

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1. Общие принципы строения и функционирования ионных каналов. Классификации	6
2. Методы исследования ионных каналов	25
3. Строение и функциональные свойства основных типов ионных каналов	39
3.1. Натриевые каналы	39
3.2. Калиевые каналы	44
3.3. Хлорные каналы	57
3.4. Кальциевые каналы	64
3.5. Каналы синаптических везикул	72
3.6. Лиганд-активируемые неселективные ионные каналы	72
3.7. Стретч-каналы	85
3.8. Коннексоны	86
3.9. Протон-активируемые каналы	87
3.10. Аквапорины	89
Заключение	91
Список литературы	93

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, 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 живых клеток выполняют целый ряд функций (Hille, 1991, Meir, Ginsburg., Butkevich et al., 1999, Kandel, Schwartz, Jessel, 2002, Зефилов, Ситдикова, 2002, 2010). Они регулируют pH 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, 1995, Cowan, Sudhof, Stevens, 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 (Зефилов, Ситдикова, 2010). 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. 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.

В настоящем пособии проанализированы современные данные по исследованию основных ионных каналов клетки, представлены функциональные характеристики, молекулярное строение и механизмы регуляции потенциал- и лиганд-активируемых 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, Schwartz, Jessel, 2002, Siegel 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.

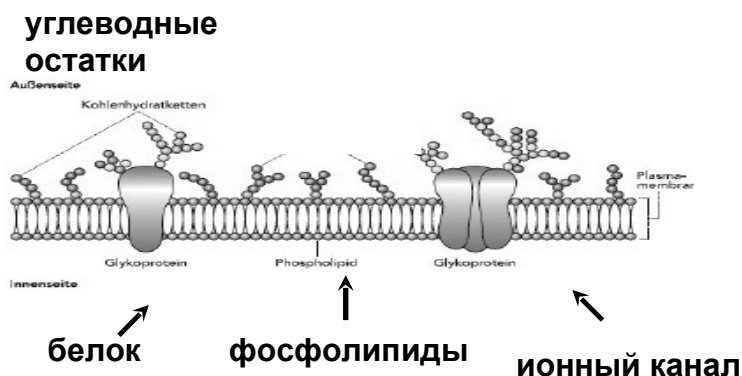


Рис. 1. Строение клеточной мембраны.

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 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, Schwartz, Jessel, 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., Ginsburg, Butkevich et al., 1999, Kandel, Schwartz, Jessel, 2002, Зефилов, Ситдикова, 2002, 2010). Эти классификации мы представим в соответствующих разделах учебного пособия.

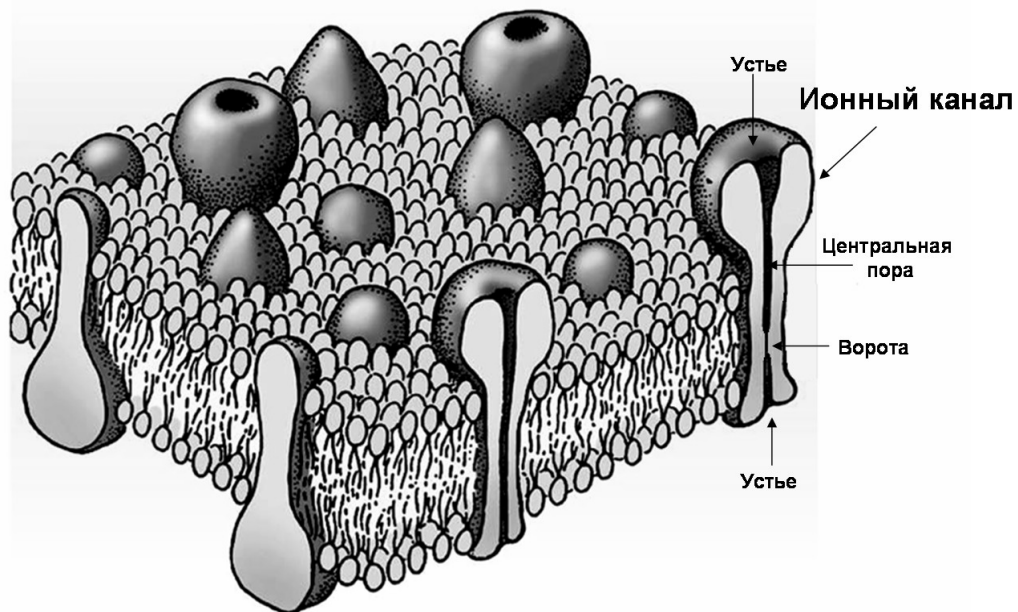


Рис 2. Ионные каналы клеточной мембраны.

Некоторые трансмембранные белки образуют ионные каналы. На рисунке схематично представлен ионный канал с центральной водной порой, устьями и воротным механизмом. (Из Nicholls 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, Schwartz, Jessel, 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, 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, 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 K-, Na-, Ca-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, Schwartz, Jessel, 2002, Зефилов, Ситдикова, 2002, 2010).

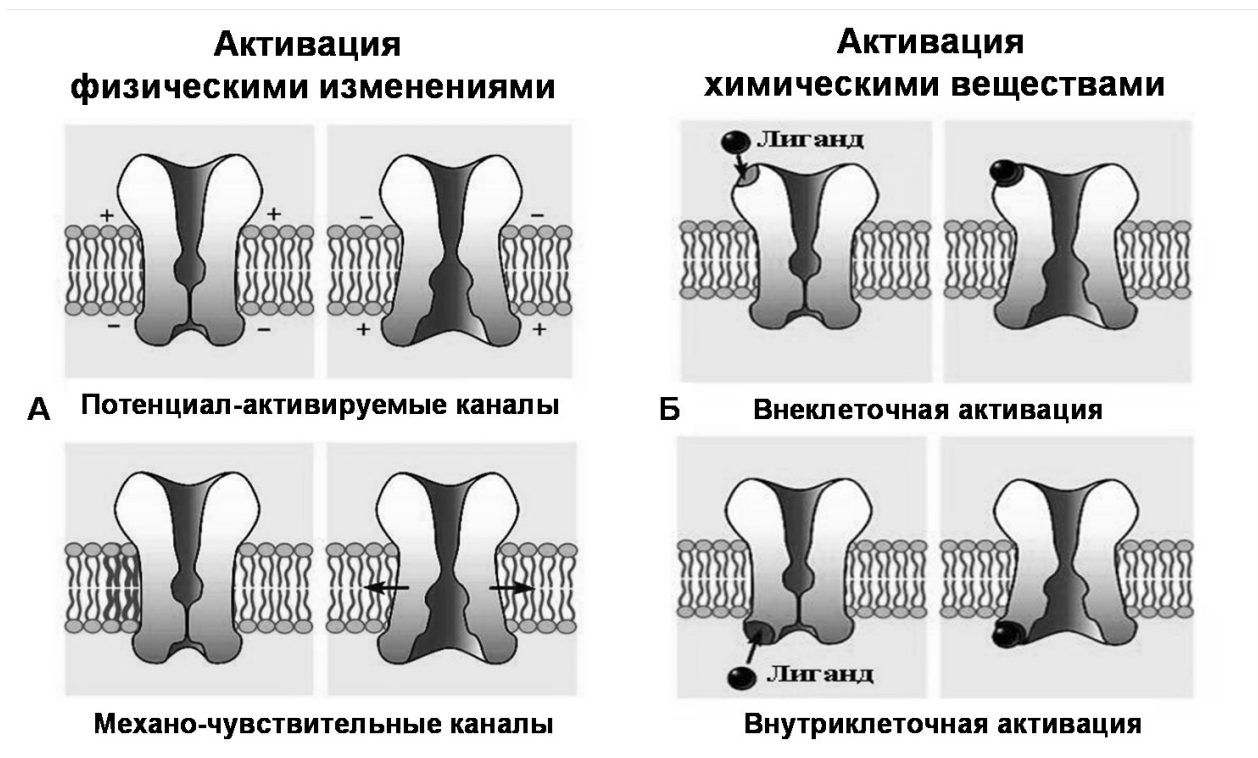


Рис. 3. Способы активации ионных каналов.

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 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, Schwartz, Jessel, 2002, Зефилов, Ситдикова, 2002, 2010). 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, Ca-активируемые K-каналы чувствительны также к изменению потенциала, а некоторые потенциал-активируемые ионные каналы чувствительны к внутриклеточным лигандам (Kandel, Schwartz, Jessel, 2002, Зефиоров, Ситдикова, 2002, 2010).

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 *эффektorными 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.

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 (A-киназ), цГМФ-зависимых протеинкиназ (G-киназ), Ca-кальмодулин-зависимых протеинкиназ (B-киназ) и Ca-фосфолипид-зависимых протеинкиназ (C-киназ). Активация протеинкиназ обуславливает фосфорилирование ионных каналов и может инициировать их открытие или закрытие (Kandel, Schwartz, Jessel, 2002, Siegel et al., 2006, Ткачук, 2007). 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, Schwartz, Jessel, 2002, Siegel et al., 2006, Ткачук, 2007). 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 (Kandel, Schwartz, Jessel, 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, Schwartz, Jessel, 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 $I = g(V - E_{ion})$, где V - потенциал на мембране. Эта формула представляет собой преобразованный закон Ома.

Константа G 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 ($1 \text{ мВ} = 10^{-3} \text{ В}$), токи одиночных ионных каналов в пикоамперах ($1 \text{ пА} = 10^{-12} \text{ А}$), проводимость в пикосименсах ($1 \text{ пСм} = 10^{-12} \text{ См}$) (Hille, 2001, Николс, Мартин, Валлас, Фукс, 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, Мартин, Валлас, Фукс, 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. 4). 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. 5). Если К-канал открыт, а на мембране существует концентрационный 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).

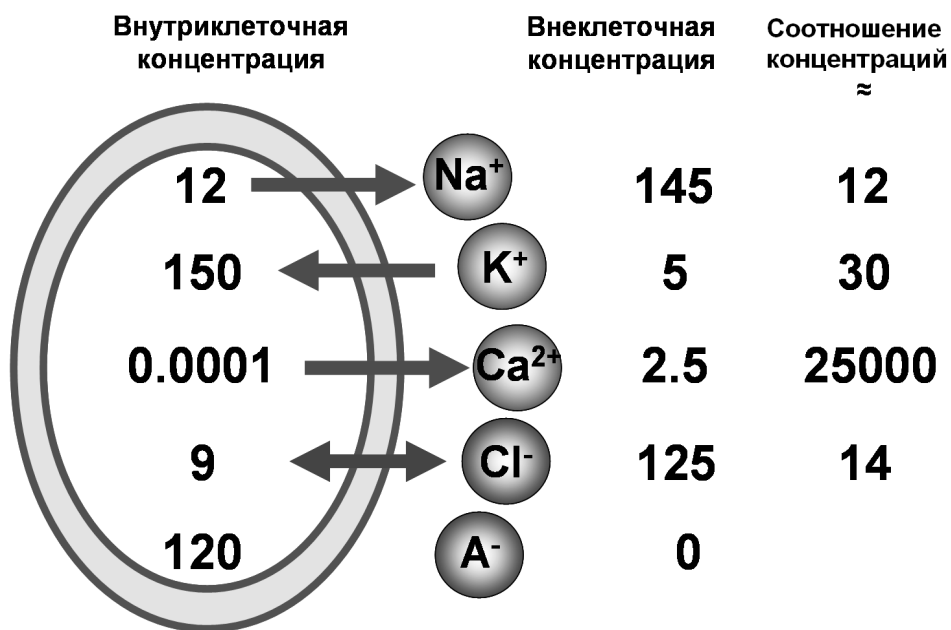


Рис. 4. Вне- и внутриклеточные концентрации ионов в двигательных нейронах спинного мозга.

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.

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. 5) (Hille, 2001, Kandel, Schwartz, Jessel, 2002, Николс, Мартин, Валлас, Фукс, 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. 5). В других возбудимых клетках, например, в нейронах равновесный хлорный потенциал меньше и составляет -40-50 мВ (Boron, Boulpaep, 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.

На основе представлений о равновесном потенциале становится ясным, какая сила в естественных условиях обеспечивает движение ионов через каналы. По формуле - $i \rightarrow V$ - 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.

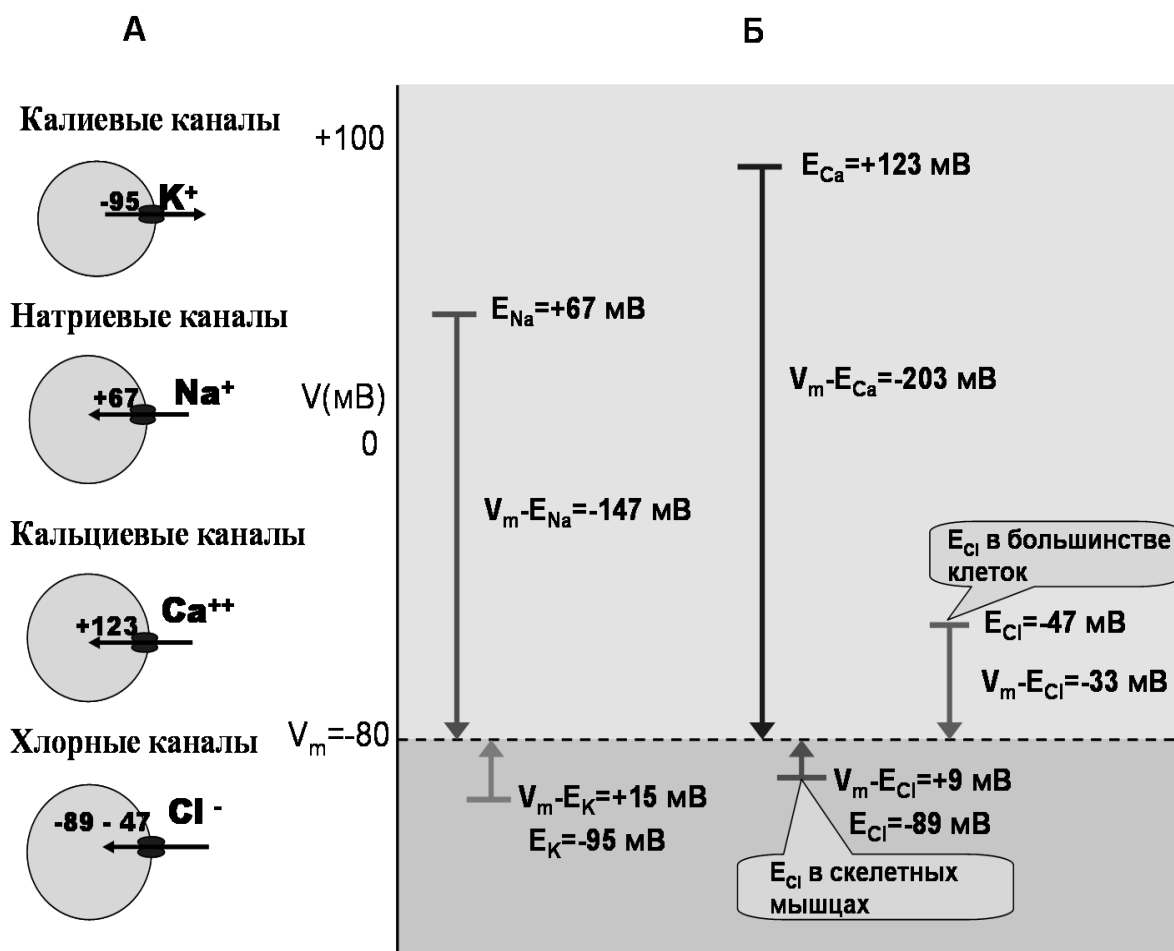


Рис 5. Итоговые движущие силы для различных ионов.

