life Sci.* - 1999. - V. 15, N 56(7-8). - P.660-669.
385. Pfeiffer F., Betz H. Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord // *Brain Res.* - 1981 - V. 226. - P. 273–279.
386. Pickles H. G. Presynaptic gamma-aminobutyric acid responses in the olfactory cortex // *Br. J. Pharmacol.* - 1979. - V. 65. - P. 223–228.
387. Pittaluga A., Thellung S., Maura G., Raiteri M. Characterization of two cen-

- tral AMPA-preferring receptors having distinct location, function and pharmacology // *Naunyn-Schmiedelbergs Arch. Pharmacol.* - 1994. - V. 349. - P. 555–558.
388. Ponce A., Bueno E., Kentros C. et al. G-protein-gated inward rectifier K⁺ channel proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain // *J. Neurosci.* - 1996. - V. 16. - P. 1990–2001.
389. Potter L.T. Synthesis, storage and release of C¹⁴ acetylcholine storage in cholinergic nerve terminals // *J. Physiol.* – 1970. - V. 206. - P. 145-166.
390. Pozzan T., Rizzuto R., Volpre P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // *Physiol. Rev.* - 1994. - V. 74. - P. 595–636.
391. Prior P., Schmitt B., Grenningloh G. et al. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein // *Neuron.* 1992. – V. 8. - P. 1161–1170.
392. Protti D.A., Uchitel O.D. Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA // *Neuroreport.* - 1993. - V. 5. - P. 333–336.
393. Pumplin D.W., Reese T.S., Llinas R., Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1981. - V. 78, №11. – P. 7210-7213.
394. Pusch N., Jentsch T.J. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels // *Physiol Rev.* - 1994. - V. 74. - P. 813-827.
395. Qian H., Dowling J.E. GABA_A and GABA_C receptors on hybrid bass retinal bipolar cells // *J. Neurophysiol.* - 1995. - V. 74. - P. 1920–1928.
396. Qian H., Dowling J.E. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells // *Nature.* - 1993. - V. 361. - P. 162–164.
397. Rahamimoff R., DeRiemer S. A., Ginsburg S. et al. Ionic channels and proteins in synaptic vesicles: facts and speculations // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* - 1990. - V. 1. - P. 7–17.
398. Rahamimoff R., DeRiemer S. A., Sakmann B. et al. Ion channels in synaptic vesicles from Torpedo electric organ // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. - V. 85. - P. 5310–5314.
399. Rahamimoff R., Fernandez J. M. Pre- and postfusion regulation of transmitter release // *Neuron.* - 1997. - V. 18. - P. 17–27.

400. Raiteri M., Garrone B., Pittaluga A. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. II. Evidence for functional cooperation and for coexistence on the same axon terminal // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1992. - V. 260. - P. 238–242.
401. Redman R.S., Silinsky E.M. On the simultaneous electrophysiological measurements of neurotransmitter release and perineural calcium currents from frog motor nerve endings // *J. Neurosci. Methods.* - 1995. - V. 57. - P. 151–159.
402. Regehr W.G., Mintz I.M. Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses // *Neuron.* - 1994. - V. 12. - P. 605–613.
403. Reichling D.B., Kyrozic A., Wang J., Macdermott A.B. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons // *J. Physiol. (Lond).* - 1994. - V. 476. P. 411–421.
404. Retig J., Heinemann S.H., Wunder F. et al. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β-subunit // *Nature.* - 1994. - V. 369. - P. 289-294.
405. Reuter H. Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca²⁺-channel blockers // *Neuron.* - 1995. - V.14. - P. 773–779.
406. Richardson C. M., Dowdall M. J., Green A. C., Bowman D D. Novel pharmacological sensitivity of the presynaptic calcium channels controlling acetylcholine release in skate electric organ // *J. Neurochem.* - 1995. - V.64. - P. 944–947.
407. Ritchie J.M. The distribution of sodium and potassium channels in mammalian myelinated nerve. In.: *Ion Channels in Neural Membranes*, ed. by Ritchie J.M., Keynes R.D., Bolis L., 1986. - P.105-122/
408. Roberts W.M. Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells // *J. Neurosci.* - 1994. - V. 14. - P. 3246–3262.
409. Roberts W.M., Jacobs R.A., Hudspeth A.J. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells // *J. Neurosci.* - 1990. - V. 10. - P. 3664–3684.
410. Robitaille R., Adler E.M., Charlton M. P. Strategic location of calcium channels at transmitter release of frog neuromuscular synapses // *Neuron.* - 1990.

