

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

На правах рукопису

Єгорова Олена Володимирівна

УДК 577.352:612.822.3

**Високоафінна позитивна модуляція
кальцієвих каналів Р-типу агоністами
μ-опіїдних рецепторів**

03.00.02 – Біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук

Науковий керівник

доктор біологічних наук,

академік НАН України

Кришталь Олег Олександрович

Київ - 2016

ЗМІСТ

ЗМІСТ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	14
1.1. Кальцієві канали плазматичної мембрани	14
1.1.1. Відкриття кальцієвих каналів	14
1.1.2. Молекулярна будова	17
1.2. Класифікація на основі електрофізіологічних та фармакологічних характеристик	19
1.2.1. Т-тип кальцієвих каналів	20
1.2.2. L-тип кальцієвих каналів	22
1.2.3. N-тип кальцієвих каналів	24
1.2.4. P-тип кальцієвих каналів	25
1.2.5. Q-тип кальцієвих каналів	25
1.2.6. R-тип кальцієвих каналів	26
1.3. Розподіл і функції кальцієвих каналів	27
1.4. Фармакологія кальцієвих каналів	28
1.4.1. Неорганічні блокатори кальцієвих каналів	28
1.4.2. Дигідропіридини	30
1.4.3. Токсини <i>Conus spp.</i> та <i>Agelenopsis aperta</i> як інструмент при вивченні кальцієвих каналів	31
1.5. Регуляція кальцієвих каналів	32
1.6. Резюме	33
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	34

2.1. МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ	34
2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТВАРИНИ	34
2.3. МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МОЗОЧОКУ ЩУРІВ	36
2.4. МЕТОДИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ІЗОЛЯЦІЇ НЕЙРОНІВ ПУРКІНЬЄ	42
2.5. МЕТОДИКИ ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	43
2.5.1. Метод внутрішньоклітинного діалізу	43
2.5.2. Метод фіксації потенціалу на мембрані нейрона	43
2.5.3. Методика реєстрації трансмембранних струмів	44
2.5.4. Метод фіксації концентрації	45
2.6. РЕЄСТРАЦІЯ ДАНИХ І ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ	47
2.6.1. Реєстрація даних	47
2.6.2. Обробка експериментальних даних	48
2.7. РЕАКТИВИ, ЩО ВИКОРИСТОВУВАЛИСЬ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ	48
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
3.1. РЕЄСТРАЦІЯ СТРУМУ ЧЕРЕЗ КАЛЬЦІЄВІ КАНАЛИ Р-ТИПУ	49
3.2. МОДУЛЮЧА ДІЯ АГОНІСТІВ ОПОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА Р-СТРУМ	52
3.2.1. Вплив морфіну на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє щурів	52
3.2.2. Вплив ендогенного агоністу MOR Ендоморфін-1 на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє мозочку щурів	55
3.2.3. Вплив селективного агоністу MOR DAMGO на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє мозочку щурів	57
3.2.4. Повторне прикладання DAMGO на Р-струм.	59
3.2.5. Тривале прикладання високих концентрацій DAMGO	61
3.2.6. Потенціалзалежність ефекту DAMGO	62
3.3. ВПЛИВ ІОНІВ Ca^{2+} НА МОДУЛЯЦІЮ DAMGO КАЛЬЦІЄВОГО Р-СТРУМУ	65
3.4. АНТАГОНІСТИ ОПОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ.	67

3.4.1. Вплив налоксону модуляцію DAMGO Р-струму	67
3.4.2. Вплив СТОР модуляцію DAMGO кальцієвого Р-струму	70
3.5. Вплив кальмодуліна на модуляцію Р-каналів агоністами МОР	72
3.6. Вплив вторинних посередників на ефект DAMGO.	74
3.6.1. Модуляція Р-каналів агоністами МОР не чутлива до внутрішньоклітинного цАМФ.	74
3.6.2. Модуляція Р-каналів агоністами МОР відбувається без участі ПКА та ПКС.	76
3.6.3. Відсутність впливу G-білків на модуляцію опіоїдами кальцієвих каналів Р-типу.	77
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	87
4.1. Модуляція опіоїдами високопорогових кальцієвих каналів	87
4.2. Опіодні рецептори мозочку та їх фізіологічні функції	89
4.3. Класичні ефекти опіодів на кальцієві канали	94
4.4. Некласичний вплив опіодів на кальцієві канали Р-типу	95
4.5. Можливі молекулярні механізми некласичного ефекту модуляції кальцієвих каналів Р-типу опіоїдами.	106
ВИСНОВКИ	108
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	110

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

$[Ca^{2+}]_{in}$	Внутрішньоклітинна концентрація кальцію
$[Ca^{2+}]_{out}$	Зовнішньоклітинна концентрація кальцію
АТФ	Аденозинтрифосфат
β_2AR	Бета-арестин-2
CaMKII	Кальмодулін опосередкована протеїнкіназа
CMZ	Кальмідазол
CTOP	Cyclofoxy Cyprodime Diacetylnalorphine Diprenorphine
DAMGO	[D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin
DPBS	Дульбекко фосфатний буферний розчин
EGTA	Етиленгліколь біс(β -аміноетиловий ефір)-N,N,N',N'-тетра- оцетова кислота.
G-білок	Гуаніннуклеотид зв'язуючий білок.
GPK	G-білок зв'язана рецепторна кіназа
NEPES	N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота
I_{Na}, I_{Ba}	Натрієвий та барієвий струми відповідно
MOR	μ -опіїдні рецептори
PLC β	Фосфоліпаза C β
PTX	<i>Pertussis toxin</i> (кашлюковий токсин)
VAX	Вольтамперна характеристика
ВПК канали	Високопорогові кальцієві канали
ВПКС	Високопороговий кальцієвий струм
ГАМК	γ -аміномасляна кислота
ГДФ	Гуанозиндифосфат.
ГДФ- β -S	ГДФ - гуанозин-5'-О-(2-тіодифосфат)
ГТФ	Гуанозинтрифосфат.
ГТФ- γ -S	ГТФ - гуанозин-5'-О-(3-тіотрифосфат)

ДГП	Дигідропіридин
ДКГ	Дорсальні корінцеві ганглії
ДОР	δ -опіюїдні рецептори
КОР	κ -опіюїдні рецептори
НОР	Ноцицептин/орфанін опіюїдні рецептори
НПК канали	Низькопорогові кальцієві канали
ПКА	Протеїнкаіаза А
ПККК	Потенціалкеровані кальцієві канали
ПКЦ	Протеїнкаіаза С
ТЕА	Тетраетіламоній
цАМФ	Циклічний аденозінмонофосфат
ЦНС	Центральна нервова система

ВСТУП

Іони кальцію відіграють важливу роль у функціонуванні збудливих клітинних систем. З їх валентністю пов'язана здатність цих іонів ефективно взаємодіяти з органічними молекулами і змінювати їх конформацію, запускаючи чи модулюючи таким чином перебіг основних внутрішньоклітинних життєвих процесів. Зміни їх внутрішньоклітинної концентрації ($[Ca^{2+}]_{in}$) регулюють ряд фізіологічних та біохімічних процесів, таких як проліферація, секреція, електричне збудження та його розповсюдження, синтез білків та ін. [1].

Кальцій є одним із найпоширеніших елементів в організмі ссавців, по відношенню вмісту він поступається лише водню, вуглецю, азоту, кисню та натрію. Близько 90% його міститься в кістці у виді гідроксиапатиту ($Ca_3 [PO_4]_2$). Значно менша частина кальцію знаходиться в плазмі крові і позаклітинної рідини, причому приблизно половина у зв'язаному вигляді. Концентрація іонів Ca^{2+} у цих середовищах складає $2\div 2,5$ мМ і підтримується на постійному рівні за допомогою паратгормону, вітаміну Д та гормону щитовидної залози - тірокальцітоніну, решта кальцію знаходиться у внутрішньоклітинному просторі. Розрізняють три стани кальцію в клітині: 1) Ca^{2+} , локалізований усередині клітинних органел, у тому числі в ендоплазматичному ретикулумі, ядрі, мітохондріях та лізосомах; 2) Ca^{2+} , що зв'язаний з цитоплазматичними білками та неорганічними іонами; 3) вільний або іонізований кальцій, кількість якого в десятки тисяч разів менше сумарної кількості кальцію в клітці. Однак саме остання частина відіграє головну роль у внутрішньоклітинній регуляції.

Расмуссен висунув концепцію, відповідно до якої іони кальцію відіграють роль внутрішньоклітинного посередника [2]. Вони беруть участь у регуляції таких різноманітних процесів як м'язове скорочення, секреція

медіаторів та гормонів, активація деяких ланок метаболізму, контроль генетичного апарата і т.д.