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, Boulpaep, 2003 с изменениями).

Следовательно, ток через канал пропорционален разнице между значением МП (E_{rev}) и значением равновесного потенциала для иона (E_{ion}), $I \propto (V - E_{rev})$. Эта разница $-(V - E_{rev})$ 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, Boulpaep, 2003).

Мембранные токи и потенциалы. Если каналов в мембране много, то ток через мембрану (I_{total}) определяется током через каждый канал ($I_{channel}$), общим количеством каналов (N) и вероятностью (P) того, что данный канал откроется, $I_{total} = N \cdot P \cdot I_{channel}$. 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, Boulpaep, 2003).

Принципы молекулярной организации ионных каналов. Применение современных методов исследования позволило определить молекулярную структуру большинства известных ионных каналов (Meir, Rahamimoff, 1999, Hille, 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. 6). 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, Hille, 1998, Hille, 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, Hille, 1998, Hille, 2001).

Многие ионные каналы имеют одну или более **вспомогательных субъединиц**, которые играют модуляторную, структурную или стабилизирующую роли (рис. 6) (Catterall, 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, привлекших 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. 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, 2001, Kandel, Schwartz, Jessel, 2002).

Рис. 6. 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, Schwartz, Jessel, 2002 с изменениями).

Согласно традиционной модели активации канала деполяризация мембраны вызывает смещение положительных зарядов в направлении внеклеточной среды, поэтому весь сегмент перемещается в том же направлении (рис. 7 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 et al., 2003). Согласно новым представлениям потенциал-чувствительные элементы S4 сегмента находятся на внешней поверхности α -субъединицы, образуя «лопасти» (рис. 7 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. 7А). В результате α -субъединицы приобретают цилиндрическую форму, и канал открывается (Jiang et al., 2003 а, б).

Молекулярные механизмы инактивации каналов иные (рис. 7 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.

Для объяснения быстрой инактивации (так называемой N-тип инактивации) была предложена модель «мяча и цепи» (Armstrong, Hille, 1998), в которой внутриклеточная блокирующая частица («мяч»), прикрепленная к цитоплазматической стороне канала молекулярной цепью, входит во внутреннее устье канала и блокирует ток ионов (рис. 7Б). 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. «Мячом» быстро инактивирующихся K-каналов является часть NH₂-конца. 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. Нарушения описанных механизмов инактивации точечными мутациями приводят к P-типу инактивации (pore-type). Описаны также и другие инактивационные механизмы, включающие модификацию внутриклеточного устья канала дополнительными субъединицами.

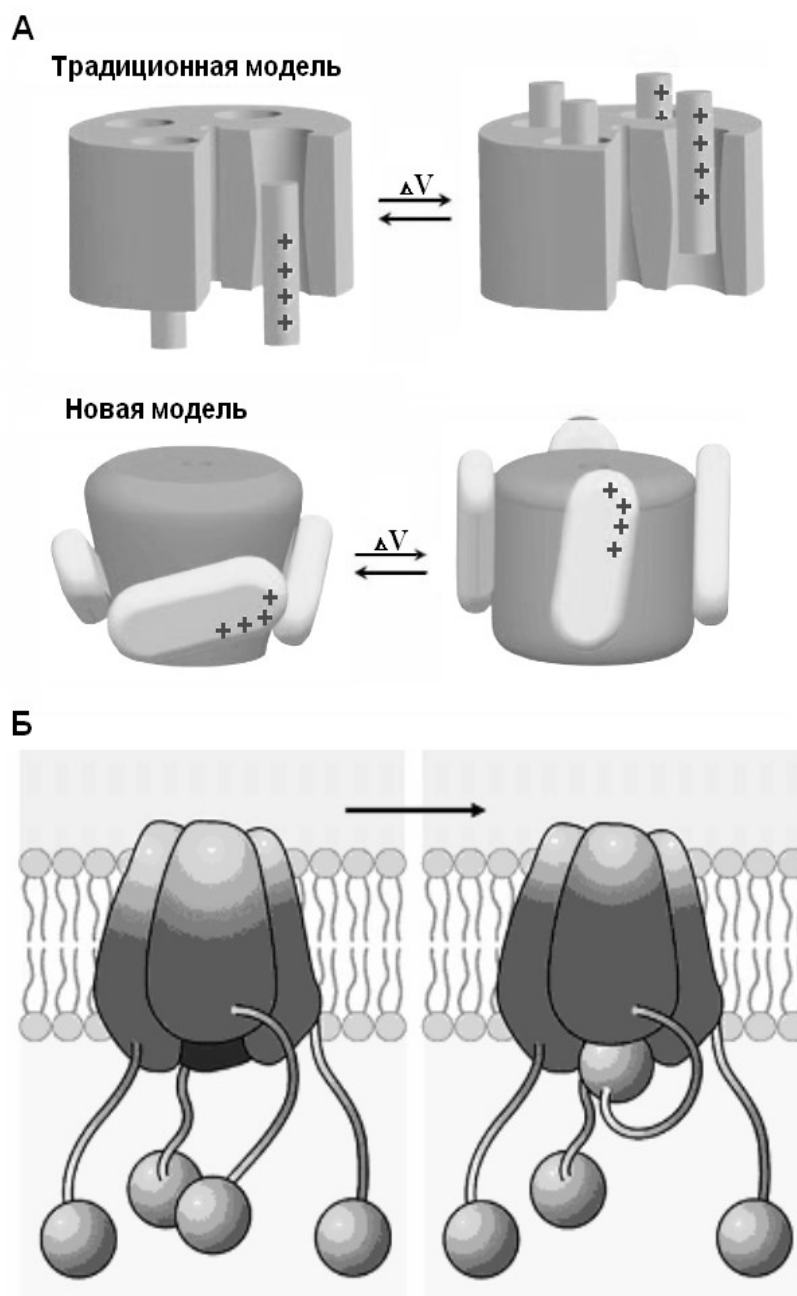


Рис. 7. Молекулярные механизмы активации и инактивации ионных каналов.

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 et al., 2003).

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. 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. После активации рецепторы теряют на некоторое время чувствительность к медиатору – наступает временная десенситизация (Hille, 2001, Kandel, Schwartz, Jessel, 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. 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 (Kandel, Schwartz, Jessel, 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 каналные гены экспрессируются тканеспецифичным образом, тогда как другие экспрессируются повсеместно (Felix, 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, Schwartz, Jessel, 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 «изоформ» каналов лежит несколько генетических и молекулярных механизмов: 1) кодирование различными генами различных изоформ каналов; 2) альтернативный сплайсинг, при котором канальный пептид может кодироваться различными участками ДНК (экзонами). Транскрипция различно сочетающихся экзонов приводит к образованию изоформ каналов; 3) сочетание различных субъединиц в пределах одного подсемейства ионных каналов; 4) комбинация порообразующей субъединицы (порообразующих субъединиц) с различными вариантами вспомогательных субъединиц (Sperelakis, 1995).

Разнообразие изоформ каналов в организме имеет большое биологическое значение. Во-первых, каждый изоформ имеет различные функциональные характеристики, соответствующие определенной клетке. Во-вторых, изоформы каналов могут быть дифференциально чувствительны к внутриклеточным модуляторам, что позволяет клеточным механизмам изменять свойства специфических каналов селективно. В-третьих, наличие изоформ каналов близких по своим кинетическим характеристикам может играть роль в усилении надежности выполнения определенной клеточной функции. Не исключено также, что разнообразие изоформ каналов является следствием эволюционного приспособления к действию биологических токсинов (Meir 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 рН (Sperelakis, 1995, Hille, 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, Schwartz, Jessel, 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, Huxley, 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, Huxley, 1945, 1952, Николс, Мартин, Валлас, Фукс, 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, Gerard, 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. 8. Стеклообразный микроэлектрод (микропипетка) с диаметром кончика около 0.5 мкм, заполненный концентрированным солевым раствором (например, KCl), подводится к клетке, второй электрод помещается во внеклеточную жидкость. 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. 8).

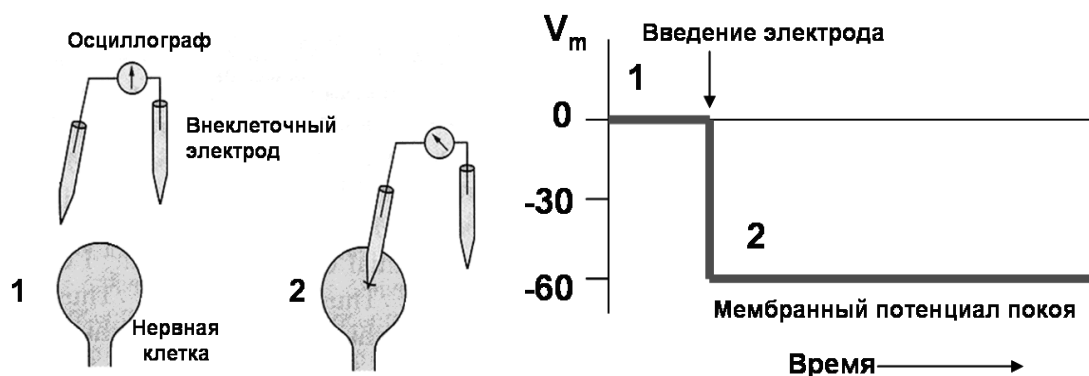


Рис 8. Регистрация мембранного потенциала при помощи стеклянных микроэлектродов.

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, Schwartz, Jessel, 2002 с изменениями).

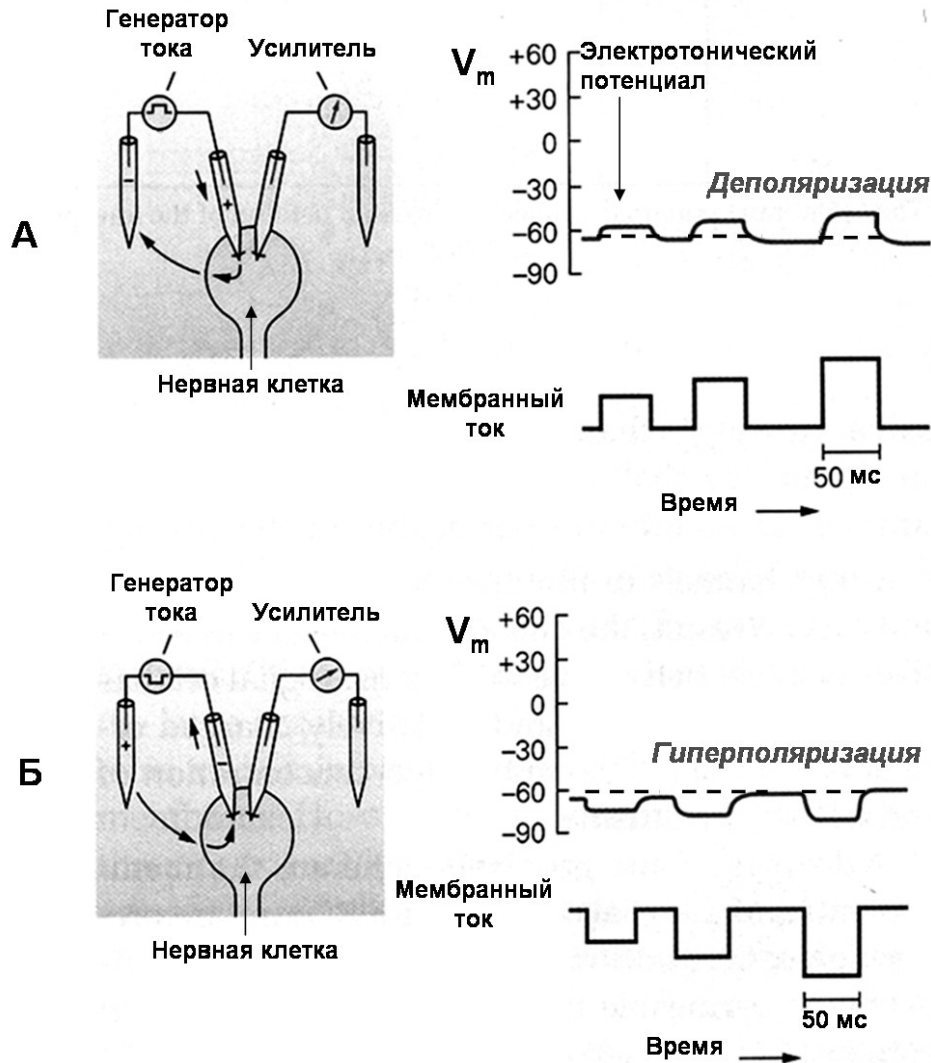


Рис 9. Изменения мембранного потенциала при пропускании электрического тока.

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, Schwartz, Jessel, 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. 9). 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, 1949, Hodgkin, Huxley, Katz, 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. 10). 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. 10).

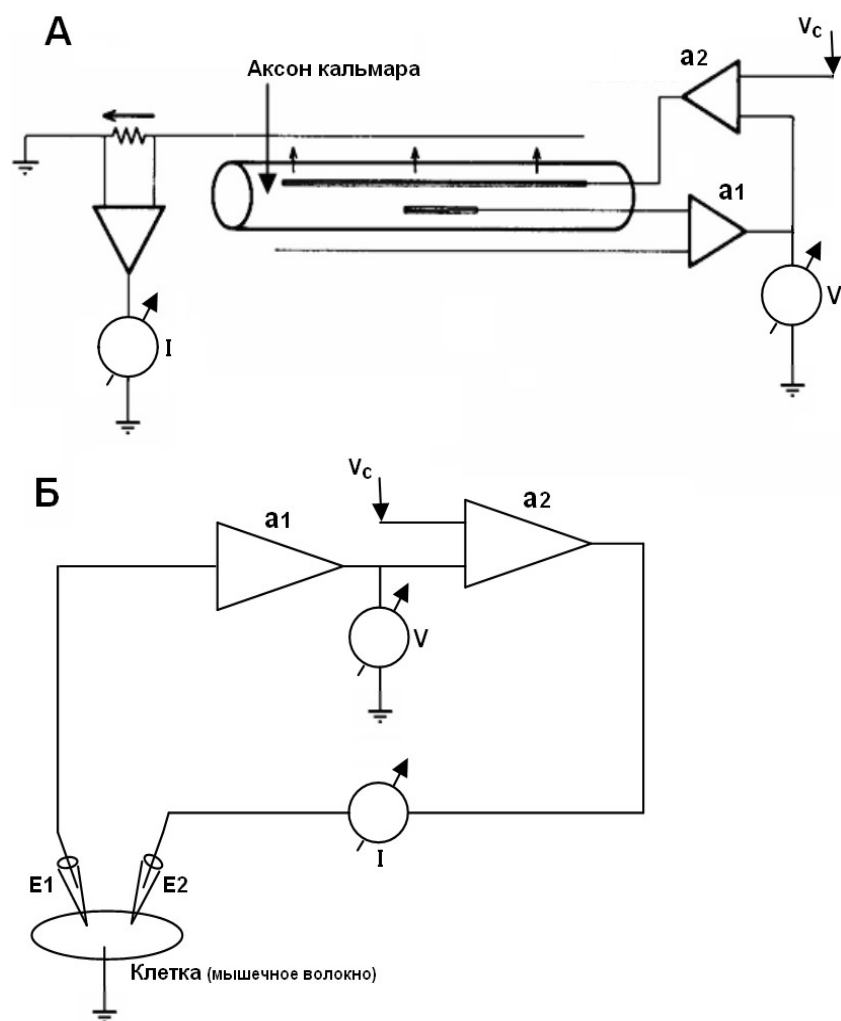


Рис. 10. Метод фиксации мембранного потенциала.