-V.5. – P.773-779.

411. Robitaille R., Charlton M.P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels // *J. Neurosci.* - 1992. - V. 12. - P. 297–305.
412. Robitaille R., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Charlton M.P. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release // *Neuron.* - 1993. - V.11. - P. 645–655.
413. Roeper J., Pongs O. Presynaptic potassium channels // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 1996. - V.6. - P. 338–341.
414. Romey G., Abita J. P., Schweitz H. et al. Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanisms of nerve conduction and excitation-secretion coupling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1976. - V. 73. - P. 4055–4053.
415. Rose C.R., Konnerth A. Stores not just for storage: intracellular calcium release and synaptic plasticity // *Neuron.* – 2001. – V. 31. - P. 519-522.
416. Rowan E.G., Harvey A.L. Potassium channel blocking actions of α -bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals // *Br. J. Pharmacol.* – 1988 – V. 94. – P. 839-847.
417. Rowell P.P. Nanomolar concentrations of nicotine increase the release of [3 H] dopamine from rat striatal synaptosomes // *Neurosci. Lett.* - 1995. - V. 189. - P. 171–175.
418. Rozov [A.](#), Burnashev [N.](#), Sakmann [B.](#), Neher E. Transmitter release modulation by intracellular Ca^{2+} buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics // *J. Physiol.* - 2001. - V. 531. – P. 807-826.
419. Rudel R. The myotonic mouse: a realistic model for the study of human recessive generalized myotonia // *Trends Neurosci.* - 1990. - V. 13. - P. 1-3.
420. Rudomin P., Jimenez I., Quevedo J., Solodkin M. Pharmacologic analysis of inhibition produced by last-order intermediate nucleus interneurons mediating nonreciprocal inhibition of motoneurons in cat spinal cord // *J. Neurophysiol.* - 1990. - V. 63. - P. 147–160.
421. Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels // *Neuroscience.* - 1988. - V. 25. - P.729-749.

422. Sabatini B. L., Regehr W.G. Timing of synaptic transmission // *Ann. Rev Physiol.* – 1999. – V.61. – P. 521-542.
423. Sackin H. Stretch-activated ion channels // *Kidney Int.* -1995. - V. 48. - P.1134-1147.
424. Saez J.C., Berthoud V.M., Branes S.C., Martinez F.D., Beyer E.C. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions // *Physiol Rev.* – 2003. -V. 83. – P. 1359–1400.
425. Saito M., Wu C.-F. Expression of ion channels and mutational effects in giant *Drosophila* neurons differentiated from cell division-arrested embryonic neuroblasts // *J. Neurosci.* - 1991. - V. 11. - P. 2135- 2150.
426. Sakmann B. Acetylcholine-induced ionic channels in rat skeletal muscle // *Federation Proc.* - 1978. - V. 37. -P. 2654–2659.
427. Sampaio S. V., Coutinho Netto J., Arantes E. C. et al. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes // *Biochem. Mol. Biol. Int.* - 1996. - V. 39. - P. 729-740.
428. Sassoe-Pognetto M. et al. Colocalization of gephyrin and GABAA-receptor subunits in the rat retina // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – V. 357. – P. 1–14.
429. Saviane C., Conti F., Pusch M. The muscle chloride channel CC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotoma // *J. Gen. Physiol.* – 1999. - V. 113. - P. 457-468.
430. Schild D., Restrepo D. Transduction Mechanisms in Vertebrate Olfactory Receptor Cells // *Physiol. Rev.* - 1998. -V. 78, No. 2. – P. 429-466.
431. Schnape J.L., Baylor, How photoreceptor cells respond to light// *Sci. Am.* – 1987. – V.256. – P.40-47
432. Schneggenburger R., Neher E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse // *Nature.* – 2000. - V. 406. – P. 889-893.
433. Schneggenburger R., Neher E. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion // *Curr Opin Neurobiol.*- 2005. – V. 15. - P. 266-274.
434. Schneggnburger R., Konnerth A. GABA-mediated synaptic transmission in neuroendocrine cells: a patch-clamp study in a pituitary slice preparation // *Pflugers Arch.* -1992. - V. 421. - P. 364–373.
435. Scott R.H., Dolphin A.C. Activation of a G protein promotes agonist re-