У нервових клітинах роль іонів Ca^{2+} насамперед пов'язують із регуляцією збудливості, звільненням медіаторів і довготривалими змінами ефективності синаптичної передачі (довготривала потенціація та депресія). Регуляція мембранної збудливості внутрішньоклітинними іонами кальцію здійснюється завдяки наявності кальцій-залежних іонних каналів. Такі канали активуються при підвищенні рівня внутрішньоклітинного кальцію та деполяризації мембрани і лежать в основі слідових потенціалів [3]. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ може також контролювати стан потенціал-залежних кальцієвих каналів шляхом впливу на механізм кальцій-залежної інактивації останніх [4, 5]. Під час синаптичної передачі концентрація іонів кальцію в нервовій терміналі визначає кількість синаптичних везикул, що зливаються з пресинаптичною мембраною і, завдяки цьому, кількість медіатора, що виділяється в синаптичну щілину [6]. Довготривалі зміни ефективності синаптичної передачі в ЦНС відносяться до одних із найбільш досліджуваних за останні роки феноменів пластичності центральної нервової системи. Механізм цього явища остаточно не з'ясований, однак існує велика кількість експериментальних даних, що підтверджують необхідність підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ у пре- чи постсинаптичному нейроні для реалізації довготривалої потенціації та депресії [7, 8].

Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ у нервових клітинах здійснюється за рахунок вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо і його входу ззовні. Потенціал-керовані кальцієві канали, розташовані в клітинній мембрані збудливих клітин утворюють один із основних шляхів надходження іонів кальцію всередину клітини. Відкриваючись у відповідь на деполяризацію і пропускаючи вхідний струм, вони беруть участь у контролі трансмембранного потенціалу та в значній мірі визначають характеристики потенціалу дії, що генерується клітиною. У доповнення до сигнальної функції, кальцієві канали виконують важливу роль в сполученні

електричної активності плазматичної мембрани із різними рецепторними механізмами та внутрішньоклітинними процесами. Протягом останніх десятиліть зусиллями багатьох дослідників було досягнуто значного прогресу в з'ясуванні генетичних, молекулярних та функціональних механізмів дії цих білкових структур.

Потенціал-залежні кальцієві канали P/Q-типу є одним із найважливіших компонентів синаптичної передачі в мозку у ссавців [9]. Навіть незначні зміни у властивостях цих каналів, можуть істотно впливати на ефективність синаптичної передачі. Це призводить до важких, часто незворотніх нервових і психічних захворювань, таких як неврози, паркінсонізм, депресія, шизофренія, епілепсія та ін. Тому знання механізмів виникнення цих змін має фундаментальне медичне значення та належить до першочергових завдань нейронауки.

Актуальність проблеми

Вхід кальцію крізь Ca^{2+} канали опосередковує величезну кількість клітинних відповідей, таких як вивільнення медіаторів, експресія генів, морфологічна диференціація та активація кальцій-залежних ензимів. Теоретично, опіюїдні рецептори можуть модулювати усі типи Ca^{2+} каналів. Опіюїди впливають на активність високопорогових L-, N-, P/Q-, R- [10] та низькопорогових T-типів [11] потенціал-керованих кальцієвих каналів шляхом активації μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін FQ (N/OFQ) опіюїдних рецепторів. “Класичні” ефекти інгібування високопорогових кальцієвих каналів опіюїдами опосередковані шляхом активації РТХ-чутливих ГТФ-зв'язаних G_i та G_o білків. [10]. G-білок являє собою гетеротримерну структуру, що складається із трьох субодиниць: α , β та γ . У стані спокою G-білки зв'язані з гуанозиндифосфатом (ГДФ). Ліганд, зв'язуючись із метаботропним рецептором, викликає у ньому конформаційні зміни, котрі, у свою чергу, призводять до різкого збільшення спорідненості G-білка до гуанозинтрифосфату (ГТФ). В результаті цього, гетеротримерний комплекс

розпадається на α (зв'язану з ГТФ) та $\beta\gamma$ димерну субодиниці. Вільні субодиниці G-білка регулюють велику кількість ефекторних білків, зокрема, кальцієві канали N- та P/Q-типу. Відомий приклад пов'язаний з активацією опіюїдних рецепторів, це зниження вивільнення кальцій-залежних трансмітерів шляхом інгібування N- та P/Q-типів кальцієвих каналів, яке опосередковується G-білками. [12].

Набагато менший, але успішно зростаючий обсяг уявлень, вказуючих на G-білок-незалежну модуляцію опіюїдами іонних каналів, шляхом активації μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін FQ (N/OFQ) опіюїдних рецепторів [13] [11] [14, 15]. Можна припустити, що у механізм виникнення ефекта не включена активація гетеротримерних G_i/G_o -білків. Молекулярні механізми завдяки яким опіюїди викликають цей ефект лишаються незрозумілими.

Наша робота присвячена новому механізму регуляції високوپорогових кальцієвих каналів агоністами опіюїдних рецепторів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: “Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів”(номер державної реєстрації – 0107U010843), “Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології” (номер державної реєстрації – 0110U004750), “Іонні канали клітинних мембран: функціональна роль в нормі та патології” (номер державної реєстрації - 0113U003964) та “Клітинні сигнальні системи в нормі та патології” (номер державної реєстрації -0113U007273). А також в рамках гранту для молодих вчених НАН України: “Дослідження молекулярних механізмів знеболання,

викликаного опіоїдними анальгетиками” (номер державної реєстрації - 0115U003830).

Мета і задачі дослідження

Основною метою даної роботи було дослідити дію ендогенних та екзогенних опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, а також встановити можливі механізми, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми. Для досягнення цієї мети були поставлені наступні задачі:

1. Методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” визначити вплив селективних ендогенних та екзогенних агоністів опіоїдних рецепторів на кальцієвий струм Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.
2. Використовуючи фармакологічні та електрофізіологічні засоби визначити діапазон концентрацій агоністів опіоїдних рецепторів, які спричиняють зміни кальцієвого струму Р-типу.
3. Визначити тип рецептора, з яким взаємодіють агоністи опіоїдних рецепторів, що спричиняють зміни кальцієвого струму Р-типу.
4. Виявити можливі механізми, котрі беруть участь у модуляції агоністами опіоїдних рецепторів високопорогових кальцієвих каналів Р-типу нейронів Пуркінє ссавців.

Наукова новизна одержаних результатів

У дисертаційній роботі вперше показано, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів (MOR) рецепторів приймає участь високоафінний центр зв’язування, який або розташований на самому каналі, або аллостерично взаємодіє з ним. Ми також не виключаємо, що агоністи опіоїдних рецепторів безпосередньо взаємодіють з модулюючим сайтом в межах Р-каналу.

У дисертаційній роботі вперше показана наявність позитивної високоафінної модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR, що не

є опосередкованою G-білками. У роботі показано, що механізми, які приймають участь у модуляції опіоїдами Р-струму, відмінні від добре відомих механізмів за участю G-білків, або процесів залежних від фосфорилювання. Таким чином, вперше показано, що опіоїдні рецептори здатні чинити безпосередній вплив на Р-канали. Наші дані показують, що опіоїди можуть взаємодіяти як з μ - так і з іншими типами опіоїдних рецепторів в одній і тій же клітині, викликаючи протилежні ефекти на кальцієві струми Р-типу. Вищенаведене вказує на існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів.

Практичне значення одержаних результатів

Результати дисертаційної роботи насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки отримані принципово нові дані про модулюючу дію агоністів опіоїдних рецепторів на високопороговий кальцієвий струм. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, що здійснюють регуляцію високопорогових кальцієвих каналів, а також для пошуку нових шляхів спрямованого фармакологічного впливу на них. Характерна модуляція опіоїдами кальцієвих каналів може виявитись зручним фармакологічним інструментом для специфічної регуляції мозкової діяльності.

Особистий внесок здобувача

Вибір методичних підходів, конструювання та налагодження експериментальної установки, електрофізіологічні дослідження кальцієвих струмів, обробка експериментального матеріалу, аналіз і узагальнення результатів дослідження виконувались особисто автором. Приготування зрізів мозочку проводилося здобувачем. У розробці концепцій роботи, обговоренні і редагуванні її результатів, а також у формуванні висновків брали активну участь керівник та співавтори публікацій.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на:

IV конференція українського товариства нейронаук з міжнародною участю. Донецьк, Україна. 2008; International Conference «Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling», Kiev, Ukraine, 2009; International Narcotics Research Conference. Malmo, Sweden, 2010; VIII Міжнародному симпозиумі "Актуальні проблеми біофізичної медицини", Київ, Україна 2014; VI Конгрес Українського товариства нейронаук. Київ, Україна, 2014; VII Міжнародна наукова конференція "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології". Київ, Україна, 2014.

Публікації

За результатами роботи опубліковано 6 статей та тези 9 доповідей у наукових журналах.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 228 найменувань. Дисертацію викладено на 133 сторінках стандартного машинопису, вона містить 42 рисунки і 2 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Кальцієві канали плазматичної мембрани

1.1.1. Відкриття кальцієвих каналів

У пліні з'ясування механізмів регуляції іонної провідності мембрани збудливих клітин Ходжкін та Хакслі [16] вперше висунули уявлення про іонний канал, припускаючи, що проникність мембрани для різних іонів обумовлена молекулярними порами (каналами), через які іони можуть вільно проникати в клітину. Вони розробили модель потенціалу дії, що припускала наявність у клітинній мембрані натрієвих і калієвих потенціал-керованих каналів, згодом це стало одним з основних досягнень в області вивчення клітинної збудливості.

Відкриття потенціал-керованих кальцієвих каналів було визначено експериментами Фетта і Катца [17], які, вивчаючи властивості м'язових волокон рака, уперше знайшли їхню здатність генерувати потенціали дії в безнатрієвому розчині. Пояснюючи природу таких потенціалів дії Фетт і Гінсбург [18] уперше показали, що в основі цього явища лежить вхід іонів Ca^{2+} у клітину. Після цього з'явився цілий ряд робіт, що свідчать про існування кальцієвої провідності мембрани, як універсальної властивості збудливих клітин.