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, Mallart, 1982, Зефилов, Халилов, 1985). Принципиальная схема внеклеточного отведения приведена на рисунке 11.

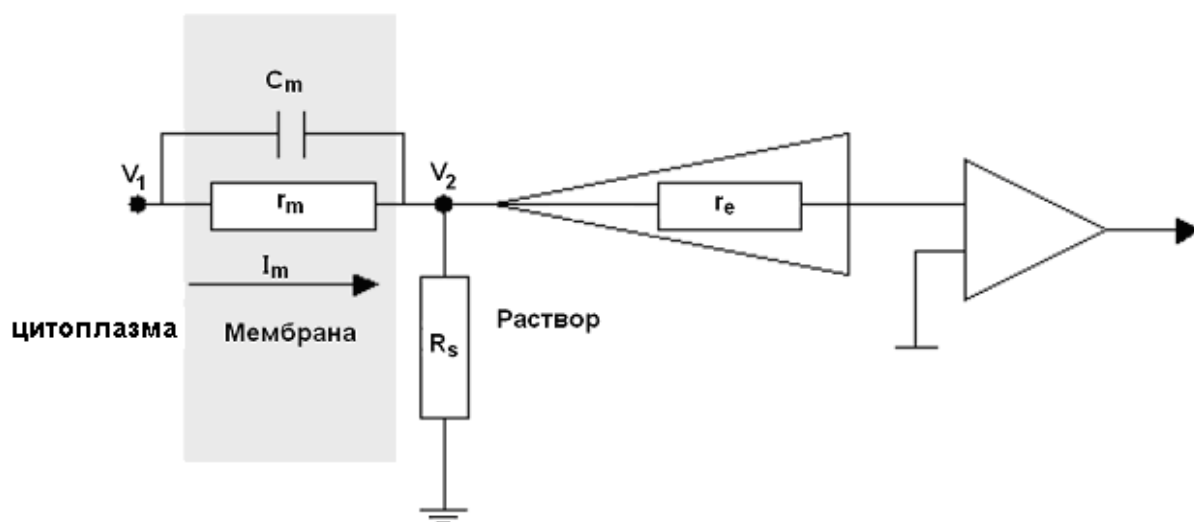


Рис. 11. Внеклеточное отведение электрических сигналов.

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** (Mallart, 1985), 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-клампы (patch-clamp)** (рис. 12)

(Neher, Sakmann, 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; Sakmann, 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.

При использовании пэтч-кламп метода регистрируемые события состоят из прямоугольных токовых сигналов, отражающих процессы открытия и закрытия каналов (рис. 12). 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.

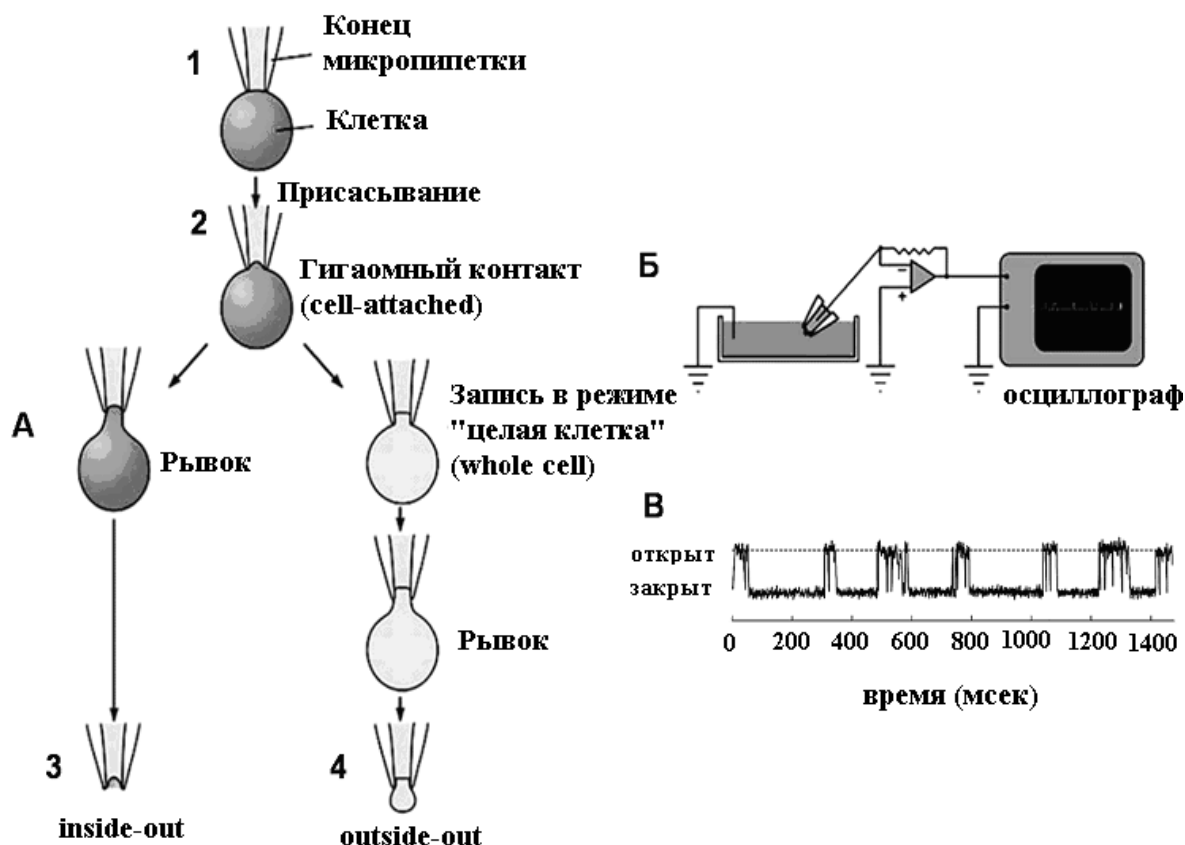


Рис. 12. Регистрация ионных токов через одиночные каналы методом пэтч-кламп.

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 et al., 2003 с изменениями).

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 пэчк-кламп - на нейронах ЦНС и в культуре клеток.

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, 1995, Kandel, Schwartz, Jessel, 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, Schwartz, Jessel, 2002).

Потенциал-активируемые K-каналы эффективно блокируются тетраэтиламмонием (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 подходы 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 Са-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 Са-каналами (Heuser, 1989). Это предположение было подтверждено после открытия факта, что ω -конотоксин GVIA необратимо блокирует потенциал-активируемые Са-каналы в моторных нервных терминалях лягушки. Флуоресцентные производные токсина специфически окрашивали места, где концентрировались крупные внутримембранные частицы. 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. 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. 13).

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

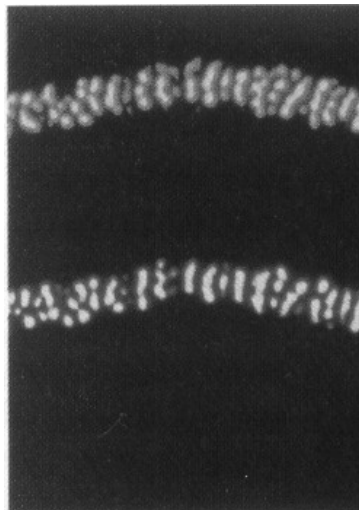


Рис. 13. Локализация пресинаптических Са-каналов и постсинаптических ацетилхолинорецепторов в нервно-мышечном синапсе лягушки.

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).

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. 14). 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.



Рис. 14. 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, Cabral, Pfuetzner et al., 1998) (Рис.15).

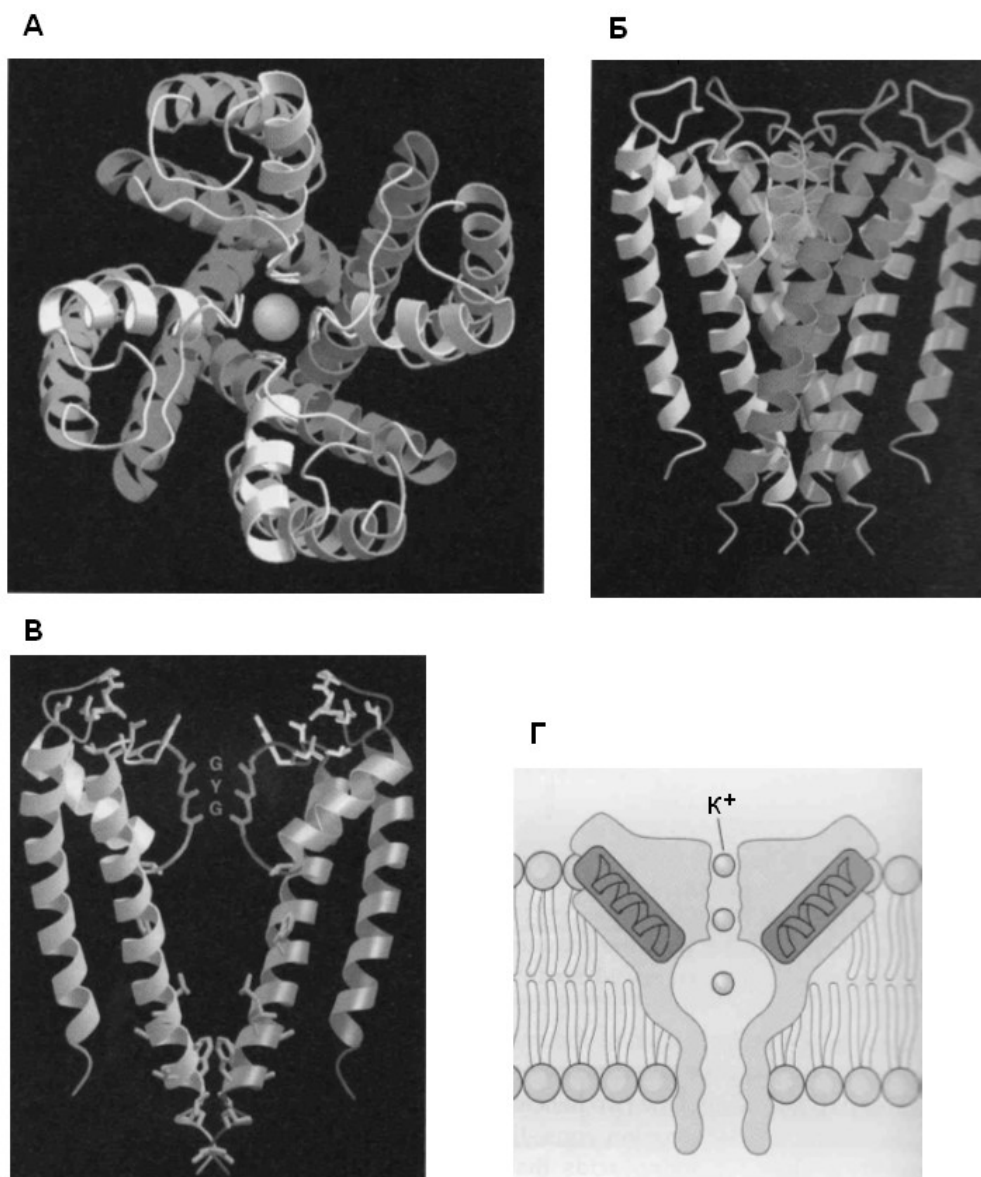


Рис. 15. Структура калиевого канала, полученная с помощью рентгенокристаллического метода

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 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. 15 А). Каждая субъединица состоит из двух трансмембранных участков, соединяющихся петлей – областью Р, которая формирует селективный фильтр канала (Рис. 15 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 et al. 2003) (Рис.15 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.15 Г) (Jiang, Lee, Chen, Ruta 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, Гафуров, Шакирьянова, 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, 1971), 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 (Hille, 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. Показано, что Na-каналы фосфорилируются протеинкиназами А и С, что приводит к уменьшению их проводимости без существенного изменения потенциал-зависимости активации и инактивации.

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.

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 ($\beta 2$) (Catteral, 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. 16). 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, а антитела, связывающиеся с тем же участком канала, замедляют инактивацию Na-каналов.

В скелетной мышце экспрессируется $\beta 1$ -субъединица, а в мозге и сердце – дополнительно $\beta 2$ -субъединица. Удаление $\beta 1$ -субъединицы

приводит к потере функциональных свойств Na-каналов, тогда как удаление $\beta 2$ -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. $\beta 1$ -субъединица оказывает влияние на величину ионного тока через канал, регулируя процессы активации и инактивации. $\beta 1$ и $\beta 2$ 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 $\beta 2$ субъединицу связываются с белками внеклеточного матрикса, 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.

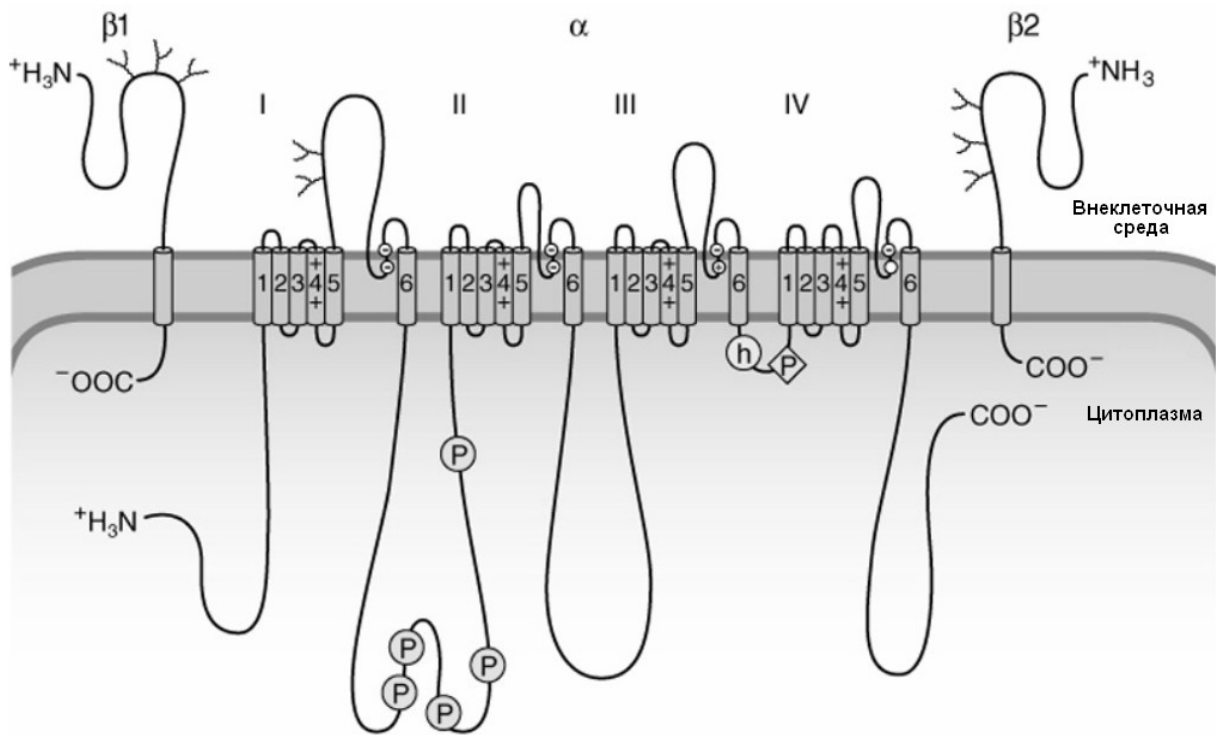


Рис. 16. Структура α и β субъединиц Na-канала.