- sponses to calcium channel ligands // *Nature*. - 1987. - V. 330. - P. 760–762.
436. Shakiyanova D.M., Zefirov A.L., Nikolsky E.E., Vyskocil F. The effect of acetylcholine and related drugs on currents at the frog motor nerve terminal // *Eur. J. Pharmacol.* - 1994. - V. 263. - P. 107–114.
437. Sharifov O.F., Fedorov V.V., Beloshapko G.G., Glukhov A.V., Yushmanova A.V., Rosenshtraukh L.V. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs // *J Am Coll Cardiol.* – 2004. – V. 43, №3. – P. 483-490.
438. Sharonova I.N., Dvorzhak A.Y., Vorobjov V.S. Gadolinium blocks proton-activated currents in isolated Purkinje cells // *Bull Exp Biol Med.* – 2008.- 145, №3. – P.307-311.
439. Sharonova N.I., Vorob'ev V.S., Skrebetskii V.G. et al. Potentiation of GABA-activated currents by imidazobenzoimidazole derivative RU-353 in isolated cerebellum Purkinje cells // *Bull Exp Biol Med.* – 2005. - V. 140, N 3. – P. 326-9.
440. Sharp A.H., McPherson P.S., Dawson T.M. et al. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-triphosphate- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in rat brain // *J. Neurosci.* - 1993. - V.13. - P. 3051-3063.
441. Sheng Z.H., Rettig J., Takahashi M., Catterall W.A. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels // *Neuron.* – 1994. -V.13. – P. 1303–1313.
442. Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L. *Basic Neurochemistry* // 7th Ed.. Academic Press. - 2006. – 992 p.
443. Siegelbaum S.A., Camardo J.S., Kandel E.R.. Serotonin and cyclic AMP close single K^{+} channels in *Aplysia* sensory neurons // *Nature*. - 1982. - V. 299. - P. 423–417.
444. Simon S.M., Llinas R.R. Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release // *Biophys J.* – 1985. - V.48, N 3. - P. 485-498.
445. Sitdikova G.F., Shakiryanova D.M., Zefirov A.L. Effect of phenol on the ion currents of frog nerve ending // *Mol. Chem. Neuropath.* - 1998. - V.33. - P. 238-245.
446. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells //

447. Smith A.B., Cunnane T.C. Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1996. - V. 497. - P. 657–664.
448. Smith E.S., Cadiou H., McNaughton P.A. Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action // *Neuroscience*. – 2007. – V. 45. – P.686–698.
449. Smith P.L., Baukrowitz T., Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel // *Nature*. - 1996. - V. 379. - P. 833-836
450. Smith S.J., Buchanan J., Osses L.R. et al The spatial distribution of calcium signals in squid presynaptic terminals // *J. Physiol.* – 1993. – V. 472. – P. 573-593
451. Sokol P.T., Hu W., Yi L. et al. Cloning of an apamin binding protein of vascular smooth muscle // *J. Protein Chem.* - 1994. - V. 13. - P. 117–128.
452. Solntseva E.I., Bukanova J.V., Marchenko E.V. et. al. The binding of donepezil with external mouth of K⁺-channels of molluscan neurons.// *Cell Mol Neurobiol.* -2009. – V. 29, N2. – P. 219-24.
453. Southan A.P., Robertson B. Patch-clamp recording from cerebellar basket cell bodies and their presynaptic terminals reveal an asymmetric distribution of voltage-gated potassium channels // *J. Neurosci.* - 1998. - V. 18. - P. 948-55.
454. Spehr M. et al. 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons // *Nueron*. – 2002. – V. 33. – P. 731-739.
455. Sperelakis N. *Cell Physiology* // Academic Press. - 1995. - 738 p.
456. Srinivasan J., Schachner M., Cattarral W.A. Interaction of voltage-gated sodium channels with extracellular matrix molecula tenascin-C and tenascin-R // *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* - 1998. - V. 95. - P. 15753-15757.
457. Stanford T.M., Lacey M.G. Electrophysiological investigation of adenosine triphosphate sensitive potassium channels in rat substantia nigra pars reticulata // *Neuroscience*. - 1997. - V. 74. - P. 499–509.
458. Stanley E.F. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face // *Trends Neurosci.* – 1997. –V.20. – P. 404-409
459. Stanley E.F., Goping G. Characterization of a calcium current in a vertebrate cholinergic presynaptic nerve terminal // *J. Neurosci.* - 1991. - V. 11. - P. 985–993.

460. Staruschenko A., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2005. – V.1669. – P. 53–60.
461. Steger K.E., Remy J., Krueger S. Drug-induced torsade des pointes: case report and implication for critical care staff // *Heart Lung.* – 1986. - V. 15. - P. 200-202
462. Steinbach J. H. Mechanism of action of the nicotinic acetylcholine receptor // *Ciba Found. Symp.* - 1990. - V. 152. - P. 53–67.
463. Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision // *Ann.Rev.Neurosci.* – 1986. – V.9. – P.87-119.
464. Stuhmer W., Conti F., Suzuki H. et al. Structural parts involved in activation and inactivation of sodium channels // *Nature.* - 1989. - V. 339. - P. 597-603.
465. Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C. et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels // *Science.* - 1995. - V. 269. - P. 847-850.
466. Sugiura Y., Woppmann A., Miljnich G.P., Ko C.P. A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction // *J. Neurocytol.* - 1995. - V. 24. - P. 15–27.
467. Sun X.P., Stanley E.F. An ATP-activated, ligand-gated ion channel on a cholinergic presynaptic nerve terminal // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1996. - V. 93. - P. 1859–1863.
468. Suzuki S., M. Osanai, M. Murase et al. Ca^{2+} dynamics at the frog motor nerve terminal // *Pflugers Arch.* – 2000. – V. 440. – P. 351-365.
469. Sze P.Y., Yu B.H. Glucocorticoid actions on synaptic plasma membranes: modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 1995. - V. 55. - P. 185–192.
470. Tabti N., Bourret C., Mallart A. Three potassium currents in mouse motor nerve terminals // *Pflugers Arch.* - 1989. - V. 413. - P. 395–400.
471. Tachibana M., Kaneko A. Gamma-Aminobutyric acid exerts a local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells: evidence for negative feedback from amacrine cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1987. - V. 84. - P. 3501–3505.
472. Taddese A., Nah S. Y., Mccleskey E. W. Selective opioid inhibition of small nociceptive neurons // *Science.* - 1995. - V. 270. - P. 1366–1369.
473. Takata Y., Shimada F., Kato H. Possible involvement of ATP-sensitive K^{+} channels in the inhibition of rat central adrenergic neurotransmission under hy-