Більш детально досліджуючи природу кальцієвого потенціалу дії, Хагівара та співавтори вперше встановили такі властивості кальцієвих каналів як насичуваність ($K_D=20\div40$ мМ), конкуренція проникаючих катіонів (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) і конкурентне блокування непроникаючими іонами (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). Для пояснення цих явищ Хагівара та співавтори

постулювали наявність у каналі особливих місць адсорбції іонів кальцію. Отримані групою Хагівари дані дозволили також уперше знайти ще одну важливу властивість кальцієвого потенціалу дії – його залежність від концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} [19-21].

Наступний етап у вивченні кальцієвих каналів був позначений експериментами Рейтера [22], котрий, використовуючи метод фіксації потенціалу і заміщення іонів у позаклітинних розчинах, уперше продемонстрував існування кальцієвої провідності мембрани волокон Пуркінє. Її наявність, мабуть, пов'язана з існуванням у мембрані клітини особливих кальцієвих потенціал-керованих каналів, що відрізняються за своїми характеристиками від натрієвих каналів. Існування таких каналів згодом підтвердилося численними даними по заміщенню іонів, а також фармакологічними експериментами, проведеними в ряді лабораторій [20-25]. У ході цих досліджень була встановлена ще одна важлива особливість кальцієвих каналів: виявилось, що їхні характеристики можуть модулюватися іншими ніж мембранний потенціал факторами. Такими факторами могли бути вплив фізіологічно активних речовин – нейротрансмітерів та вторинних посередників (катехоламіни, серотонін, цАМФ) [24-30]. Також була виявлена неоднорідність популяції кальцієвих каналів. Так у плазматичній мембрані яйцеклітин морської зірки могли співіснувати одночасно, принаймні, два типи кальцієвих каналів [21].

Новий напрямок у вивченні потенціал-керованих каналів мембрани було зв'язано з розробкою й впровадженням Костюком і співавторами методу внутрішньоклітинної перфузії ізольованих клітин [24, 31-33]. Незважаючи на вже існуючу на той час методику перфузії гігантського аксона кальмара, застосування її було сильно обмежене, оскільки такий підхід міг бути використаний тільки для досліджень досить великих об'єктів (наприклад, гігантських м'язових волокон). Метод же внутрішньоклітинної перфузії дозволив вивчати функціонування ізольованої клітини в умовах зміни її внутрішньоклітинного середовища.

Використовуючи цей метод, Костюк і співавтори уперше виділили кальцієвий струм у чистому вигляді із сумарного трансмембранного струму і провели детальний аналіз його кінетичних характеристик. У результаті цього були встановлені нові властивості кальцієвих каналів. Виявилося, що на відміну від натрієвого й калієвого струмів, кінетика активації інтегрального кальцієвого струму описується квадратичним ступенем перемінної активації (m^2) моделі Ходжкіна-Хакслі [16], а хід інактивації описується сумою принаймні двох експонент.

Костюком і Кришталем [33] також була вперше виявлена ще одна фундаментальна властивість кальцієвих каналів - це залежна від позаклітинної концентрації іонів Ca^{2+} здатність кальцієвого каналу трансформуватися в канал, що пропускає одновалентні катіони. Нарешті, застосування нового методичного підходу привело до остаточного перегляду класичної концепції «метаболічної незалежності» функціонування іонних каналів. Можливість зміни внутрішньоклітинного середовища дозволила виявити визначену залежність функціонування кальцієвих каналів від цитоплазматичних процесів: був виявлений феномен «вимивання» кальцієвого струму в ході перфузії клітини, а також показана роль внутрішньоклітинного кальцію в пригніченні активності кальцієвих каналів і роль цАМФ-залежного фосфорилування в регуляції такої активності [21, 24, 26, 28-35].

Найбільш значимим наслідком застосування методу внутрішньоклітинної перфузії було створення й розробка методу дослідження одиночних іонних каналів мембрани “петч-клемп”, суть якого полягає в можливості виміру трансмембранних струмів через мікроскопічно малі ділянки клітинної мембрани [36]. Метод “петч-клемп” виявився революційним в області дослідження іонних каналів, він дозволяв реєструвати струми одиночних каналів амплітудою порядку пікоампера. У результаті, електрофізіологія вийшла на якісно новий рівень досліджень характеристик і властивостей іонних каналів, що у свою чергу привело до

значного розвитку теоретичних уявлень про механізми їхнього функціонування.

Дослідження з використанням цих методів дозволило одержати прямі докази неоднорідності популяції кальцієвих каналів. Виявилось, що потенціал-керовані кальцієві канали плазматичної мембрани навіть однієї і тієї ж клітини можуть значно розрізнятися по декількох параметрах: кінетичним властивостям, порогом активації, потенціал залежністю, провідністю, фармакологією та ін.

1.1.2. Молекулярна будова

Кальцієвий канал являє собою трансмембранний гетероолігомерний білковий комплекс із молекулярною масою близько 390 kDa, що складається з чотирьох субодиниць: α_1 , $\alpha_{2\delta}$, β і γ [37] (Рис. 1.1).

Молекулярне клонування ідентифікувало десять генів α_1 субодиниці кальцієвого каналу (α_{1A} – α_{1H} , α_{1L} та α_{1S}), чотири гени β субодиниці (β_1 – β_4) та лише один ген $\alpha_{2\delta}$ та γ [38-40]. Власне іонний канал, тобто заповнену водою пору, що забезпечує трансмембранне проходження іонів, формує α_1 -субодиниця з молекулярною масою 190 kDa [41]. Ця субодиниця містить спеціальну ділянку, що пропускає іони Ca^{2+} (та деякі інші двовалентні катіони) і затримує одновалентні катіони (селективний фільтр) [42]. α_1 -субодиниця складається з 1873 амінокислот, що формують 24 трансмембранних альфа-спіральних сегмента, зібраних у чотири гомологічних домени.

Кальцієві різного типу канали мають різні поро-формуючі α_1 субодиниці, зокрема, α_{1A} субодиниця відповідає кальцієвому каналу P/Q-типу, α_{1B} субодиниця – N-типу, α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} та α_{1S} кодують кальцієві канали L-типу, а α_{1E} складає новий R-тип кальцієвих каналів із

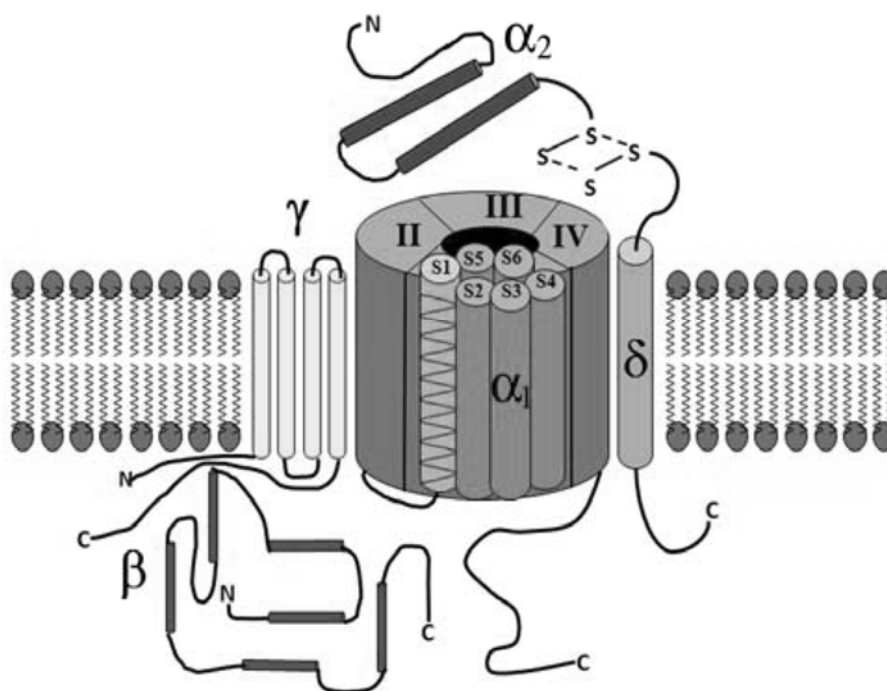


Рис. 1.1 - Структура потенціал-залежного кальцієвого каналу. Канал формують чотири субодиниці α_1 , β , γ , $\alpha_2\delta$. α_1 – субодиниця формує каналну пору. α_1 , β мають центри фосфорилляції для цАМФ залежної протеїнкінази. γ субодиниця має центри гліколізації.

властивостями подібними як до високопорогових так і низькопорогових каналів. Нещодавно було показано, що α_{1G} , α_{1H} та α_{1L} кодують різні ізоформи кальцієвих каналів T-типу [40, 43]. $\alpha_{2\delta}$, β і γ субодиниці кальцієвого каналу виконують регуляторні функції, забезпечуючи додаткові центри фосфорилювання каналу, зв'язування з G-білками і т.п. [44].