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 С. Маленькие белые кружочки – остатки аминокислот с указанием их заряда, необходимые для высокоаффинного связывания с тетродотоксином. (Из Siegel et al., 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, 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.

Первая группа. Токсины данной группы блокируют ионную проводимость Na-канала. К ним относится алкалоид тетродотоксин –

хорошо известный токсин, обнаруженный в рыбе фуга (Tetrodontidae). Блокирующий эффект тетродотоксина ярко выражен в двигательном нервном окончании и известен достаточно давно. Аналогичным блокирующим эффектом обладают сакситоксин и неотоксин. μ -конотоксины, выделенные из яда морских змей семейства Conus, блокируют Na-каналы в электрических пластинках электрического угря, в нейронах аплизии и в мышечных волокнах, но неэффективны в двигательных нервах лягушки, млекопитающих и в ЦНС крысы.

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: 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. Батрахотоксин вызывает кратковременное увеличение спонтанного освобождения АХ в нервно-мышечном соединении млекопитающих.

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. Анемонотоксины I, II, III, продлевая ПД нерва, вызывают спонтанную и повторную активность.

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. Предполагается, 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. Семь сходных токсинов были изолированы и выделены из *Tityus bahiensis* и *Tityis stigmurus*.

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. Цигуатоксин, выделенный из морской динофлагелляты *Gambrierdiscus toxicus*, увеличивает квантовое освобождение в нервно-мышечном соединении лягушки. Цигуатоксин-1b вызывает набухание перехватов Ранвье, модифицируя Na-каналы, что сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов натрия.

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.

Длительно активируемые Na-каналы

Большинство Na-каналов быстро активируется и инактивируется в течение нескольких миллисекунд. В ряде клеток были обнаружены Na-каналы, которые активируются при более отрицательных потенциалах, чем «нормальные» Na-каналы, и длительное время не закрываются.

3.2. Калиевые каналы (К-каналы)

К-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, Ситдикова, 2002, 2010). Кроме потенциал-активируемых К-каналов, имеется широкий спектр К-каналов более или менее чувствительных к МП и активируемых или ингибируемых экзо- и эндогенными лигандами. Потенциал-нечувствительные К-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. 17 и 18). 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.

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. 17) (Siegel et al., 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. 18).

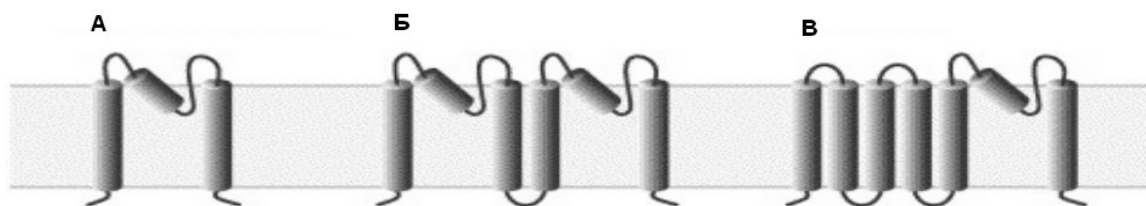


Рис. 17. Классификация К-каналов по количеству трансмембранных (ТМ) сегментов и порообразующих областей α -субъединицы:

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 et al., 2001 с изменениями).

Гены, кодирующие белок К-канала, впервые были клонированы у Дрозофилы в 1987 году. 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 18).

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 (рис 18). 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. 6 и 18) (Meir, Ginsburg, Butkevich 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). 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. 7). Оба типа инактивации обнаружены в большинстве эукариотических клетках животного и растительного царств, 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 $\beta 1$ -субъединицы как, например, для $K_v1.1$.

Потенциал-активируемый
К-канал

Са-активируемый
К-канал

К-канал
аномального выпрямления

АТФ-зависимый
К-канал

К-канал утечки

Рис. 18. Схематическое изображение α -субъединиц различных групп К-каналов.

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

К-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 К-тока в гигантском аксоне кальмара (Hodgkin, Huxley,, 1952), 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, Molgo, 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. В некоторых нейронах, имеющих длительный ПД, ток через Kdr-каналы также участвует в реполяризации, но воротная кинетика каналов более медленная. Так, в сенсорных нейронах аплии Kdr-каналы активируются в течение 100-200 мс и инактивируются в течение 0.5 с. Другой относительно медленный K-ток со временем активации 100 мс был зарегистрирован в нервном окончании цилиарного ганглия цыпленка. Наконец, методом пэтч-кламп в нервных окончаниях гипофиза был обнаружен Kdr-ток с проводимостью одиночного канала 27 пСм. 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. 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 аплии и морской свинки. 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. 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, 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. Получены доказательства присутствия K_A -каналов в двигательных нервных окончаниях лягушки, 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. Медленно активирующийся K_S -канал был обнаружен в изолированных нервных окончаниях гипофиза. Временная константа активации составляет 4 с при -50 мВ и уменьшается до 700 мс при -40 мВ.

Кальций-активируемые K -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 (Зефиоров, Халилов, Хамитов, 1987, Meir, Rahamimoff, 1999, Cowan, Sudhof, Stevens, 2000). Целый ряд токсинов эффективно влияют на функцию K_{Ca} -каналов. К ним необходимо отнести токсины скорпиона - харибдотоксин и ибериотоксин, апамин и бреветоксин-В.

На основе биофизических и фармакологических свойств K_{Ca} -токи можно разделить на быстрые и медленные (Meir, Rahamimoff, 1999). Первые - активируются в течение миллисекунд, участвуют в реполяризации ПД и селективно блокируются харибдотоксином. Медленные K_{Ca} -токи активируются с задержкой в несколько десятков миллисекунд, вносят вклад в следовую гиперполяризацию ПД и блокируются апаминном.

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. K_{Ca} -каналы малой проводимости (SK-каналы) имеют проводимость менее 100 пСм и слабо чувствительны к ТЭА, действующему внутриклеточно. Для активации каналов необходима внутриклеточная

концентрация ионов Ca в пределах от 10 нМ до 100 мкМ и сдвиг МП до -30-40 мВ. Вероятность открытия каналов увеличивается в e раз на каждые 8-15 мВ деполяризации. Увеличение внутриклеточного кальция сдвигает потенциал-зависимость активации в отрицательную сторону, то есть меньшая деполяризация необходима для активации каналов при высоких концентрациях ионов Ca . В нервных окончаниях задней доли гипофиза зарегистрированы K_{Ca} -каналы, имеющие проводимость от 193 до 331 пСм. В эфферентных улитковых нервных окончаниях проводимость K_{Ca} -каналов составляет 221 пСм, каналы блокируются внеклеточным ТЭА и харибдотоксином.

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. Некоторые клинически используемые препараты блокируют K_{Ca} -каналы. Это - аминогликозидные антибиотики, антималярийный препарат сульфат хинина.

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-poke* в третьей хромосоме дрозофилы специфически уничтожает K_{Ca} -токи. 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, однако добавляется дополнительный домен (*S0*) со стороны NH_2 -конца белка (Рис. 18). Участок связывания с ионами Ca , 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. Можно думать, что K_{Ca} -канал, является членом суперсемейства, включающего потенциал-активируемые Na -, K -, Ca -каналы и каналы, управляемые вторичными посредниками. Были клонированы также гены, кодирующие K_{Ca} -каналы у мыши и человека.

Был также охарактеризован ген, кодирующий β -субъединицу K_{Ca} -канала. 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.

Таким образом, ВК-каналы управляются как Са, так и МП, то есть являются молекулярными интеграторами электрических событий на плазматической мембране и активации систем внутриклеточных посредников. ВК-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, Hermann, Levitan, 2002). Функции ВК-каналов могут модулироваться целым рядом внутри и внеклеточных факторов, включая изменение их окислительно-восстановительного статуса. Оказалось, что газообразные посредники – оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H₂S) модулируют активность данного типа каналов. В частности показано, что H₂S усиливает активность ВК-каналов в культуре гипофизарных клеток GH₃ крысы и этот эффект связан с восстанавливающим действием газа на канальный белок (Sitdikova, Weiger, Hermann, 2010).

Некоторая информация имеется о молекулярных свойствах K_{Ca}-каналов малой проводимости, блокируемых апамином. Используя антитела к апамин-связывающему белку в ряде препаратов, включая синаптосомы мозга, был клонирован кодирующий его ген. Предполагается, 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 Са, участок фосфорилирования протеинкиназой С 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, сопровождающееся увеличением входящего Са-тока, во-вторых, исчезновение следовой гиперполяризации в течение нескольких миллисекунд после ПД. Первый эффект объясняется выключением быстрого K_{Ca}-тока, второй - медленного. Несмотря на то, что K_{Ca}-каналы могут регулировать длительность ПД нервного окончания и управлять входом ионов Са, 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, тогда как другие - эти эффекты не подтвердили.

Не исключено, что K_{Ca}-каналы играют определенную роль при ритмической активности. Во время высокочастотной стимуляции происходит значительное увеличение внутриклеточного кальция и, как следствие, усиление K_{Ca}-тока. Активация K_{Ca}-каналов может вызывать

ре- и гиперполяризацию мембраны, ограничивать Са-вход и, таким образом, уменьшать секрецию медиатора. По крайней мере, два факта поддерживают эту гипотезу. Во-первых, существование Са-зависимой гиперполяризации мембраны нервных окончаний и выпадение ПД при высокочастотной стимуляции. 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. В слуховых волосковых клетках K_{Ca} -каналы участвуют в настраивании на определенную частоту и в предохранении от сверхчастотной активации.

В пресинаптических структурах K_{Ca} -каналы расположены в активных зонах - вблизи Са-каналов. Это стратегическое расположение позволяет им быстро активироваться в ответ на поступление ионов Са в терминаль.

К-каналы аномального выпрямления (K_{ir} -каналы). К-каналы аномального выпрямления называются так потому, что входящий ток проходит через них с большей легкостью, чем выходящий, поэтому их назвали 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. K_{ir} -каналы обнаружены в скелетных мышцах, клетках сердца, в нейронах ЦНС позвоночных и беспозвоночных животных (Hille, 2001). K_{ir} -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. K_{ir} -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 K_{ir} -каналов в нервных окончаниях мозга крысы, а также таламокортикальных и гиппокампальных нервных терминалях. Семейство K_{ir} -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. K_{ir} -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. 18). 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 аспарат обеспечивает сильное выпрямление, а нейтральный аспарагин – слабое выпрямление. Присутствие остатка лизина на NH₂-конце обеспечивает чувствительность к рН.

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. 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. 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, он проводит задержанный входящий выпрямляющий ток.

АТФ-зависимые К-каналы (K_{АТФ}-каналы). К-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. K_{АТФ}-каналы показаны в адренергических нервных окончаниях крысы, ГАМК-ергических нервных окончаниях субстанции nigra крысы и холинергических двигательных нервных окончаниях мышцы. С помощью метода пэтч-клапм K_{АТФ}-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. Вероятность открытия каналов не зависит от внутриклеточного кальция и блокируется 100 мкМ толбудамида. Активность каналов блокируется ТЭА в высоких концентрациях и глибенкламидом. К активаторам каналов относятся кромакалим и diazoxid. Обнаружено также, что некоторые мембранные фосфолипиды связываются с K_{АТФ}-каналами, что приводит к увеличению вероятности их открытия и уменьшению чувствительности к АТФ. K_{АТФ}-каналы вовлекаются в поддержание МП покоя, когда содержание энергии в клетке снижено, например, при ишемии, гипоксии, гипогликемии.

Роль K_{АТФ}-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_{АТФ}-каналов, деполяризации мембраны, активации потенциал-активируемых Ca-каналов, входу в клетку ионов Ca и секреции инсулина. Сульфонилуреа, такие как глибенкламид и толбудамид, которые ингибируют K_{АТФ}-каналы, используют для лечения диабета 2 типа, так как они стимулируют секрецию инсулина. 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. K_{АТФ}-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) (рис. 18, 19). 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. 19).

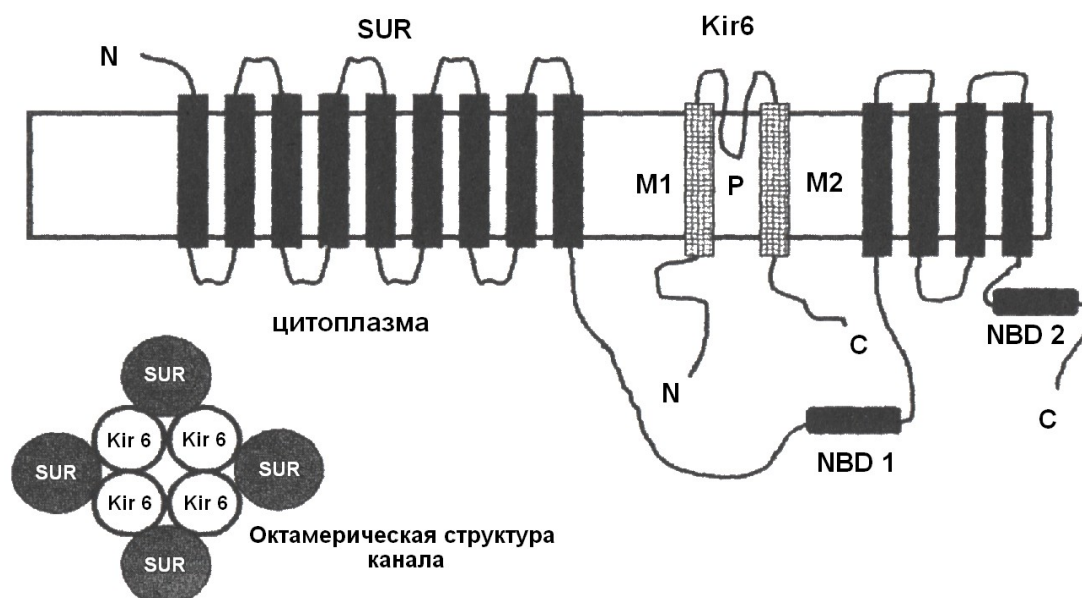


Рис. 19. Структура K_{ATP} -канала.

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.

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. 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 и субстанции нигра крысы за счет активация K_{ATP} -каналов и последующей гиперполяризации мембраны.