- poxia // *Jpn. J. Pharmacol.* - 1993. - V. 62. - P. 279–287.
474. Terrian D. M. Persistent enhancement of sustained calcium-dependent glutamate release by phorbol esters: requirement for localized calcium entry // *J. Neurochem.* - 1995. - V. 64. - P. 172–180.
475. Thomas L., Hartung K., Landgosch D. et al. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane // *Science.* - 1988. - V. 242. - P. 1050–1053.
476. Thomas M.M., Puliganla P.S., Dunn S. M. Effects of calcium channel blockers on the kinetics of voltage-dependent changes in synaptosomal calcium concentrations // *Brain Res.* - 994. - V. 635. - P. 9–17.
477. Thomas P., Ye Y., Lightner E. Mutation of the pancreatic islet rectifier also lead to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy // *Hum Mol. Genet.* - 1996. - V. 5. - P. 1809-1812.
478. Thompson A. J., Lummis S.C.R. 5-HT₃ Receptors // *Curr Pharm.* – 2006. – V. 12, № 28. – P. 3615–3630.
479. Thompson A. J., Lummis S.C.R. The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target // *Expert Opin Ther Targets.* – 2007. - V.11, №4. -P. 527–540.
480. Thoreson W.B., Rabl E., Townes-Anderson R. Heidelberger A highly Ca²⁺-sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse // *Neuron.* – 2004. – V.42. - P. 595-605.
481. Torri-Tarelli F., Passafaro M., Clementi F., Sher E., Presynaptic localization of omega-conotoxin-sensitive calcium channels at the frog neuromuscular junction // *Brain Res.* – 1991. - V.547, № 2. – P.:331-334.
482. Toth P.T., Bindokas V.P., Bleakman D. et al. Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals // *Nature.* - 1993. - V. 364. - P. 635–639.
483. Trussel L.O. Transmission in hair cell synapse // *Nature Neurosci.* – 2002. – V.5. – P. 85-86.
484. Tsai M.C., Chen M.L. Effects of brevetoxin-B on motor nerve terminals of mouse skeletal muscle // *Br. J. Pharmacol.* - 1991. - V. 103. - P.1126–1128.
485. Tseng-Crank J., Foster C.D., Krause J.D. et al. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms from human brain // *Neuron.* - 1994. - V. 13. - P. 1315–1330.

486. Tseng-Crank J., Godinot N., Jonansen T. E. et al. Cloning, expression and distribution of a Ca^{2+} -activated K^+ channel β -subunit from human brain // Proc.-Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - V. 93. - P. 9200–9205.
487. Tsien R.W. Calcium channels in excitable cell membranes // Ann. Rev. Physiol. - 1983. – V.45. – P. 341-358.
488. Turner T.J., Adams M.E., Dunlap K. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1993. - V. 90. - P. 9518–9522.
489. Ueda H., Tamura S., Fukushima N. et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium transport through plasma membranes in nerve terminals // J. Neurosci. - 1996. - V. 16. - P. 2891–2900.
490. Van Den Pol A.N. Presynaptic metabotropic glutamate receptors in adult and developing neurons: autoexcitation in the olfactory bulb // J. Comp. Neurol. - 1995. - V. 359. - P. 253–271.
491. Van Der Kloot W., Molgo J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction // Physiol. Rev. - 1994.- V. 74. - P. 899–991.
492. Vanegas H., Schaibl H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia // Pain. – 2000. - V. 85. - P. 9-18.
493. Vassilev P., Scheuer T., Catterall W.A. Inhibition of activation of single sodium channels by a site-directed antibody // Proc.Natl. Acad. Sci. USA. - 1988. - V. 86. - P. 8147-8151 a.
494. Vassilev P.M., Scheuer T., Catterall W.A. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation // Science. - 1988. - V. 241. - P. 1658-1661 б.
495. Vatanpour H., Harvey A.L. Modulation of acetylcholine release at mouse neuromuscular junctions by interaction of three homologous scorpion toxins with K^+ channels // Br. J. Pharmacol. - 1995. - V. 114. - P. 1502–1506.
496. Venance S.L., Cannon S.C., Fialho D. et al. The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment // Brain. – 2006. – V.129, №1. – P. 8-17.
497. Venero J.L., Vizuete M. L., Machado A., Cano J. Aquaporins in the central nervous system // Progress in Neurobiology. – 2001. – V.63. – P. 321–336.
498. Vilim F.S., Crooper E.C., Price D. et al. Release of peptide cotransmitters in