1.2. Класифікація на основі електрофізіологічних та фармакологічних характеристик

Спочатку були ідентифіковані два типи кальцієвих каналів: T- (transient) і L- (long-lasting), причому їхня класифікація ґрунтувалася на біофізичних властивостях (порозі активації й кінетиці інактивації) [31, 34, 45-47]. Незабаром у нервових клітинах по біофізичних параметрах був ідентифікований ще один високо граничний компонент кальцієвого струму – N-струм (“ні T-, ні L-”) [5, 36, 48], і відповідно був виділений N-тип кальцієвих каналів. Лише через кілька років стало можливим селективно виділяти інші компоненти кальцієвого струму, чому сприяло відкриття ряду селективних блокаторів окремих типів кальцієвих каналів, головним чином, природних токсинів [49]. Так, спочатку був виявлений селективний блокатор каналів N-типу [5, 50, 51], а потім P- каналів (клітини Пуркінє) [52]. Порівняно недавно були фармакологічно розділені Q- і R-канали [51, 53-56], і в більшості випадків R- (residual) компонент кальцієвого струму визначається як залишковий. Таким чином, у даний час кальцієві канали відповідно до фармакологічної класифікації розділяють на T-, L-, N-, P-, Q- і R-типи [38, 48, 51, 54, 57, 58]. З появою можливості провести молекулярне клонування, було виділено і охарактеризовано десять типів α_1 субодиниць [43]), що дозволило їх розділити на три структурно і функціонально споріднених родини (Ca_v1 , Ca_v2 і Ca_v3) [59, 60], та довершити сучасну класифікацію Ca^{2+} каналів (**Таблиця 1.1**).

Таблиця 1.1 Класифікація та функціональні характеристики потенціал-керованих кальцієвих каналів

Струм	Головна субодиниця, тип		Блокатори	Експресія	Фізіологічні функції	Хвороби
L	α_{1S}	Cav1.1	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , La ³⁺ , фенілалкіламіни, бензотіазепіни, дигідропіридини	Скелетні м'язи	Генерація потенціалів дії, секреція гормонів і нейромедіаторів, синаптична передача у фоторецепторів та пресинаптична кальцієва сигналізація	М'язевий параліч, тимусний синдром, аутизм, куряча сліпота
	α_{1C}	Cav1.2		Міоцити судинної стінки, кардіоміоцити		
	α_{1D}	Cav1.3		Ендокринні клітини, нейрони		
	α_{1F}	Cav1.4		Палички та колбочки фоторецепторів		
P	α_{1A}	Cav2.1	ω -Aga-IVA, ω -CTx-MVIIIC	Нейрони, ендокринні клітини	Вивільнення нейромедіаторів	Мозочкова атаксія, геміплегічна мігрень
Q	α_{1A}	Cav2.1	ω -CTx-MVIIIC	Нейрони, ендокринні клітини	Вивільнення нейромедіаторів	Мозочкова атаксія, геміплегічна мігрень
N	α_{1B}	Cav2.2	Cd ²⁺ , ω -CTx-GVIA, ω -CTx-MVIIIC	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів	Синдром дистонії-міоклонуса
R	α_{1E}	Cav2.3	SNX-482, Cd ²⁺ і Ni ²⁺	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів	Розлади синаптичної передачі
T	α_{1G}	Cav3.1	Ni ²⁺ , амлорид, фенітоїн, фленаризин	Нейрони	Формування осциляцій мембранного потенціалу, пейсмеркерна активність нейронів	Абсансна епілепсія
	α_{1H}	Cav3.2		Кардіоміоцити, нервова та ендокринна тканина		
	α_{1L}	Cav3.3		Нейрони		

1.2.1. Т-тип кальцієвих каналів

Низькопорогові потенціал керовані кальцієві канали (НПК) Т-типу за особливостями молекулярної будови поділяються на 3 типи: Cav3.1, Cav3.2,

Ca_v3.3. Канал Ca_v3.1 сформований $\alpha 1_G$ субодиницею, він має найбільш швидкий час відновлення після інактивації, локалізується в клітинах мозку. Канал Ca_v3.2, сформований субодиницею $\alpha 1_H$, має найбільш повільний час відновлення після інактивації, широко розповсюджений у печінці та нирках, а також у серці, в нервовій та ендокринній тканинах. Канали Ca_v3.3 сформовані $\alpha 1_I$ -субодиницею, локалізуються у нейронах мозку і генерують Т-струми, що сприяють підтриманню електричної активності нейронів, так як активуються при слабкій деполяризації. Кальцієві канали Т-типу зустрічаються в м'язових, секреторних [61] і хромафінних клітинах [62]. У багатьох нейронах ці канали починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -60 мВ [31, 45, 46, 63]. Активація Т-каналів дуже швидка. Сигмоподібний тип активації підтверджує наявність двох чи більше послідовних закритих станів каналу [64]. Деактивація (хвостовий струм) Т-струму пов'язана із закриванням каналів і може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу порядку мілісекунд [65, 66]. Постійна часу деактивації Т-струму не залежить від тривалості попередньої деполяризації, ступеня інактивації кальцієвих каналів і типу проникаючого катіона [67].

Інактивація Т-струму розвивається моноекспоненційно за час порядку 100 мс, виявляє строгу потенціал-залежність і не залежить від потоку іонів Ca²⁺ проникаючих через канал [31, 45, 46, 63]. При підтримуваних мембранних потенціалах більш позитивних, ніж -50 мВ Т-канали повністю стаціонарно інактивовані [31, 45, 46, 68]. Таким чином, ці дані вказують на подібність кінетичних характеристик Na⁺, K⁺ і Ca²⁺ каналів, а так само і на можливість застосування кінетичних схем, що описують роботу Na⁺ та K⁺ каналів, для Ca²⁺ каналів [64].

Селективні та провідні властивості кальцієвих каналів Т-типу також характеризуються певними особливостями. По-перше, вони пропускають двовалентні катіони Ca²⁺, Sr²⁺ і Ba²⁺ практично з однаковою ефективністю

[46, 69], по-друге, провідність одиночних каналів досить низька $5\div 7$ пСм [70] і практично не залежить від типу проникаючого двовалентного катіона.

Кальцієві канали Т-типу менш чутливі, у порівнянні з L-каналами, до блокування іонами Cd^{2+} [48]. У той же час, вони більш чутливі до блокування іонами Ni^{2+} [71]. Дигідропіридини, так само як і інші органічні блокатори, мають низьку ефективність по відношенню до Т-каналів (виключення складають Т-канали гіпоталамічних і можливо інших центральних нейронів хребетних [72]. У той же час досить сильними блокаторами цих каналів є амілорид [73], антиконвульсант – фенітоїн [74], флунаризин [72] і ряд складних вуглеводневих спиртів [52]. Функціональний стан кальцієвих каналів Т-типу практично не залежить від внутрішньоклітинних обмінних процесів, тому їхня активність протягом тривалого часу може підтримуватися в ізольованих від клітини мембранних фрагментах [70].

1.2.2. L-тип кальцієвих каналів

Високопорогові потенціал керовані кальцієві канали (ВПК) L-типу переважно локалізовані в кардіоміоцитах і міоцитах судинної стінки. Цей тип каналів також широко представлений в нейрональних [75], м'язових [76] і секреторних клітинах [77-79]. У серцево-судинній системі вони беруть участь в підтримці електричної і механічної активності кардіоміоцитів і гладеньком'язових клітин судин. Канали L -типу за особливостями молекулярної будови поділяються на наступні 4 типи: $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.4$. $\text{Ca}_v1.1$ канали локалізовані на Т-трубочці смугасто-полосатих та серцевого м'язів. $\text{Ca}_v1.2$ широко експресуються в гладеньких м'язах, клітинах підшлункової залози, фібробластах та нейронах. Експресія $\text{Ca}_v1.3$ каналів переважає на внутрішніх волоскових клітинах равлику. Було показано, що видалення $\text{Ca}_v1.3$ каналів викликає глухоту у мишей [80]. $\text{Ca}_v1.4$ канали переважно експресуються в паличках і колбочках

фоторецепторів. Інактивація $\text{Ca}_v1.4$ призводить до порушення синаптичної передачі фоторецепторів та пресинаптичної кальцієвої сигналізації і запобігає формуванню фоторецепторів. Мутації в $\text{Ca}_v1.4$ каналі в організмі людини призводить до курячої сліпоти [81, 82]. Кальцієві канали L-типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу від -30 мВ до -20 мВ [83]. Час досягнення піку амплітудного значення струму монотонно убыває зі збільшенням потенціалу, амплітуда струму зростає від -30 мВ до 0 мВ і знову спадає при подальшому збільшенні тестуючого потенціалу. Деактивація (хвіст) L-струму може бути апроксимована однією експонентою з постійної часу $\tau=170$ мкс для іонів Ca^{2+} і $\tau=235$ мкс для іонів Ba^{2+} [83].

Інактивація цих каналів розвивається дуже повільно, і струм цілком не інактивується, якщо в якості основного проникаючого катіона використовуються іони Ba^{2+} чи якщо внутрішньоклітинний розчин містить EGTA [31, 46, 84-86]. Це підтверджує той факт, що $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ відіграє важливу роль у контролі інактивації кальцієвих каналів [85].