K-каналы утечки. Токи утечки были описаны более 50 лет назад (Hodgkin, Huxley, 1952). 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. 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. Ингибирование K-каналов утечки в покое является широко распространенным механизмом действия серотонина, норадреналина, вещества P, ГАМК, глутамата, тиреотропного гормона, АХ, которые увеличивают нейрональную возбудимость. Однако, существование канального механизма, ответственного за токи утечки, долгое время оставалось под вопросом. Только сейчас стало ясно, что калиевая утечка это ток через специальные K-каналы (Goldstein, Bockenhauer, O'Kelly, Zilberberg, 2001). Исследования молекулярной структуры K-каналов утечки показали, что каждая из субъединиц нового семейства K-каналов имеет по два домена, формирующих пору, в отличие от семейств K_v - и Kir-каналов, и четыре трансмембранных сегмента (Рис. 18). Идентифицировано более 50 генов данного семейства каналов, а 14 из них клонировано и исследовано. Клонированные K-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. hslow-бета - 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 стехиометрией. 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. 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. 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. 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. 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. Канал, состоящий из 5 гомологичных мембранных субъединиц, содержит внеклеточные лиганд-связывающие и цитоплазматические модуляторные участки. 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.

ГАМК-активируемые Cl-каналы. ГАМК является основным тормозным медиатором в ЦНС (Зефилов, Хазипов, Бен-Ари, 1998). Ее роль была впервые описана в нервной системе беспозвоночных. 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. 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. 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. 20 А). Активность ГАМК_A-каналов может модулироваться оксидом азота (NO), фосфорилированием протеинкиназой А и кальций/фосфолипид зависимой протеинкиназой С. 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 (рис. 20 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.

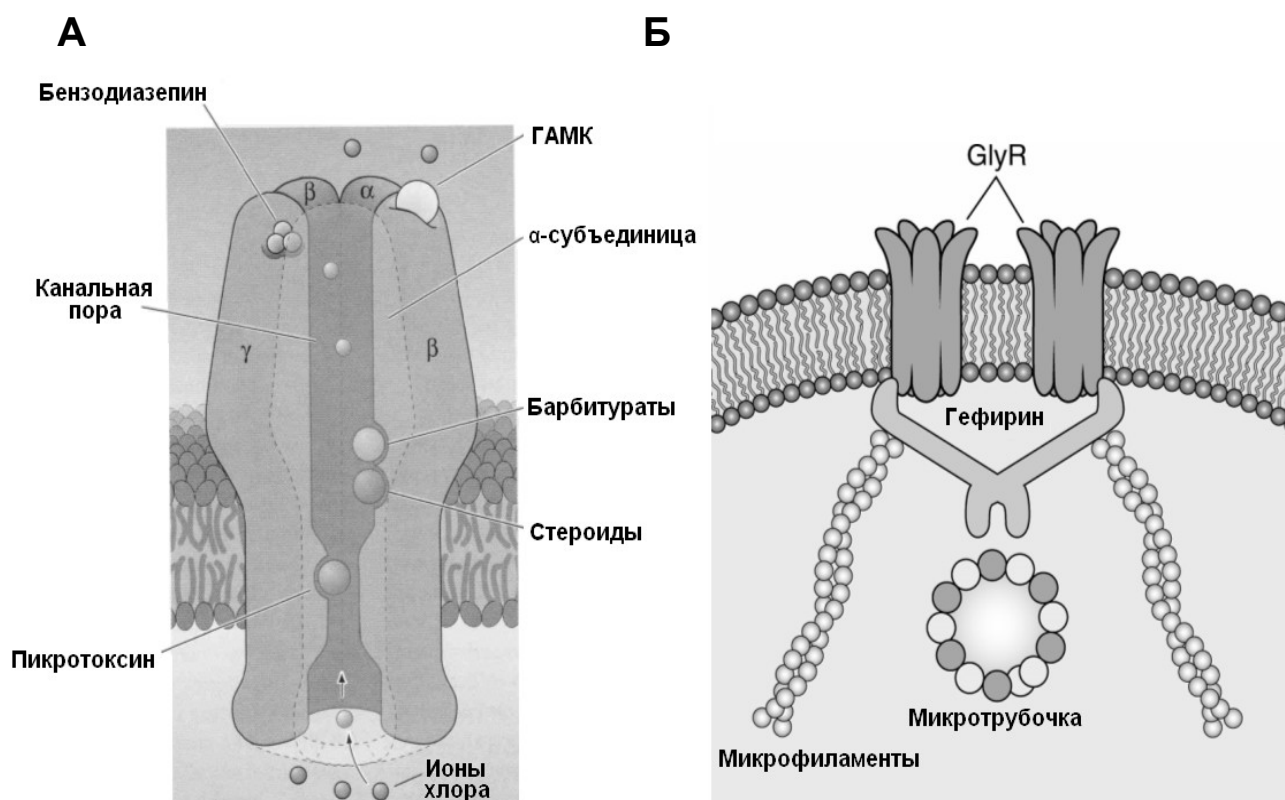


Рис. 20. ГАМК- и глицин- активируемые Cl-каналы

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 et al., 2006 с изменениями).

Рецепторно-канальный комплекс ГАМК_С Cl-канала был впервые описан в 1975 году, а его принадлежность к типу ГАМК-каналов была определена только в последние годы. Канальные и фармакологические свойства отличаются от свойств семейства ГАМК_А-каналов. Время открытого состояния ГАМК_С-канала составляет 150-200 мс, проводимость 3-7 пСм, рецептор характеризуется очень медленной десенситизацией.

ГАМК_С-каналы были обнаружены в пресинаптических нервных окончаниях сетчатки позвоночных, и, по-видимому, участвуют в процессах обработки зрительной информации, модулируя секрецию медиатора в биполярных клетках. ГАМК_С-каналы были также обнаружены в передней доле гипофиза и грудном ганглии омара.

Три различные субъединицы ГАМК_С-канала, названные ρ_{1-3} , были клонированы из разных тканей. 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. ρ_1 и ρ_2 субъединицы могут формировать функционирующий канал, будучи экспрессированными в ооциты *Xenopus*. Большая часть фармакологических исследований ГАМК_С-каналов проведена на препаратах сетчатки крысы или ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих рекомбинантные субъединицы ρ_1 и ρ_2 . ГАМК_С-каналы чувствительны к пикротоксину, аналогам ГАМК и нечувствительны к бикикуллину и баклофену, селективному агонисту ГАМК_В-рецепторов. Показано, что в биполярных клетках сетчатки крысы регуляция ГАМК_С-канала включает фосфорилирование при помощи протеинкиназы С через G-белок. Показано также, что дофамин и активаторы аденилатциклазы (форсколин) селективно уменьшают токи через ГАМК_С-каналы. Предполагается, что дофамин модулирует функцию ГАМК_С-каналов в нервной системе позвоночных животных.

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. Глицин-активируемые Cl-каналы были продемонстрированы в синаптонейросомах различных отделов мозга крысы, где аппликация глицина вызывает вход Cl⁻, который блокируется стрихнином – ингибитором постсинаптических глицин-активируемых каналов. Эффекты стрихнина и пикротоксина, специфического ингибитора ГАМК_А-каналов, являются аддитивными, что указывает на сосуществование глицин-активируемых и ГАМК_А-каналов в мозге крысы. Глициновый рецептор был первым рецептором, изолированным из ЦНС млекопитающих. 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. Гефирин также колокализуется с ГАМК_A-рецепторами. Структура субъединиц глицин-активируемых Cl-каналов имеет те же основные характеристики, что и субъединиц ГАМК_A-каналов (рис. 20 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. 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.

Кальций-активируемые Cl-каналы (Cl_{Ca}-каналы). Cl-каналы, активируемые внутриклеточным кальцием, обнаружены во многих клеточных типах, включая эпителиальные, нервные, гладкомышечные, кардиальные (Jentsch, Thomas, 2002). Cl_{Ca}-каналы участвуют в регуляции клеточного объема многих клетках. 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 цГМФ-активируемые каналы.

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. Макси-каналы имеют проводимость 310 пСм и обладают потенциал-зависимой инактивацией. Мини-каналы имеют проводимость от 3 до 70 пСм и не инактивируются потенциалом. Предположено, 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 et al., 2002). 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 электроцитов *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 ClC-KA и ClC-KB каналы нуждаются в β -субъединице барритине (рис. 21 А).

ClC-1 каналы экспрессируются в скелетных мышцах и обеспечивают 70–80% проводимости мембраны скелетных мышц в покое. Экспрессия ClC-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, поэтому ток одиночного канала очень мал – ниже 0.1 пА. ClC-2 повсеместно экспрессируются в различных тканях и могут активироваться гиперполяризацией, набуханием клетки, внеклеточным закислением. Предполагают их роль в трансэпителиальном транспорте. ClC-3 каналы присутствуют в эндосомах и синаптических везикулах. У мышцей, нокаутированных по ClC-3, наблюдается дегенерация гиппокампа и сетчатки, при этом нарушается процесс закисления синаптических везикул, что предполагает роль ClC-3 в обеспечении заполнения везикул медиатором. ClC-4 каналы экспрессируются в скелетных мышцах, сердце и почках.

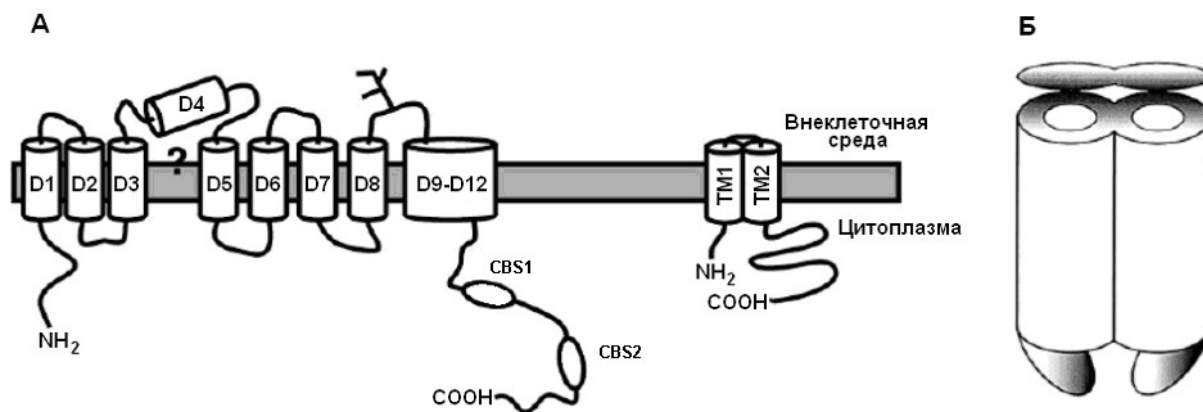


Рис. 21. Топология потенциал-активируемых Cl-каналов, основанная на биохимических исследованиях

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 ClC-K каналов связаны с β -субъединицей - барритином, пронизывающую мембрану дважды (на рис.А справа). Б - ClC-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 et al., 2002 с изменениями).

ClC-5, ClC-KA и ClC-KB специфичны для почек и формируют анионные каналы в клетках проксимальных трубочек. Два почечных канала ClC-K представляют собой гетеромерный комплекс с барритином и участвуют в трансэпителиальном транспорте в различных сегментах нефрона. Кроме того, ClC-KA/барритин и ClC-KB/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 et al., 2002).

Исследования последних лет свидетельствуют, что, по всей видимости, ClC каналы представляют собой димеры с порой в каждой субъединице (Jentsch et al., 2002) (рис. 21 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. Некоторые из каналов также управляются изменением рН, набуханием клетки и фосфорилированием.

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, 1992, Cowan, Sudhof, Stevens, 2000). Различают Ca -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 Ca -каналов: инозитолтрифосфатные и рианодиновые (Балезина, 2002).

Ca -каналы плазматической мембраны. Первоначально по порогу активации были выделены высокопороговые, активирующиеся при значительных сдвигах МП, и низкопороговые Ca -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 Ca -каналов относятся нимодипин, нифедипин, верапамил, тетрандипин, дилтиазем, D-600, этанол, ионы Cd , токсин морской змеи *Conus Geographus*, называемый ω -конотоксином GVIA. Блокаторами N-типа Ca -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) Ca -каналов, блокируется ядом

воронковых пауков, пептидным токсином FTX, ω -агатоксином IVA и ионами Cd, Co, La. При исследовании Ca-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 Ca-каналов незначительны, поэтому их часто объединяют и обозначают как P/Q-тип Ca-каналов. Низкопороговые каналы были названы T-типом каналов (T-transient). Показано, что антигипертензивное вещество мибефрадил селективно блокирует T-тип Ca-каналов. Поскольку L, N, P/Q, T-типы Ca-каналов являются потенциал-активируемыми, заблокировать Ca-вход можно длительной деполяризацией, небольшой по величине (для инактивации T-типа Ca-каналов), и смесью, содержащей блокаторы Ca-каналов - дигидропиридин, ω -колотоксин 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, Ginsburg, Butkevich et al , 1999).

Структура Ca-каналов. Гены, кодирующие некоторые типы Ca-каналов, клонированы, определены аминокислотные последовательности основных канальных субъединиц. 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. 22). 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 A 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, образующаяся в результате посттрансляционного протеолиза. 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 $\alpha 1$ -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 $\alpha 1$ -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, 2000).

Разнообразие структуры и функции Ca-каналов увеличивается множественностью β -субъединиц, которые связаны с $\alpha 1$ -субъединицей с внутриклеточной стороны мембраны и влияют на инактивацию канала. 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 $\alpha 1$ -субъединицы. Идентифицированы также гены,

кодирующие $\alpha 2\delta$ -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. 22).

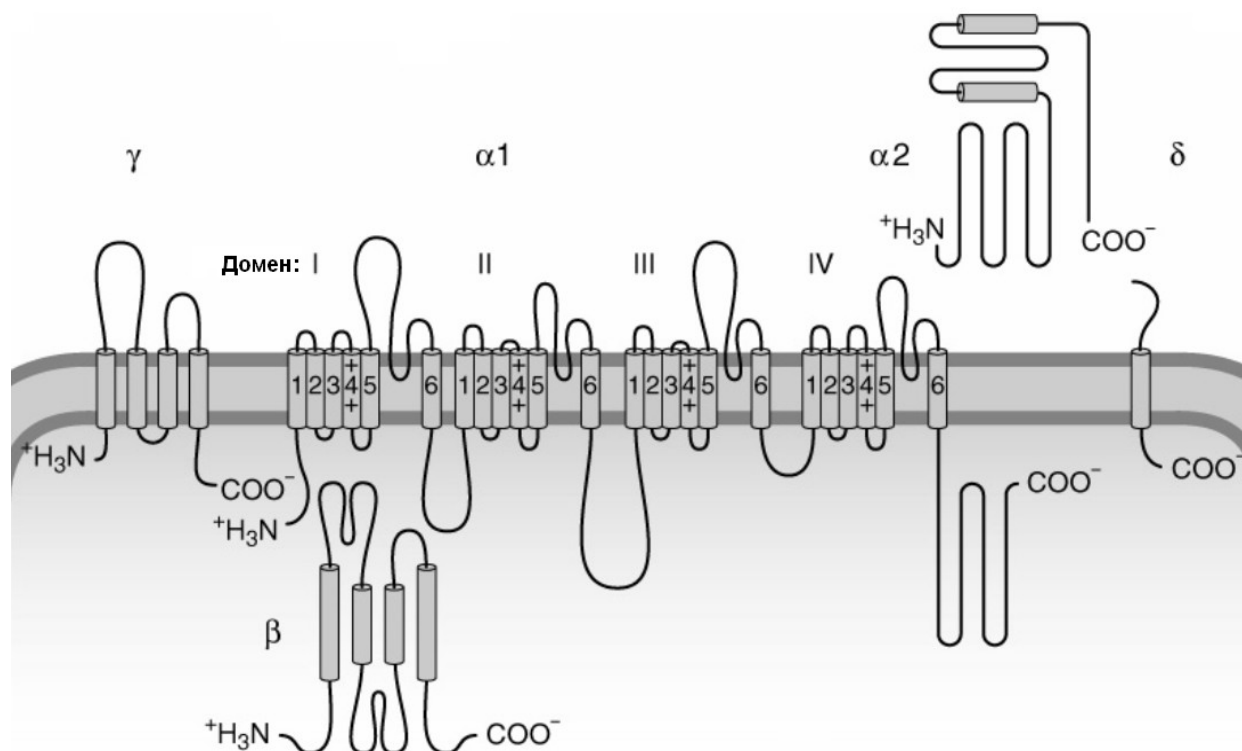


Рис.22. Первичная структура субъединиц Ca-канала.