- Aplysia: regulation and functional implications // *J. Neurosci.* - 1996. - V. 16. - P. 8105–8114.
499. Vizi E.S., Somogyi G.T. Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic)- and negative (muscarinic)-feed-back modulation // *Br. J. Pharmacol.* - 1989. - V. 97. - P. 65–70.
500. Von Spreckelsen S., Lollike K., Treiman M. Ca^{2+} and vasopressin release in isolated rat neurohypophysis: differentialeffects of four classes of Ca^{2+} channel ligands // *Brain Res.* - 1990. - V. 514. - P. 68–76.
501. Wahl P., Elster L., Schouboe A. Identification and function of glycine receptors in cultured cerebellar granule cells // *J. Neurochem.* - 1994. - V. 62. - P. 2457–2463.
502. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na-channel specific for sensory neurons // *J. Biol. Chem.* -1997 – V. 272. – P. 20975–20978.
503. Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // *Nature.* -1997. – V. 386. – P.173–177.
504. Wall P. Do nerve impulses penetrate terminal arborizations? A presynaptic control mechanism // *Trends Neurosci.* - 1995. - V. 18. - P. 99–103.
505. Wang G., Thorn P., Lemos J. R. A novel large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel and current in nerve terminals of the rat neurohypophysis // *J. Physiol. (Lond.)*. -1992. - V. 457. - P. 47–74.
506. Wang H., Kunkel D.D., Martin D.M. et al. Heteromultimeric K^+ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neuron // *Nature.* - 1993. - V. 365. - P. 75-59.
507. Wang J.M., Trudeau M.C., Zappia A.M., Robertson G.A. Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-a-go-go-related gene potassium channels // *J. Gen Physiol.* - 1998. - V. 112. - P. 637-647.
508. Wang Q., Shen J., Splawski I. et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome // *Cell.* - 1995. - V. 80. - P. 805-811.
509. Wang X., Triestman S.N., Lemos J.R. Two types of high-threshold calcium

- currents inhibited by omega-conotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. - V. 445. - P. 181–199.
510. Wang X., Wang G., Lemos J. R., Triestman S. N. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel in neurohypophysial terminals // *J. Neurosci.* - 1994. - V. 14. - P. 5453–5460.
511. Wangemann P., Takeuchi S. Maxi- K^+ channel in single isolated cochlear efferent nerve terminals // *Hear. Res.* - 1993. - V. 66. - P.123–129.
512. Watts A. E., Hicks G. A., Henderson G. Putative pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra in vitro // *J. Neurosci.* - 1995. - V.15. - P. 3065–3074.
513. Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B. Modulation of calcium-activated potassium channels // *J Comp Physiol.* – 2002. – V. 188. – P. 79–87
514. White G.R., Plaskett J. “Nervous”, “stiff-legged” or “fainting” goats // *Am. Vet. Rev.* -1904. - V. 28. - P. 556-560.
515. Whitting P.J., Mckernan R.M., Wafford K.A. Structure and pharmacology of vertebrate GABA-A receptor subtypes // *Int. Rev. Neurobiol.* - 1995. - V. 38. - P. 95–137.
516. Wie X.Y., Jegla T., Salkoff L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project // *Neuropharmacology.* - 1996. - V. 35. - P. 805-829.
517. Wood M.W., Vandongen H.M. A., Vandongen A.M.J. Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - V. 92. - P. 4882– 4886.
518. Woodbury D. J. Making synaptic vesicles fuse with lipid bilayers // *Biophys. J.* - 1993. - V. 65. - P. 973–974.
519. Wu L.G., Borst J.G., Sakmann B. R-type Ca^{2+} currents evoke transmitter release at rat central synapse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998. - V. 95. - P. 4720–4725.
520. Wymore R. S., Gintant G.A., Wymore R.T. et al. Tissue and Species distribution of mRNA for the *Ikr*-like K^+ channel, *erg* // *Circ. Res.* - 1997. - V. 80. - P. 261-268.
521. Xi Q. et al. Carbon monoxide activates KCa channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent Ca^{2+} sensitivity of alpha-subunits // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. - V.286. – P. 610–618.