Кальцієві канали L-типу, поряд з іонами Ca^{2+} , здатні ефективно пропускати іони Ba^{2+} і Sr^{2+} . Ряд максимальної амплітуди струмів при цьому має наступний вид: $I_{\text{Ba}} > I_{\text{Sr}} > I_{\text{Ca}}$ [46, 65, 68, 87]. Така послідовність є характерною як для макрострумів від цілої клітини, так і для струмів через одиночні канали. Одиночні L-канали відрізняються досить значною провідністю 20-25 пСм при концентрації іонів Ba^{2+} близько 100 мМ [48].

L-тип кальцієвих каналів характеризується високою чутливістю до неорганічних іонів (Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+}) [7, 88, 89] та органічних блокаторів трьох класів - фенілалкіламінів (верапаміл, D-600), бензотіазепінів (ділтіазем) і дигідропіридинів (ніфедипін, нітрендипін, нізолдипін, німодипін) [53]. Стосовно каналів даного типу високою ефективністю володіють також кальцієві агоністи з групи дигідропіридинів - BayK8644 і CGP28392 [35, 48].

Особливістю кальцієвих каналів L-типу всіх збудливих клітин є залежність їхнього функціонального стану від внутрішньоклітинного метаболізму [57, 64]. Це, у свою чергу, визначає схильність цих каналів різноманітним регуляторним і впливам, що модулюють, за допомогою широкого набору нейротрансмітерів і гормонів за участю різних внутрішньоклітинних систем [76].

1.2.3. N-тип кальцієвих каналів

Присутність кальцієвих каналів N-типу ($\text{Ca}_v2.2$) одночасно з кальцієвими каналами інших типів було показано в основному для клітин нейрональної природи [90-92]. Крім нейронів спинальних гангліїв, ембріонів курчати й миші, до таких клітин відносяться нейрони тригемінальних гангліїв [93], клітини клубочкової зони кори наднирників пацюка [87] і нейросекреторні клітини [62, 94, 95]. Співіснування N- і L-каналів було показано на симпатичних нейронах пацюка [96]. Як і в разі інших підтипів потенціалкерованих кальцієвих каналів, $\alpha 1$ субодиниця утворює пори, через які кальцій проникає в клітину і визначає більшу частину властивостей каналу $\text{Ca}_v2.2$ [97].

Кальцієві канали N-типу по своїй потенціалзалежності займають проміжне положення між T- і L-каналами. Поріг їхньої активації перевищує поріг для T-каналів і лежить у діапазоні від -40 мВ до -30 мВ. Максимум вольтамперної характеристики приходить на потенціали в області 0 мВ [68]. У ході триваючої деполяризації кальцієві канали N-типу досить швидко інактивуються (постійна часу 50÷80 мс), потенціал їх повної стаціонарної інактивації становить приблизно -30 мВ. Провідність одиночних каналів N-типу складає близько 13 пСм (110 мМ Ba^{2+}) [48, 98]. У більш пізніх дослідженнях було встановлено, що провідність одиночних N-каналів складає близько 18 пСм [99], причому можливі переключення між різними модами [100, 101].

Серед особливостей фармакології N-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування іонами Cd^{2+} і ω -CTx-GVIA токсином, а також стійкість до Ni^{2+} і дигідропіридинів [68, 102, 103].

1.2.4. P-тип кальцієвих каналів

ВПК канали P-типу ($\text{Ca}_v2.1$) поширені у багатьох структурах ЦНС, периферичній нервовій системі, серцевому та скелетних м'язах [52, 104-108]. На молекулярному рівні ці канали складаються з основної пороформуючої $\alpha 1$ субодиниці, допоміжних $\alpha 2$ та β субодиниць, та факультативних субодиниць, як наприклад γ субодиниця, в кальцієвих каналах скелетних м'язів [109]. Канали цього типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -55 мВ, а максимум їх вольтамперної характеристики знаходиться біля -20 мВ [110]. Деактивація (хвіст) струму через P-тип кальцієвих каналів може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу $\tau=180$ мкс. Інактивація цього струму розвивається дуже повільно (кілька секунд) і залежить від мембранного потенціалу. Характерною рисою P-типу кальцієвих каналів є широкий діапазон перекриття (від -50 до 0 мВ) кривих стаціонарної активації й інактивації [110].

Дослідження провідності одиночних каналів ізольованих клітин Пуркінє дорослих тварин показали наявність трьох різних рівнів провідності (9-10, 13-14, 18-19 пСм), кожний з яких блокується очищеною отрутою FTX (від англ. funnel spider toxin)[111].

Серед особливостей фармакології P-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування за допомогою ω -Aga-IVA токсину, а також стійкість до дигідропіридинів і ω -CTx-GVIA [110].

1.2.5. Q-тип кальцієвих каналів

Цей тип каналів був виявлений у нейронах мозку [112], гранулярних клітинах мозочка [54], в клітинах серцевої тканини [44]. Ці канали схожі на ПКК канали Р-типу, але за субодиничним складом відноситься до родини $\text{Ca}_v2.1$ [43]. За порогом активації Q-струму (біля -40 мВ) і максимуму вольтамперної характеристики (0, 10 мВ) даний тип каналів був віднесений до високопорогових кальцієвих каналів. Q-канали мають більш швидку кінетику інактивації, ніж Р-канали, а також більш низьке значення потенціалу половинної інактивації, біля -45 мВ [44]. Проникність Q-каналів однакова як для іонів кальцію, так і іонів барію [113].

При аналізі фармакологічних властивостей Q-типу кальцієвих каналів гранулярних клітин мозочка було встановлено, що ці канали не чуттєві до дигідропіридинів та ω -СТх-GVIA токсину, але можуть бути цілком заблоковані ω -СТх-MVІІС токсином у мікромольних концентраціях і на 60% ω -Ага-ІVА токсином у концентрації 1 мкМ [112]. Не зважаючи на те, що ω -СТх-MVІІС токсин блокує як Q- так і N-тип кальцієвих каналів, N-струм пригнічується набагато швидше, ніж струм Q-типу. Аплікація 5 мкМ ω -СТх-MVІІС токсину приводить до повного блокування N-типу кальцієвих каналів уже через 10 с, у той же час для повного блокування Q-типу кальцієвих каналів необхідно близько 50 с [56]. Селективних блокаторів для даного типу каналів поки не виявлено.

1.2.6. R-тип кальцієвих каналів

Уперше кальцієві канали цього типу були виявлені в гранулярних нейронах мозочку [113, 114]. Як і в інших каналах цього класу, $\alpha 1$ -субодиниця утворює пори, через які кальцій проникає в клітину, і визначає більшу частину властивостей каналу. За будовою $\alpha 1$ -субодиниці, цей тип каналів також відомий як $\text{Ca}_v2.3$. Вони добре виражені в корі головного мозку, дендритах пірамідних клітин гіпокампу, стріатумі, мигдалини і

міжніжкових ядрах [115]. Цей тип каналів не достатньо досліджений, але як і канали Q-типу, вони також присутні в гранулярних клітинах мозочка [116].

Ці канали мають високий поріг активації з відносно повільною кінетикою. Поріг активації кальцієвих каналів R-типу знаходиться біля -50 мВ, в той час як максимальна амплітуда R-струму спостерігається при потенціалі 0 мВ (причому, як у кальцієвому розчині, так і в розчині, що містить 5 мМ Ba^{2+}). У ході триваючої деполяризації відбувається швидка інактивація цього струму (постійна часу $\tau=20\div30$ мс). Потенціал половинної інактивації R-типу кальцієвих каналів за даними різних авторів різний: Жанг і співавтори [113] приводять величину порядку -62 мВ, у той час як за даними Долфін [44] він складає -15 мВ. Таким чином, по своїм активаційним і інактиваційним характеристикам T- і R-канали дуже схожі між собою. Проте, деактивація струму через канали R-типу, відбувається значно швидше, ніж через кальцієві канали T-типу, і може бути апроксимована однією експонентою з постійної часу порядку $\tau=300$ мкс [117]. Провідність одиночних кальцієвих каналів, утворених α_{1E} -субодиницею, так само досить висока і складає близько 14 пСм [118].

Серед фармакологічних особливостей R-типу кальцієвих каналів (як і для T-типу кальцієвих каналів) слід зазначити низьку чутливість до цілого ряду відомих блокаторів: дигідропіридинів, фенілалкіламінів, конотоксинів і FTX [114, 118, 119]. За даними Еллінора та співавторів [114], струм через R-канали блокується іонами Cd^{2+} і Ni^{2+} з $K_D=1,2$ мкМ і $K_D=66$ мкМ, відповідно. Селективних блокатор для цього типу кальцієвих каналів SNX-482 [43].

1.3. Розподіл і функції кальцієвих каналів

Результати численних досліджень показали, що кальцієві канали різних типів розподілені в мозку неоднорідно і що кожний з них, швидше за все, виконує деяку специфічну функцію. З іншого боку, було встановлено,

що кілька типів кальцієвих каналів можуть у визначеній пропорції одночасно експресуватися в одній і тій же клітині. У численних дослідженнях на нервових клітинах було встановлено, що канали різних типів нерівномірно локалізовані й у межах самої клітини. Так L-канали розташовуються в основному в мембрані соми, P- і Q- на сомі та дендритах, N-канали – головним чином в області синаптичних закінчень, а R-канали розсіяні там де і три останніх типи [91, 120-122].