Представлены субъединицы, образующие Ca-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 et al., 2006 с изменениями).

Внутриклеточные Ca-каналы. Хотя цитоплазматическая концентрация свободных ионов Ca мала, значительное количество Ca находится во внутриклеточных структурах. Запасенный в них Ca может высвободиться в ответ на адекватные стимулы через Ca-каналы. В различных клетках описано большое количество структур, которые утилизируют внутриклеточный кальций (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 (Балезина, 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. 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. Показано, что каналы Ри- и ИФ₃-рецепторов присутствуют в гиппокампе, таламусе, мозжечке и других отделах ЦНС. С помощью иммуоцитохимического маркирования каналы ИФ₃-рецепторов обнаружены в пресинаптических нервных окончаниях фоторецепторных и биполярных клеток сетчатки, а также в синаптических бутонах таламических нейронов.

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. 23). 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. 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, 2002).

В настоящее время охарактеризованы три разновидности молекул Ри-рецепторов (Балезина, 2002), все они имеются в нервной ткани, но наиболее распространенным в ЦНС является второй тип. Первый и второй типы Ри-рецепторов активируются (помимо Са и АТФ) рианодином и кофеином, однако, различаются чувствительностью к дантролену, который инактивирует лишь первый тип. Третий тип Ри-рецепторов активируется ионами Са, рианодином (в наномолярных концентрациях), не чувствителен к действию кофеина и блокируется дантроленом. 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. Кофеин при связывании с Ри-рецептором, во-первых, сенсibiliзирует молекулу Ри-рецептора к ионам Са, а, во-вторых, способен сам открывать Са-канал. 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. 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.

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.

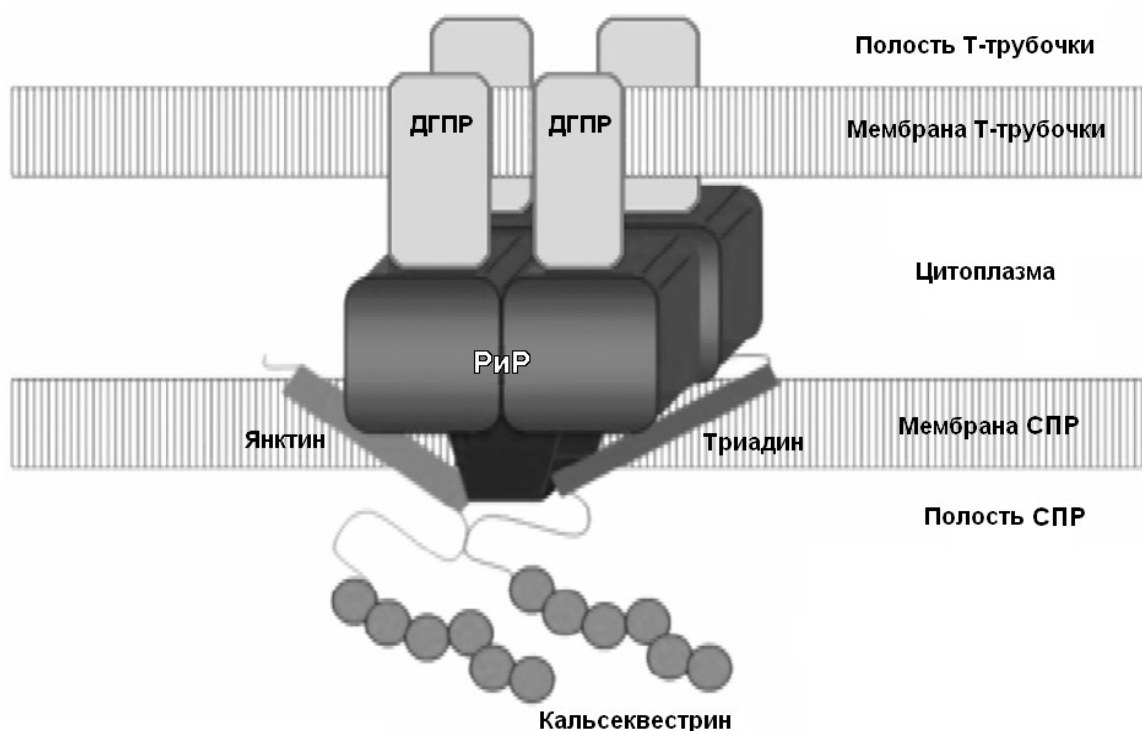


Рис. 23. Схема, показывающая тетрамёрную структуру риадинового рецептора, встроенного в мембрану саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы.

Риадиновый рецептор (РиР) имеет трансмембранную часть, содержащую ионный канал и встроенную в мембрану саркоплазматического ретикулума (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.

Каналы рецептора инозитолтрифосфата (ИФ₃-рецепторы). ИФ₃ относится к вторичным посредникам, образующимся при активации фосфолипазы С гормонами и нейромедиаторами, расщепляющей фосфатидинозитолдифосфат мембраны. 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. 24). Ионный канал

ИФ₃-рецептор имеет проводимость порядка 45 пСм. 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 Рн-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. Показано, что ИФ₃ активирует также Са-каналы в плазматической мембране нервных окончаний мозга, вызывая Са-вход через поверхностную мембрану и освобождение Са из внутриклеточных депо (Foskett, White, Cheung, Mak, 2007).

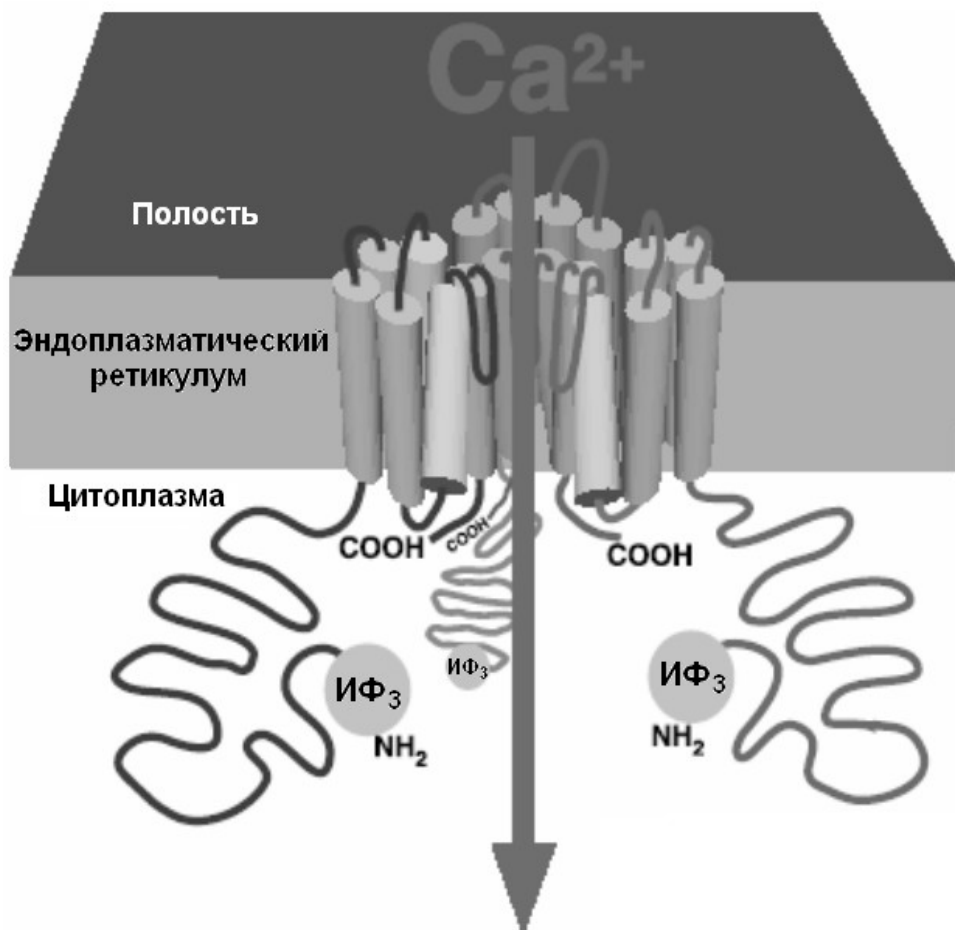


Рис. 24. Рецептор инозитол-3-фосфата.

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 Са при связывании цитоплазматических участков N-конца рецептора с инозитол-3-фосфатом. (Из Foskett et al., 2007 с изменениями).

На срезах гиппокампа показано, что в центральных глутаматергических синапсах опустошение внутриклеточных Ca-депо терминалей циклопиазоновой кислотой приводит к быстрому развитию специального Ca-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.

3.5. Каналы синаптических везикул

В синаптических везикулах, изолированных из нервных окончаний электрического органа Torpedo и нейросекреторных терминалей гипофиза, были идентифицированы несколько типов ионных каналов. Большая часть каналов везикул неселективны. Некоторые каналы являются потенциал-активируемыми или Ca-активируемыми. В мембране синаптических везикул обнаружены Cl-каналы низкой проводимости и неселективные каналы, проводящие ионы K и Cl и активирующиеся при изменении МП и повышении Ca. Проводимость канала составляет 246 пСм, он открывается при потенциале около 0 мВ и не активируется при гиперполяризации мембраны. 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, Ginsburg, Butkevich et al. 1999).

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 et al.,

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, которой связывается с Н-АХ-рецепторами. Открытие каналов рецепторов приводит к деполяризации мембраны, возникновению постсинаптического потенциала и ПД (Siegel et al., 2006).

Мышечные Н-АХ-рецепторы представляют собой пентамерную структуру, состоящую из двух α и по одной β , γ и δ -субъединиц (Рис. 25). 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. 25). 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 et al., 2006).

Нейрональные Н-АХ-рецепторы можно разделить на 2 класса: чувствительные к никотину и чувствительные к антагонисту мышечных Н-АХ-рецепторов α -бунгаротоксину. 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. Некоторые субъединицы были клонированы ($\alpha_{4,5,7}$ и β_{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 Са. 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 Са, 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. 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. 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, Ginsburg, Butkevich et al., 1999). Показано, что при заболевании Альцгеймера, болезни Паркинсона и шизофрении происходит уменьшение количества нейрональных Н-АХ-рецепторов в коре мозга, которое предшествует дегенерации холинергических и дофаминергических нейронов.

А

Б

5 нм

Рис. 25. 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 et al., 2003).

Каналы глутаматных рецепторов. Глутамат является самым распространенным в мозге медиатором и активирует шесть различных классов рецепторов (рис. 26), три из которых являются ионотропными рецепторами (Siegel et al., 2006). Каждый класс имеет собственные фармакологические и функциональные особенности. Существенных различий в фармакологических свойствах пре- и постсинаптических глутаматных рецепторов выявлено не было. 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.

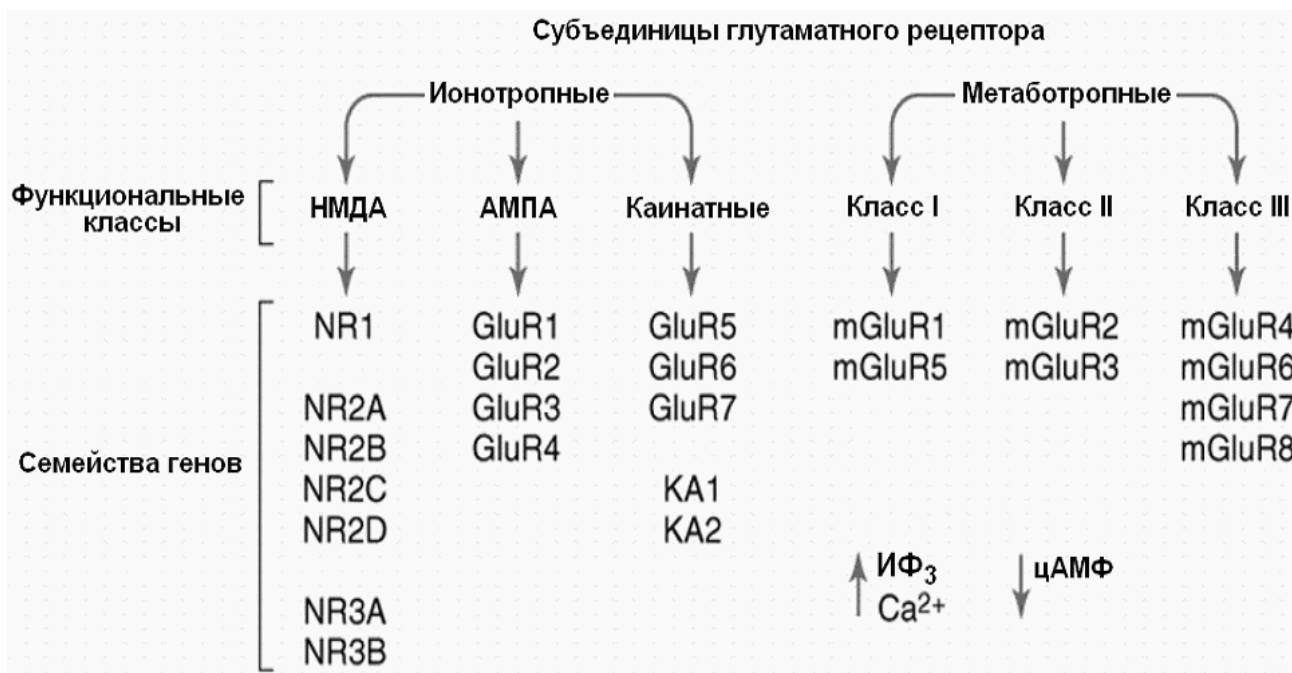


Рис. 26. Функциональные и молекулярные разновидности рецепторов глутамата.