522. Xiong Z, Pignataro G, Li M, Chang S, Simon R P Acid -sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – V. 8, Issue 1. – P. 25-32.
523. Yakirr N., Rahamimoff R. The non-specific ion channel in *Torpedo ocellata* fused synaptic vesicles // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1995. - V. 485. - P. 683–697.
524. Yamada W.M., Zucker R.S. Time course of transmitter release calculated from simulations of a calcium diffusion model // *Biophys. J.* – 1992. – V. 61, N 3. – P. 671-682.
525. Yamasita T., Ishii S., Oota I. Effect of muscle stretching on the activity of neuromuscular transmission // *Med. Sci. Sports. Exercise.* - 1992. - V. 24. - P. 80–84.
526. Yau K.W., Chen T.Y. In *Handbook of Receptors and Channels: Ligand- and Voltage-Gated Ion channels.*- 1995. – CRC Press, Boca Raton, FL. - P. 307-335.
527. Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D. et al. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha(1) subunit // *Nature.* - 1997. - V. 385. - P. 442–446.
528. Zefirov A.L., Benish T., Fatkullin N. et al. Localization of active zones // *Nature.* – 1995. - V. 376. - P. 393-394.
529. Zefirov A.L., Mukhamed'yarov M.A., Gafurov B.Sh. Role of Potassium Channels in Facilitation of Transmitter Release from Frog Motor Nerve Ending (Electrophysiology Mathematical Simulation) // *Neurofiziologiya/Neurophysiology.* – 2002. - V. 34, N 1, P.17-27.
530. Zhang J. F., Randall A. D., Ellinor P. T. et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons // *Neuropharmacology.* - 1993. - V. 32. - P. 1075–1088.
531. Zhang S.J., Jackson M.B. GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings // *Science.* - 1993. - V. 259. – P. 531–534.
532. Zimmermann H., Volknandt W., Wittich B., Hausinger A. Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. - V. 87. - P.159–170.
533. Ziyatdinova N.I., Giniatullin R.A., Svyatova N.V., Zefirov T.L. Blockade of hyperpolarizing currents produces a dose-dependent effect on heart rate // *Bull Exp Biol Med.* – 2001. - V. 131, № 3. – P. 213-215.
534. Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L., Sitdikov F.G., Zefirov T.L. Autonomic control

- of cardiac function involves modulation of hyperpolarization activated channels in vitro // *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. – 2003. – V.89, № 2. – P.154-160.
535. Znao F, Li P, Chen S.R. et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: molecular mechanism and isoform selectivity // *J.Biol. Chem.* - 2001. - V. 276, N 17. - P. 13810-1381.
536. Zucker R.S. Calcium and transmitter release // *J. Physiol. (Paris)*. - 1993. - V.87. - P. 25–36.
537. Zucker R.S. Exocytosis: a molecular and physiological perspective // *Neuron*. – 1996. - V. 17. - P.1049-1055.
538. Zucker R.S., Fogelson A.L. Relationship between transmitter release and presynaptic calcium influx when calcium enters through discrete channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. - V. 83. – P. 3032-3036.
539. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity // *Annu. Rev. Physiol.* – 2002. - V. 64. - P. 355-405.
540. Zufall F., Firestein S., Shepherd G.M Cyclic nucleotide-gated ion channels as regulator of CNS development and plasticity // *Curr. Opin. Biol.* - 1997. - V.7. - P.404-412.
541. Zufall F., Leideners-Zufall T. The cellular and molecular basis of odor adaptation // *Chem. Senses*. – 2000. – V. 25. – 473-481.

В книгу вошли данные полученные сотрудниками кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета и Казанского государственного университета. Эти исследования поддержаны грантами РФФИ и Ведущей научной школы России, Федеральными целевыми программами.

Авторы выражают благодарность Захарову Андрею Викторовичу за помощь в подготовке рисунков.