На даний час ще не сформовані повні уявлення про функцію кожного типу кальцієвих каналів. Передбачається, що T-канали беруть участь у формуванні осциляцій мембранного потенціалу і пейсмеркерної активності нейронів; L-канали відіграють роль у генерації потенціалу дії (ПД) і задіяні у процесі вивільнення речовин, що секретуються з нервових і секреторних клітин, а N-, P-, і Q-канали зв'язані з виділенням нейротрансмітерів у синаптичних сполученнях, причому функціональні розходження між трьома останніми типами каналів наразі не зовсім зрозумілі (Таблиця 1.1). Останні дані вказують, що ці канали задіяні до процесів вивільнення визначеного виду медіаторів, або ж є специфічними для того чи іншого типу клітин [84, 93, 94, 120, 123-127].

1.4. Фармакологія кальцієвих каналів

Застосування сучасних електрофізіологічних методик, зокрема високопродуктивного скрінінгу, та успіхи у молекулярному дизайні, органічному синтезі, фармакологічних і біохімічних дослідженнях дозволили також значно розширити коло лігандів кальцієвих каналів.

1.4.1. Неорганічні блокатори кальцієвих каналів

Полівалентні катіони, такі як Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} і La^{2+} являються ефективними блокаторами кальцієвих каналів у різноманітних препаратах

[128]. В нейронах ці іони у мілімолярних концентраціях викликають неселективне пригнічення кальцієвого струму. Селективна дія цих катіонів починає проявлятися при використанні їх у мікромолярних концентраціях (від 2 до 20 мкМ). Різна афінність високопорогових і низькопорогових кальцієвих каналів до Cd^{2+} та Ni^{2+} дозволяє розділити ці струми через відповідні кальцієві канали. У більшості нейронів іони Cd^{2+} в концентрації 20 мкМ селективно блокують високопорогові кальцієві канали та не впливають на низькопорогові кальцієві канали [68], та навпаки, у багатьох нейронах ЦНС ссавців іони Ni^{2+} в концентрації 40 мкМ блокують НПК канали та істотно не впливають на ВПК канали [68, 129]. Тим не менш, існують виключення з цього правила, коли Ni^{2+} не можна використовувати для розділення кальцієвих струмів [130]. Так, наприклад струми в нейронах дорзальних гангліїв та у клітинах нейробластоми людини (IMR32) лише частково блокуються іонами Ni^{2+} в концентрації 100 мкМ, однак, за своїми електрофізіологічними характеристиками вони відносяться до НПК струмів [65, 70]. Одним з можливих пояснень цього феномена може служити факт існування кількох підтипів НПК каналів [131-134]. Причини селективного блокування ВПК каналів іонами Cd^{2+} та НПК каналів іонами Ni^{2+} не очевидні. Можливо, що ця селективність обумовлена взаємодією блокуючих катіонів з різними центрами зв'язування усередині ВПК та НПК каналів, котрі мають різні енергетичні профілі та локалізацію. Також, вірогідно, що з цієї ж причини проникність для іонів Ca^{2+} у НПК каналів більша, ніж у ВПК каналів (відношення проникності $P_{(\text{Ca}^{2+})}/P_{(\text{Ba}^{2+})}$ дорівнює 0,4 та 1,2 відповідно) [75].

Існування всередині ВПК канала потенціал чутливого Cd^{2+} -зв'язуючого центра підтверджує потенціалзалежне блокування ВПК струму іонами Cd^{2+} у мікромолярних концентраціях [83, 135, 136]. В цих експериментах було показано, що Cd^{2+} в концентрації 20 мкМ викликає повне пригнічення ВПК струму при зміщенні деполяризуючого значення мембранного потенціалу до +10 мВ. Тим не менш, при наступному зміщенні

мембранного потенціалу до від'ємних значень, реєструвався «хвіст» цього струму, амплітуда якого залежала від значення мембранного потенціалу [83]. Таким чином дані цих експериментів вказують на те, що іони Cd^{2+} потенціалзалежно взаємодіють з центром зв'язування, котрий розташований всередині каналу.

Блокуюча дія іонів Ni^{2+} на НПК струми також потенціалзалежна, однак носить зворотній характер [137]. Іони Ni^{2+} в концентрації 100 мкМ ефективно блокують НПК струм при мембранному потенціалі -40 мВ, а при зміщенні у бік позитивних значень ефективність помітно знижується. Підсилення блокуючої дії іонами Ni^{2+} НПК струму при зміщенні мембранного потенціалу до більш від'ємних значень також підсилює селективну дію цих іонів на НПК канали. Так як іони Ni^{2+} мають менший іонний радіус ніж іони Cd^{2+} , то вони оточені більшою гідратною оболонкою, і тому здатні блокувати НПК канали, котрі були активовані при значеннях мембранного потенціалу від -60 до -40 мВ, тоді як ВПК канали, при цих же значеннях, ще не активовані.

1.4.2. Дигідропіридини

Серед лігандів кальцієвих каналів, 1,4-дигідропіридини використовуються для блокування або збільшення потоку іонів Ca^{2+} через мембрану найбільш часто. Через свою високу афінність до кальцієвих каналів дигідропіридини використовуються для з'ясування локалізації L-типу кальцієвих каналів, а також для очищення та виділення цих каналів із клітин скелетних м'язів [138-143]. Дія дигідропіридинів на нейрональні кальцієві канали потенціалзалежна. Не дивлячись на інтенсивне використання дигідропіридинів в дослідженнях стимул-секреторного поєднання, існує лише незначна кількість робіт присвячених дії цих речовин на нейрональні кальцієві канали. Це пов'язано з тим, що дія дигідропіридинів - потенціалзалежна [144-146].

При блокуванні кальцієвих каналів нітрендипіном збільшення мембранного потенціалу з -80 до -10 мВ в клітинах серцевого м'яза викликає зменшення константи дисоціації з $0,76$ мкМ до $0,36$ нмоль/л. Аналогічна залежність блокуючої дії від значення мембранного потенціалу спостерігається також для кальцієвих антагоністів ніфедипіну [146] та німодипіну [147]. В цих роботах було показано, що ніфедипін в концентрації 100 нмоль/л пригнічує приблизно 60% ВПК струму при мембранному потенціалі -30 мВ і менше 10% при -90 мВ. Блокуюча дія німодипіна на ВПК канали залежить як від мембранного потенціалу, так від частоти стимуляції клітини. Константа дисоціації взаємодії німодипін з відкритим кальцієвим каналом становить 1 нМ.

Залежність дії дигідропіридинів від мембранного потенціалу обмежує діапазон їх використання (от -30 до -50 мВ). З цієї причини немає прямих даних про дію дигідропіридинів на НПК канали, які стаціонарно інактивовані при мембранному потенціалі -50 мВ. Тим не менш, є дані про селективну блокуючу дію дигідропіридинів на НПК канали в нейронах ЦНС.

Кальцієві агоністи, такі як рацемат BayK8644 та енантіомери (+)-(S)-202-791 (+)-PN200-110 вільні від цих обмежень та часто використовуються для ідентифікації ДГП-чутливих кальцієвих каналів в тканинах тварин [148]. Ці агоністи володіють високою афінністю до кальцієвих каналів з кардіоміоцитів та нервових клітин ($KD=10$ нМ), а їх дія максимально при дуже низьких значеннях мембранного потенціалу (-90 мВ) [145, 149, 150].

1.4.3. Токсини *Conus spp.* та *Agelenopsis aperta* як інструмент при вивченні кальцієвих каналів

Загальновизнаним джерелом токсинів, які взаємодіють з ацетилхоліновими рецепторами (α -конотоксини) [151, 152] та потенціалкеруваними натрієвими каналами (μ -конотоксини) [152, 153] є рід

молюсків *Conus* [154]. В 1984 році із отрути морського равлика *Conus geographus* вперше був виділений токсин, який володіє пресинаптичною інгібуючою дією [155]. Цей пептид, що містить в первинній структурі 27 амінокислот, був названий ω -конотоксин GVIA (ω -CTx-GVIA) [156]. Він селективно та ефективно блокує N-тип кальцієвих каналів. Гомологічна ідентичність амінокислотної послідовності ω -конотоксинів складає від 50% до 90%, а в межах одного виду вона ще вища. Всі ω -конотоксини полярні та добре розчинні в воді. Наявність великого сумарного позитивного заряду (+5, +6) забезпечує цим токсинам надійне зв'язування з рецепторним центром кальцієвого каналу [157].

ω -Aga-IVA токсин (складений з 48 амінокислот) був виділений з отрути павука *Agelenopsis aperta*, що мешкає в південно-західній Америці. Як було показано [104, 106], цей токсин селективно та ефективно блокує P-канали в нейронах Пуркінє мозочка. Концентрація половинної дії IC₅₀ для ω -Aga-IVA токсину, складає декілька наномолей. Первинне вивчення властивостей токсину відбувалось з використанням очищеного нативного пептиду, виділеного з отрути. В подальшому ω -Aga-IVA токсин був успішно синтезований на структурній основі амінокислотної послідовності природнього токсину.