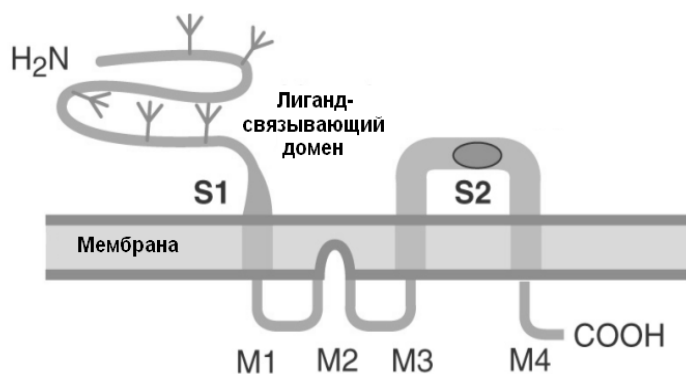
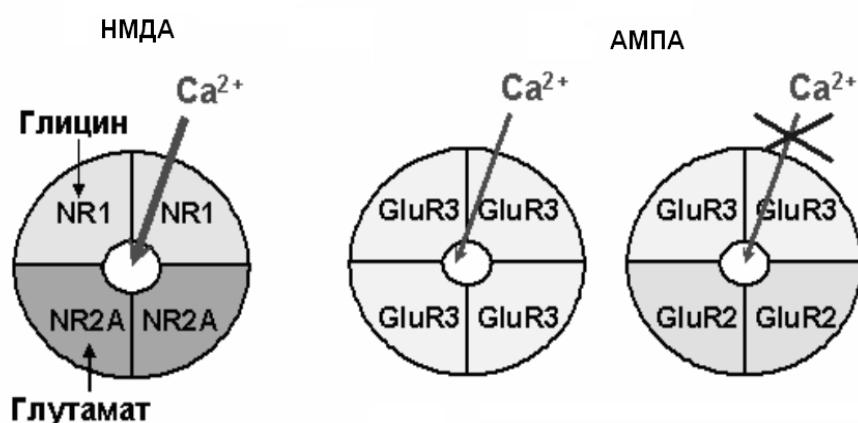
Два основных типа глутаматных рецепторов (ионотропные и метаботропные) включают по три функционально различные класса рецепторов. Каждый из рецепторов в классе состоит из отдельных субъединиц, кодирующихся различными генами. Субъединицы ионотропных рецепторов глутамата образуют ионные каналы, проницаемые для катионов. Метаботропные рецепторы глутамата - это G-белок-связанные рецепторы, активация которых регулирует синтез или деградацию внутриклеточных вторичных посредников. (Из Siegel et al., 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. 27). Трансмембранная

топология глутаматного рецептора отличается от таковой никотинового рецептора. Полипептид содержит три трансмембранных домена M₁, M₂ и M₄ (Магазаник, 2007). NH₂-конец направлен внеклеточно, COOH-конец – внутриклеточно. M₂ домен формирует петлю-шпильку, образующую внутреннюю пору канала (рис. 27 А). Конфигурация сходна с K-каналами, что предполагает общее происхождение двух классов ионных каналов. Ионные каналы глутаматных рецепторов проницаемы для ионов Na и Ca, но ионная селективность зависит от субъединичной композиции рецептора (рис. 27 Б) (Магазаник, 2007).

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).

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 блок 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.

А**Б****Рис. 27. 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 et al., 2006 с изменениями).

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. 27 Б). Проницаемость для Са определяется субъединичным составом рецептора, однако, в любом случае, она будет значительно ниже чем, для НМДА-рецепторов. Ионный канал АМРА-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 магниевый блок НМДА-рецепторов. Субъединицы GluR1-GluR4 соединяясь с КА1 или КА2 также могут образовать **каинатные рецепторы** (Siegel et al., 2006, Магазанник, 2007).

Пресинаптические глутаматные рецепторы модулируют освобождение глутамата или других медиаторов. Обнаружено, что активация НМДА-рецепторов увеличивает секрецию АХ в срезах мозга мыши, норадреналина в синапсосомах и срезах гиппокампа крысы, норадреналина и глутамата в синапсосомах коры морской свинки. Пресинаптические АМПА и каинатные рецепторы также могут модулировать освобождение медиатора. АМПА-рецепторы вызывают увеличение освобождения норадреналина в синапсосомах гиппокампа крысы и ГАМК в культуре клеток сетчатки. 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 (Зефиоров, Ситдикова, 2010). Они действуют на большое и разнообразное семейство P_2 -рецепторов, из которых только P_{2x} -рецепторы являются лиганд-активируемыми ионными каналами. 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. 28). P_{2x} -рецептор это гетеромультимерный протеин, образованный несколькими субъединицами, образующих гомо- или гетеротримерный функциональный ионный канал. Все P_{2x} -рецепторы проницаемы для мелких моновалентных катионов, некоторые также имеют значительную проводимость для ионов Са 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. P_{2x} -рецепторы, обнаруженные в цилиарном ганглии цыпленка, блокировались сурамином, проводимость канала составила 17 пСм. Активация пресинаптических P_{2x} -рецепторов не только модулирует освобождение медиатора, но также инициирует сенсорные сигналы без периферического входа (Meir, Ginsburg, Butkevich 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, Ginsburg, Butkevich et al., 1999).

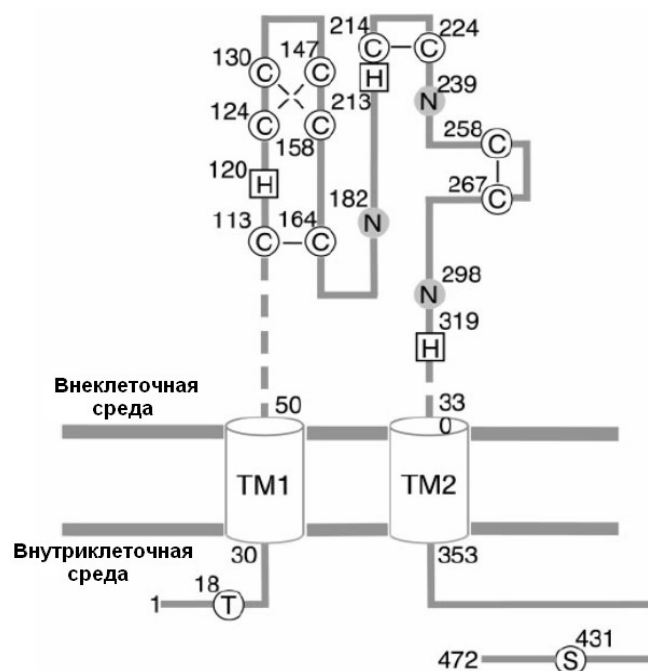


Рис. 28. Трансмембранная топология субъединицы P_{2x} -рецептора.

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

Каналы серотониновых рецепторов (5-НТ-рецепторов).

Описано 7 типов 5-НТ-рецепторов (Thompson, Lummis, 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. 5-НТ₃-рецептор состоит из пяти субъединиц, окружающих центральную ион-проводящую пору (рис. 29).

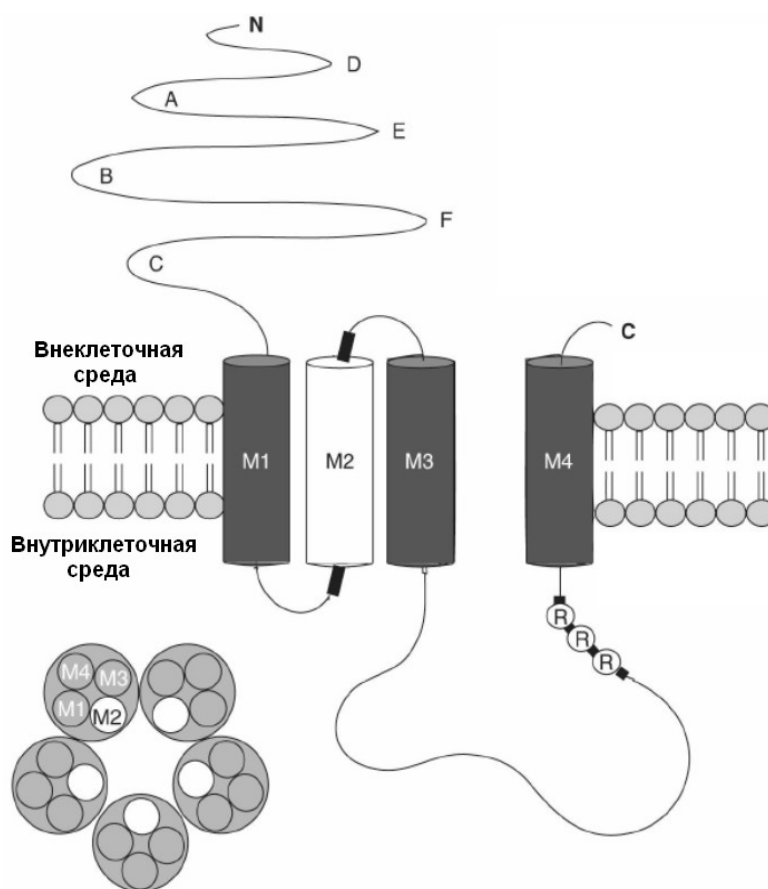


Рис. 29. Схематическое изображение 5-НТ₃-рецептора

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, выстланную сегментами M2 (Из Thompson, Lummis, 2007 с изменениями).

Субъединица 5-НТ₃-рецептора состоит из четырех трансмембранных доменов (М1–М4). Внеклеточный N-терминальный домен содержит лиганд-связывающий сайт. М2 домен каждой из субъединиц формирует внутреннее кольцо, непосредственно контактирующее с ионами, внешнее кольцо образовано доменами М1, М3 и М4 (рис. 29). Воротную часть канала образует М2 домен. Связывание 5-НТ с рецептором приводит к движению внеклеточного домена, которое передается на М2-домен и открывает ворота (Thompson, Lummis, 2007). Клонированы два типа субъединиц 5-НТ₃-рецепторов – 5-НТ_{3А} и 5-НТ_{3В}. Проводимость канала в разных препаратах варьирует от 0.31 до 16.5 пСм. 5-НТ₃-рецепторы локализованы постсинаптически и пресинаптически. Пресинаптическая локализация 5-НТ₃ рецепторов была показана в различных отделах ЦНС, а именно, в коре и стриатуме крысы, коре человека.

В спинном мозге серотонин модулирует ноцицепцию через 5-НТ₃-рецепторы. Функция пресинаптических 5-НТ₃-рецепторов пока неясна. Возможно, они работают как гетерорецепторы, модулирующие освобождение медиатора. В некоторых объектах фармакологическая активация рецепторов может вызывать увеличение уровня внутриклеточного Са и усиление секреции, тогда как в других - ингибирование секреции медиатора.

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 Са в клетку, увеличению его цитозольной концентрации и модуляции Са-зависимых процессов, ведущих к физиологическому ответу клетки. ЦН-каналы являются одним из ключевых звеньев механизмов сенсорной трансдукции в фоторецепторных, обонятельных и слуховых клетках (Каламкаров, Лунгина, 2001). Обычно ЦН-каналы являются неселективными и проницаемы для ионов Na, Са, К. Они были обнаружены и в некоторых других органах - печени, сердца, мозга, предстательной железы. ЦН-канал формирует гетеротетрамерный 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. 30). 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). Фоторецепторы сетчатки содержат цГМФ-зависимые каналы, которые опосредуют входящий темновой ток во внешнем сегменте фоторецептора.

Рис. 30. Структура субъединицы ЦН- канала.

Субъединица ЦН- канала состоит из 6 трансмембранных сегментов, NH₂- и COOH- 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, 1981). Этот ток переносится ионами Na и K. Следовательно, активация If-тока во время фазы следовой гиперполяризации вызывает медленную деполяризацию в сторону порогового уровня активации Са-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. 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, Schneider, Wahl, 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 С-терминальном участке имеется нуклеотид-связывающий домен (CNBD) (Рис. 31).

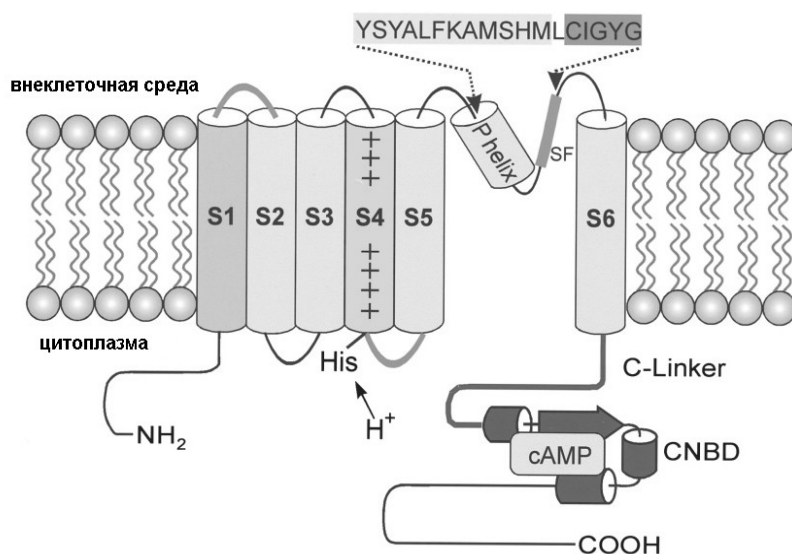


Рис. 31. Структурная модель нуклеотид-зависимых гиперполяризационно-активируемых (HCN) каналов.

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 pH. Пора канала содержит спиральный участок

(P helix) и селективный фильтр (SF). (Из Biel, Schneider, Wahl, 2002 с изменениями).

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.

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) стретч-каналы (Камкин, Киселева, Ярыгин, 2005).

Стретч-каналы могут регулироваться изменениями МП и связыванием с внутриклеточными посредниками (метаболитами арахидоновой кислоты и АТФ). Клонирование механочувствительных каналов началось недавно, один из представителей выделен у *Escherichia coli* – MscL, имеющий проводимость в 3 нСм (Hamill, Martinac, 2001) (рис.32). Некоторые K-каналы (K_{Ca}-каналы) обладают свойствами стретч-каналов. Хорошо известно, что растяжение нервно-мышечного синапса ведет к увеличению секреции медиатора. Это позволяет считать, что стретч-каналы участвуют в пресинаптических функциях.

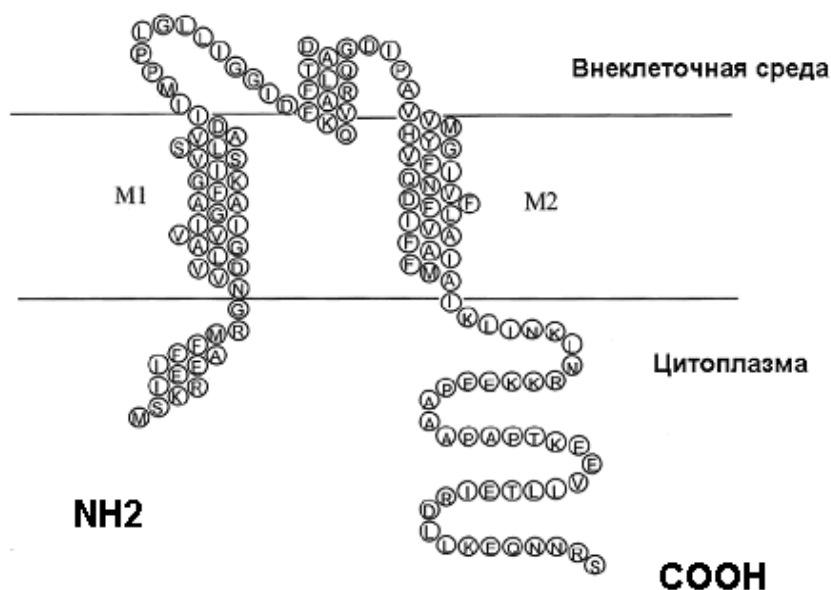


Рис. 32. Топология и аминокислотная последовательность субъединицы механочувствительного канала большой проводимости (MscL) *Escherichia coli*.