1.5. Регуляція кальцієвих каналів

Застосування електрофізіологічних методів та успіхи у фармакологічних і біохімічних дослідженнях дозволили також значно розширити коло досліджуваних механізмів внутрішньоклітинної регуляції кальцієвих каналів. Серед внутрішньоклітинних агентів, що змінюють активність кальцієвих каналів, насамперед треба виділити самі іони кальцію, здатні як безпосередньо діяти на мембранні канали, так і активувати різні кальцій-залежні ферменти та білки [158]. Регуляція кальцієвих каналів може здійснюється шляхом фосфорилювання каналних

молекул протеїнкіназою А (ПКА) [34, 46, 159-163], кальцій-кальмодулін-залежною протеїнкіназою (CaM) [164], а також протеїнкіназою С (ПКЦ) [62, 163-169]. Було також встановлено прямий вплив на кальцієві канали GTP-зв'язуючих білків (G-білків) [99, 100, 170-172]; залучення ароматичних амінокислот [173] чи каскаду арахідонової кислоти [174], а також протеїнофосфатаз котрі дефосфорилують кальцієві канали [104, 105, 175, 176], та ін.

1.6. Резюме

В огляді літератури показані сучасні уявлення щодо про структуру кальцієвих каналів плазматичної мембрани та їх регуляцію, описано типи та функції цих каналів. Значну цікавість викликають клітинні механізми регуляції кальцієвих каналів ендogenousними сполуками, які явно суперечать “класичній” парадигмі модуляції ПККК, зокрема агоністами опіоїдних рецепторів. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методичні підходи

Для дослідження впливу опіоїдів на високопорогові потенціал-залежні Ca^{2+} канали нейронів головного мозку ссавців застосовувались такі методичні підходи:

- виділення гостроізолюваних клітин із зрізів мозочку щурів при використанні методу м'якої ферментативної обробки нервових тканин;
- методи внутрішньо- та зовнішньоклітинної перфузії;
- реєстрація трансмембранних іонних струмів з використанням методу “петч-клемп” у конфігурації «ціла клітина».

2.2. Експериментальні тварини

В експериментах використовувались білі щури лінії Вістар WAG\GSto (Москва, Росія) віком 8-12 днів (Рис. 2.1), що утримувались на стандартній лабораторній дієті у віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Вибір тварин такого віку пояснюється тим, що до цього терміну закінчується диференціація нейронів Пуркінє мозочку[177, 178], крім того, розвиток елементів сполучної тканини не зашкоджує легкій ферментативній обробці, що використовувалась для ізоляції поодиноких нейронів.



Рис. 2.1 - Білий щур лінії Bistar WAG/GSto.

Крім того, мозок молодих тварин краще витримує умови приготування препаратів зрізів і дозволяє звести до мінімуму вплив травми на реєстрацію клітинної активності. Вибір тварин молодого віку пояснюється також відносною легкістю формування гігаомних контактів між мікропіпеткою та мембраною виділених нейронів. Експерименти над тваринами проводились згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Проведення всіх експериментальних досліджень було узгоджено з Комітетом з біоетики інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

2.3. Морфологічні та фізіологічні особливості мозочоку щурів

Багато чого з того, що відомо про функції мозочка (*cerebellum*) зв'язано зі спостереженнями неврологів-клініцистів. Не дивлячись на те, що мозочок одержує в основному сенсорні сигнали і дає проєкції до рухових центрів, хворі з його ушкодженнями (пухлинами чи запальовальними процесами у випадку розсіяного склерозу) не стають паралізованими, у них не порушується чутливість. Симптоматика мозочкових патологій характеризується аномальним виконанням рухів і зникненням спряження між ними і позою. Отже, мозочок бере участь у сенсомоторній інтеграції і виконує важливу функцію координації рухів.

Мозочкові симптоми залежать від місця ушкодження. Патологія медіальної області викликає порушення позних рухових функцій, а також механізму що рухає око, тоді як латеральні поразки позначаються, головним чином, на цілеспрямованих рухах та мові. Функціональна подвійність мозочка, що виявляється при клінічних спостереженнях, відповідає його структурній і філогенетичній подвійності. Спрощуючи, можна сказати, що його філогенетично більш древні медіальні структури одержують спинальні, вестибулярні і зорові сигнали і тісно зв'язані з руховою системою (руховими центрами спинного мозку й стовбура), тоді як до розвинутих пізніше латеральних елементів (півкуль) інформація йде насамперед від кори мозку, до якої від них, у свою чергу, направляються висхідні шляхи. Ці неврологічні й анатомічні особливості приводять до висновку, що медіальна частина мозочка здійснює, головним чином, регуляцію та корекцію рухів у ході їхнього виконання, а його півкулі (Рис. 2.2) більше беруть участь у підготовці, програмуванні рухів. Крім того, недавно виявлені довгострокові зміни синаптичної передачі сигналів у

мозочку. Думають, що така пластичність відіграє роль у довгостроковій руховій адаптації і руховому навчанні.

Про структурні зв'язки і їхні функції у корі і ядрах мозочка накопичено безліч експериментальних даних. Поверхня його кори дуже велика завдяки великій кількості складок (листочків, Рис. 2.2); якби їх можна було розправити, її площа склала б 17х120 см². Мікроструктура всіх листиків однакова; регулярний розподіл нервових елементів у кожному із них нагадує структуру кристала. Така організація дуже сприятлива для

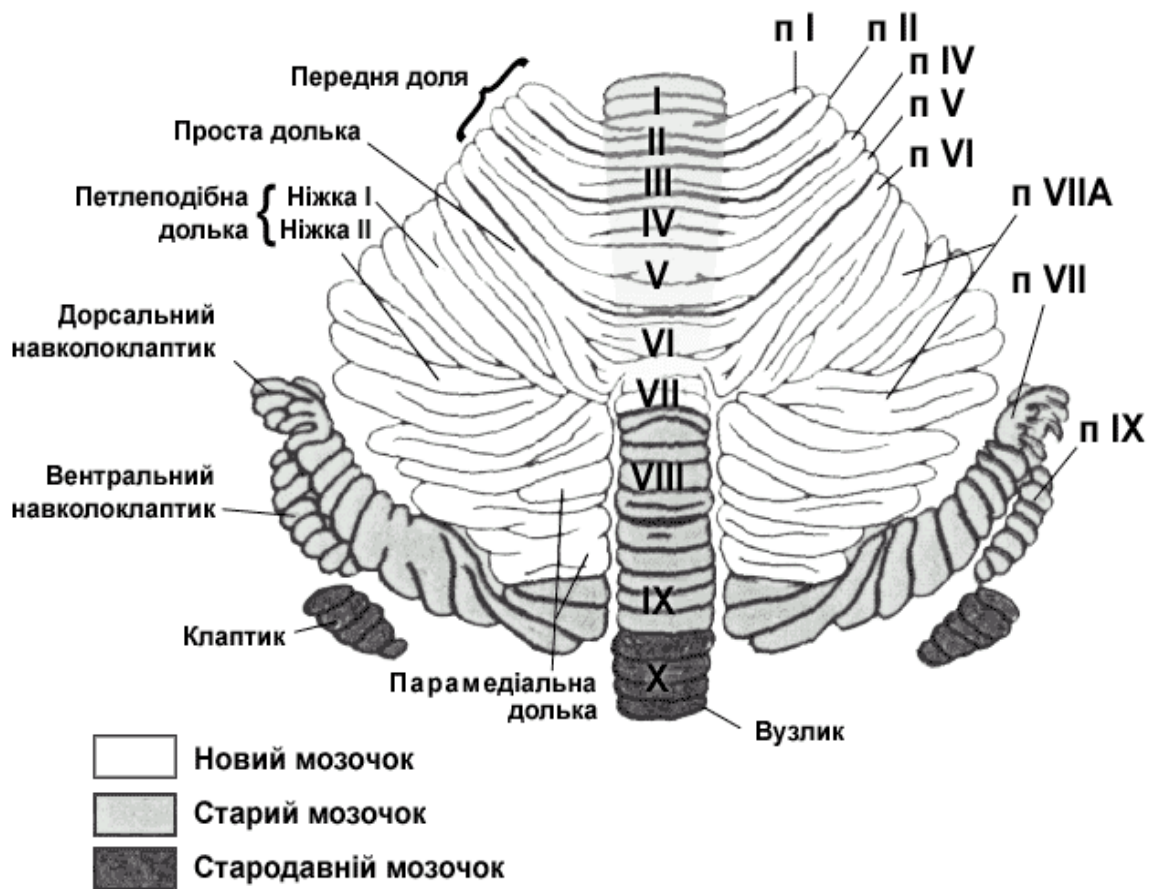


Рис. 2.2 - Схема областей кори мозочка приматів (мави). Передня частка «відкрита» і представлена в тій же площині, що і задня. Частки позначені римськими цифрами (I-IX), а відповідні частини півкуль – символами III-PIX. Філогенетичний підрозділ мозочка показаний показаний білим, сірим і чорним кольором. У кори характерна складчаста структура, утворена безліччю листочків.