Белок имеет в своем составе две мембранопроникающих области (M1 и M2) и одну внеклеточную петлю, N- и С- концы располагаются внутриклеточно. (Из Namill, Martinac, 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, Schwartz, Jessel, 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. 33 А).

При определенных конформационных изменениях белков канал открывается или закрывается, активируя, либо прекращая передачу

информации между клетками через щелевые контакты (Saez, Berthoud, Branes et al., 2003). Щелевой контакт контролирует проницаемость между взаимодействующими клетками. В некоторых клетках (например, глиальных) подобный механизм имеет значение в регуляции уровня внутриклеточного Са. 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. 33 Б). Проводимость одиночного канала составляет около 100 пСм, вероятность открытого состояния регулируется рН, ионами Са, МП, 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, Berthoud, Branes et al., 2003).

3.9. Протон-активируемые каналы

Протон-активируемые ионные каналы (acid sensitive ion channels - ASICs) впервые были обнаружены в сенсорных нейронах. Семейство ASIC каналов включает 6 разновидностей: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4. Протон-активируемые каналы, по-видимому, являются тетрамерами, субъединица канала состоит из двух трансмембранных доменов и большой внеклеточной петли (Xiong et al., 2008) (рис. 34). Канал активируется при снижении внеклеточного рН с 7.4 до 6.9 и ниже. Канал типа ASIC1 имеет проводимость ~14 пСм, проницаем для ионов Na и Са и блокируется амилоридом в концентрациях от 0.1 до 1 мМ. Считается, что основная функция ASICs – это восприятие боли, вызванной закислением. Некоторые пептиды, а также арахидоновая кислота увеличивают активность ASIC. Протон-активируемые каналы с различной чувствительностью к рН и кинетикой были обнаружены в сенсорных нейронах, а также в нейронах ЦНС, олигодендроцитах.

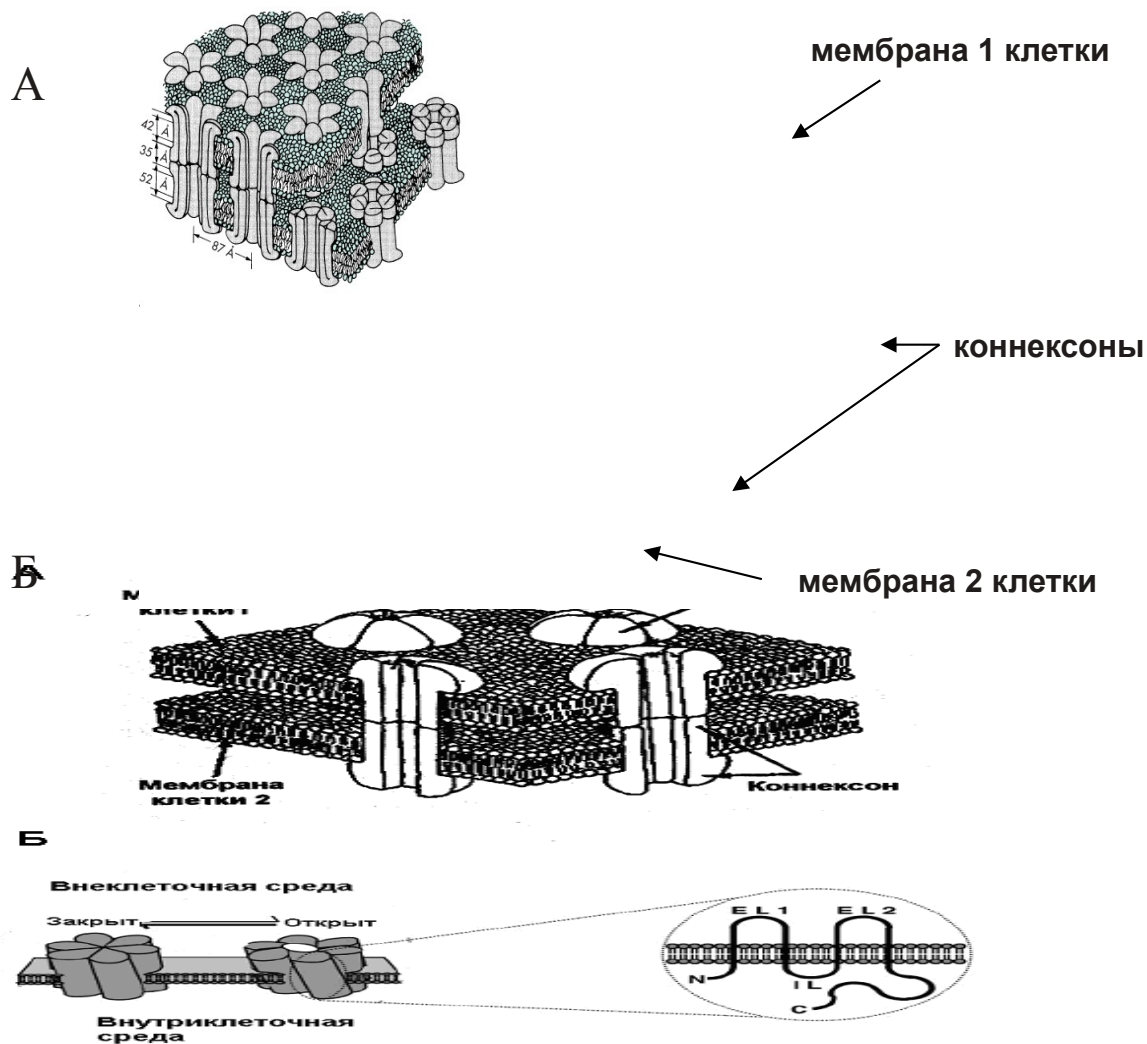


Рис. 33. Локализация и строение коннексонов, образующих щелевой контакт.

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 C-концы, две внеклеточные (EL) и одну внутриклеточную (IL) петлю. (Из Saez et al., 2003 с изменениями).

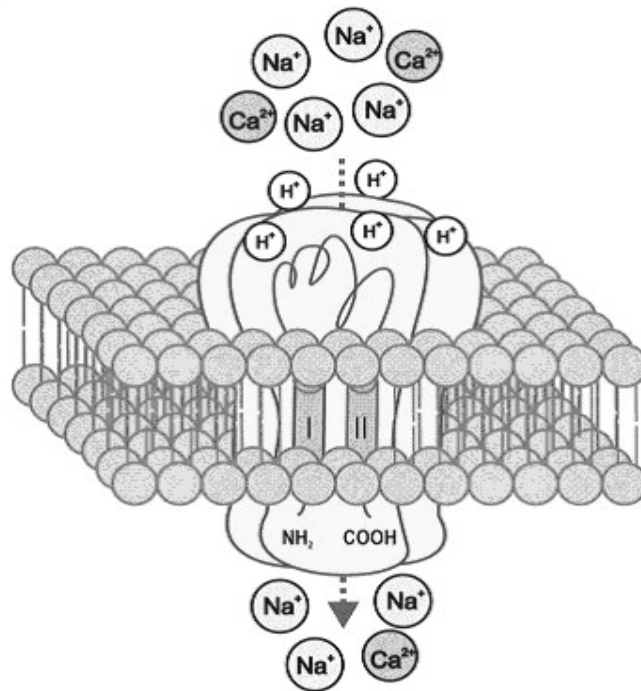


Рис. 34. Тетрамерная структура протон-активируемого ионного канала.

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 C- терминальными участками. Для гомомерного канала ASIC1a активация протонами приводит к току ионов Na and Ca через канал. (Из Xiong et al., 2008).

3.10. Аквапорины

Аквапорины (AQP) – семейство мембранных каналов, являющихся селективными для воды во многих тканях и клеточных типах. Аквапорины представляют собой гомотетрамер, в котором каждый мономер состоит из шести мембрано-проникающих доменов с цитоплазматическими C- и N-концами (рис. 35 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. 35 Б).

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, Bonhivers, Borgnia, 1998). 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, Bonhivers, Borgnia, 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, Vizuete, Machado, Cano, 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.

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. 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.

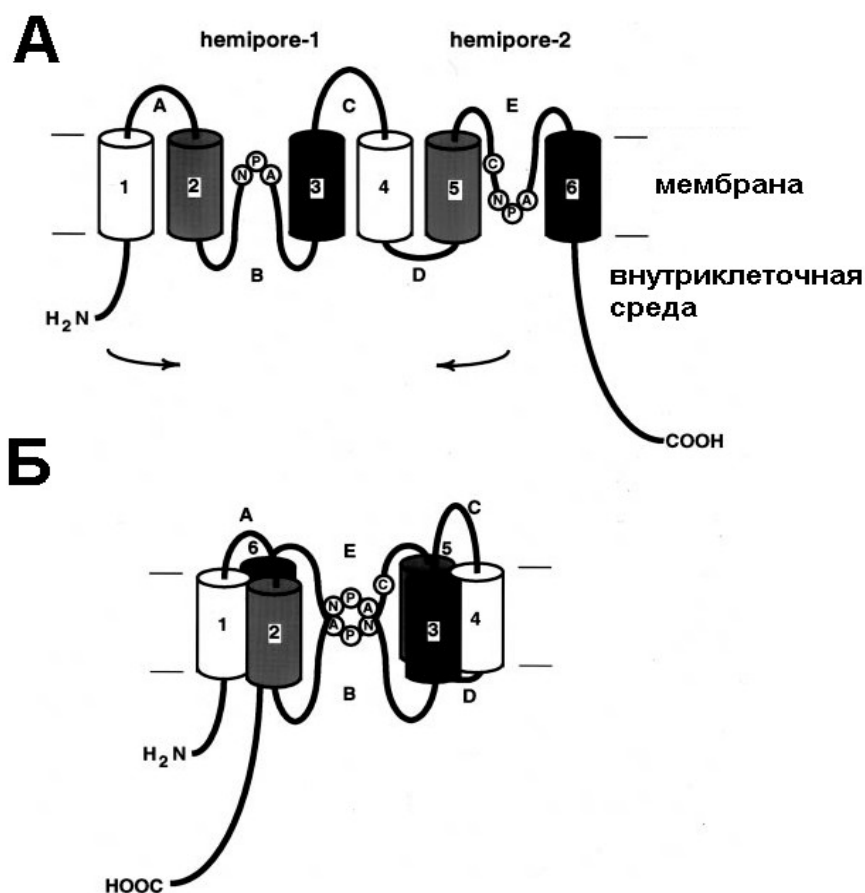


Рис. 35. Мембранная топология субъединицы аквапорина 1.

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, 2000 с изменениями).

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 внутриклеточно или внеклеточно. Один из трансмембранных сегментов субъединицы потенциал-активируемых каналов содержит уникальный набор положительных зарядов и функционирует как сенсор потенциала (Armstrong, Hille, 1998, Hille, 2001). Лиганд-активируемые каналы содержат специализированный рецепторный участок.

Ионные каналы представляют собой большое семейство, состоящее из более, чем 400 белковых молекул, кодирующихся 1-2% генома человека. Многие канальные 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.

Список литературы

1. 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.
2. Зефирова А.Л., Г.Ф. Ситдикова Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология)/ монография, Казань: Арт-кафе, 2010, 270 с
3. Зефирова А.Л. Везикулярная гипотеза освобождения медиатора в синапсе // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, N 9. - С.1-7.
4. 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.
5. Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф. Ионные каналы нервного окончания // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33, N 4. - С. 3-33.
6. 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.
7. Зефирова А.Л., Халилов И.А. Ионные токи нервного окончания лягушки // Нейрофизиология. - 1985. - Т.17, N 6. - С.771-779.
8. 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. 525-53
9. Каламкар Г.Р., Лунгина О.Г. Ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами // Сенсорные системы. - 2001. - Т.15, N 4. - С. 275-287.
10. Камкин А.Г., Киселева И.С., Ярыгин В.Н. Новый тип ионных каналов // Природа. - 2002. - №3. -С.13-20
11. Костюк П.Г. Ионы кальция как вторичные посредники в нервной клетке // Журн. эвол. биохимии и физиологии. - 1992. - Т.28, N 2. - С. 150-155.
12. Магазанник 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.
13. 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.
 14. 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
 15. Armstrong С.М., Hille В. Voltage-gated ion channels and electrical excitability// Neuron. – 1998. - V. 20, № 3. – P. 371-380.
 16. Biel M., Schneider A., Wahl C. Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation // Trends Cardiovasc. Med. – 2002. – V. 12, №5. – P.206-212.
 17. Boron W.F., Boulpaep E.L. Medical physiology. - 2003. - Elsevier Science (USA). – 1319 p.
 18. Catterol W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. - 2000. - V. 16. - P. 521-555.
 19. 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.
 20. Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C.F. Synapses // The John Hopkins University Press: Baltimore and London. - 2000. - 767 p.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels // Physiol. Rev. - 2007. – V.87. – P. 593–658.
 24. Goldstein S.A.N., Bockenhauer 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.
 25. Hamill O. P., Martinac B. Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells // Physiol. Rev. – 2001. - V. 81, N. 2. – P. 685-740.

26. 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.
27. Hille B. Ionic channels of excitable membranes // 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer. - 2001. – 814 p.
28. Hodgkin A.L., Huxley A.F. [Resting and action potentials in single nerve fibres](#) // *J. Physiol.* – 1945. – V.104, №2. – P.176-195.
29. 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.
30. 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
31. 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.
32. 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.
33. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. Principal of neural science // The McGraw-Hill Companies. - 2002. - 1321 p.
34. Katz B. Quantal Mechanism of Neural Transmitter Release // *Science*. – 1971. -V. 173. - № 3992. - P. 123-126.
35. Ling G, Gerard R.W. The normal membrane potential of frog sartorius fibers // [J. Cell Physiol.](#) – 1949. – V.34, №3. – P.383-396.
36. Mallart A. Electrical current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves // *J. Physiol. Lond.* – 1985. - V.368. - P.565-575 б.
37. Mallart A., Brigant J.L. Electrical activity at motor nerve terminals of the mouse // *J. Physiol. Paris.* – 1982. - V.78. - P. 407-411
38. 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.
39. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres // *Nature*. – 1976. – V. 260, № 5554. - 799-802.
40. Neher E.; Sakmann B. The patch clamp technique // *Sci. Am.* – 1992. – V.266, № 3. – P. 44-51.
41. Nicholls J.G., Martin A.R., Bruce G. Wallace B.G., Fuchs P.A. From neuron to brain // Sinauer Associates, 2003, 671 p.

42. 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.
43. 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.
44. Siegel G.J., Albers R.W., Brady, S.T., Price, D.L. Basic Neurochemistry // 7th Ed.. Academic Press. - 2006. – 992 p
45. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells // *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2009 DOI 10.1007/s00424-009-0737-0
46. Sperelakis N. Cell Physiology // Academic Press. - 1995. - 738 p.
47. 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.
48. Van Der Kloot W., Molgo J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction // *Physiol. Rev.* - 1994.- V. 74. - P. 899–991.
49. Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B. Modulation of calcium-activated potassium channels // *J Comp Physiol.* – 2002. – V. 188. – P. 79–87
50. 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.