фізіологічного дослідження, оскільки дозволяє робити узагальнення про

принципи роботи всього мозочка. У 1960-і рр. унікальне спільне дослідження Екклза, Іто, Сентаготаї [177] та їх колег продемонструвало основні характеристики функціональних зв'язків і природу медіаторних речовин у нейронних мережах мозочку. На Рис. 2.3 представлені спрощена схема шаруватої структури листика, регулярна палісадоподібна організація дендритних розгалужень кліток Пуркіньє, паралельні волокна що проходять під прямим кутом через цю зону, медіатори для різних пунктів зображеної мікромережі. Показано молекулярний шар (МШ), шар клітин Пуркіньє

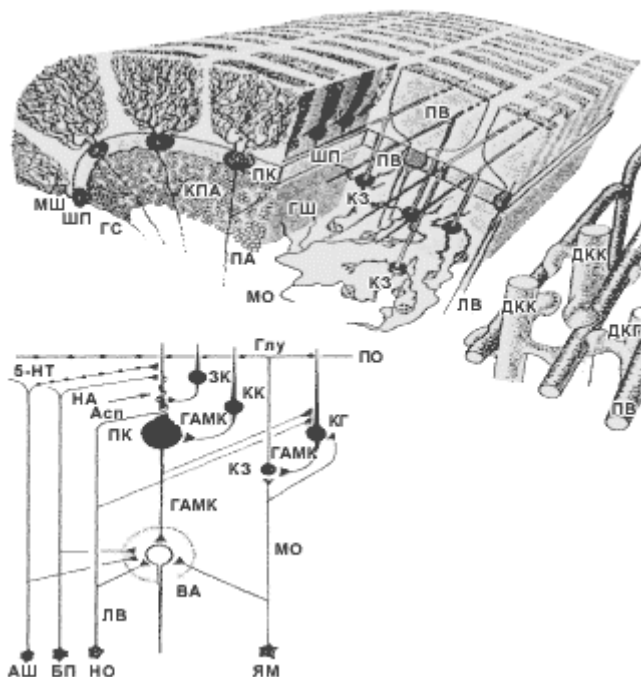


Рис. 2.3 - Організація кори мозочка.
Угорі ліворуч: схема поперечного зрізу через листок.

(ШП) і гранулярний шар (ГШ); видні могутні дендритні розгалуження клітин Пуркіньє. Від клітини Пуркіньє (ПК) у білу речовину мозочка йде аксон (ПА), що посиляє зворотні колатералі (КПА). Клітини Пуркіньє розташовуються правильними рядами як поперек, так і уздовж листка. У клітин зерен (КЗ) із синаптичними входами від моховитих волокон (МВ) є Т подібні аксони, що йдуть уздовж листка у вигляді

паралельних волокон (ПВ), що утворюють безліч синаптичних контактів із дендритами клітин Гольджі (ДКГ), корзиноподібних кліток (ДКК) і клітин Пуркіньє (ДПК). Ці контакти із шипиками дендритів показані збільшеними вгорі праворуч. Унизу: головні синаптичні контакти в листку. Вхідні сигнали надходять через моховиті волокна (МВ) від ядер моста (ЯМ), паралельні волокна (ПВ), ліаноподібні волокна (ЛВ) від нижньої оливи (НО), серотонінергічні волокна від ядер шва (ЯШ) і норадреналінергічні

волокна від блакитної плями (БП). Клітини Пуркіньє (ПК) – єдині вихідні елементи кори мозочка. Зірчасті клітини (ЗК), корзиноподібні клітини (КК) і клітини Гольджі (КГ) являють собою місцеві інтернейрони. У корі мозочка багато також серотоніну (5-НТ) і норадреналіну (НА). Нейрони-мішені клітин Пуркіньє знаходяться в ядрах мозочка й у комплексі вестибулярних ядер (ВЯ).

Над шаром тіл клітин Пуркіньє (у людини їх близько 15 млн.) розташовується молекулярний шар із щільної мережі їхніх дендритів, клітин Гольджі, а також аксонів паралельних волокон. У цьому шарі розсіяні також тіла інтернейронів (зіркоподібних і корзиноподібних клітин). Під шаром клітин Пуркіньє знаходиться гранулярний (зернистий) шар із численними клітинами-зернами (більш 2 млн. на 1 мм³!), що містить також тіла клітин (інтернейронів) Гольджі. До кожної клітини Пуркіньє підходить одне лазяче (ліаноподібне) волокно, причому кожне таке волокно дає відгалуження в 10-15 клітин Пуркіньє. Обвиваючись навколо дендритного дерева цієї клітини, воно формує тут безліч збуджуючих синапсів, що забезпечує виняткову надійність синаптичної передачі. Моховиті волокна утворюють синаптичні контакти з дендритами клітин-зерен. Велике термінальне розгалуження, тобто дивергенція зв'язків, цих волокон забезпечує збудження ними великої кількості клітин у корі мозочка. Клітини Пуркіньє забезпечують вихід сигналів із кори мозочка. Вони чинять гальмівну дію на його власні й вестибулярні ядра.

У деяких точках цієї мережі, що має власні входи й виходи, передача сигналу може бути загальмована різними інтернейронами (клітинами Гольджі, корзиноподібними і зіркоподібними клітинами). Фонова активність кліток Пуркіньє тонічно гальмує нейрони-мішені ядер мозочка та вестибулярних ядер. Посилення активності клітин Пуркіньє щодо фонового рівня, що обумовлене збудливими сигналами моховитих і ліаноподібних волокон, поглиблює гальмування, а її ослаблення під впливом гальмових інтернейронів розгальмовує нейрони-мішені.

Сполучення постійної високої фонові активності нейронів вихідних ядер мозочка і численних гальмівних процесів у його корі визначає розподіл збудження цих ядер з тонкою просторово-часовою настройкою й можливістю розвитку протилежних по характеру реакцій.

Робоча гіпотеза, що стосується загального принципу діяльності медіальних структур мозочка, проілюстрована на Рис. 2.4. Через колатералі вони одержують копію команд, що посилаються руховими центрами по низхідним рухових шляхах у спинний мозок (копію еферентації). З іншого

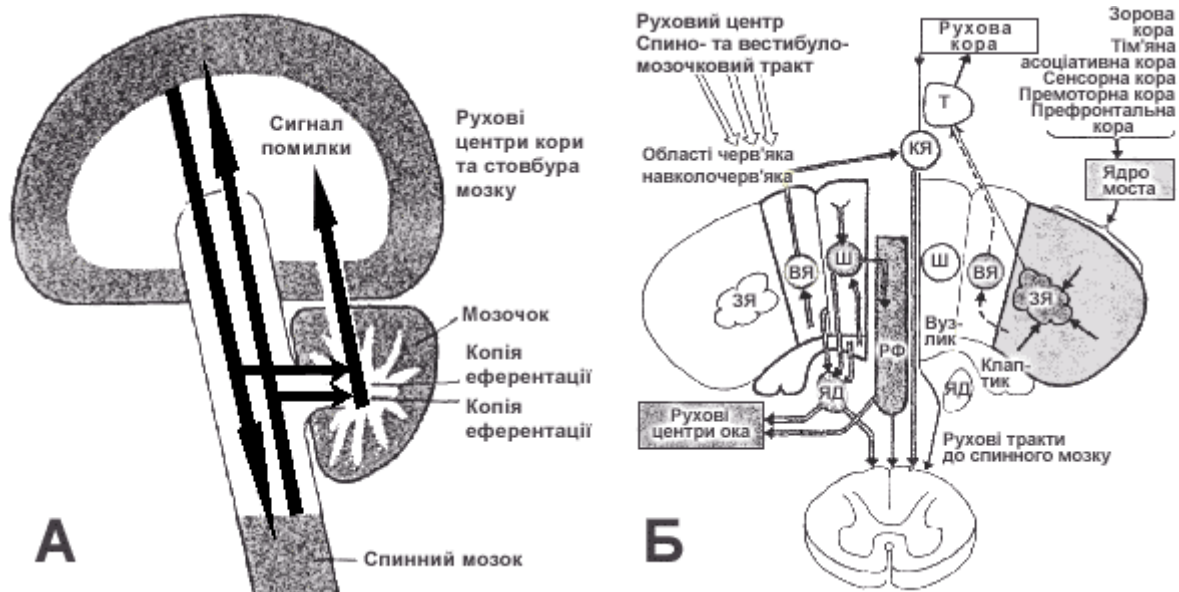


Рис. 2.4 - Функції медіальних і латеральних структур мозочка.

боку, мозочок одержує також копію сенсорної аферентації по колатералі від висхідних шляхів. Схема ілюструє гіпотезу, відповідно до якої, зіставляючи два входи, він може оцінювати відхилення від наміченої точки (помилку). Сигнал про це передається в рухові центри, за рахунок чого після початку руху відбувається безупинна корекція рухової програми. Ця схема заснована як на виявлених нервових зв'язках, так і на клінічних спостереженнях [179].

Головна її ідея в тому, що мозочок – це функціональне відгалуження головної осі «кора великих півкуль – спинний мозок». З одного боку, у ньому замикається сенсорний зворотний зв'язок, тобто він одержує копію аферентації, з іншого боку, сюди ж надходить копія еферентації від рухових

центрів. Говорячи технічною мовою, перша сигналізує про поточний стан регульованої змінної, а друга дає представлення про необхідний кінцевий стан. Зіставляючи перше й друге (функція компаратора), кора мозочка може розраховувати помилку, про яку повідомляє в рухові центри через свої вихідні ядра. Так мозочок безупинно коректує як навмисні, так і автоматичні рухи. Елементи й зв'язки медіального відділу мозочка представлені в лівій половині Рис. 2.4Б. Медіальні елементи мозочка дають проєкції до ядра шатра (*n. fastigii*), а також до шароподібного (*n. globosus*) і пробкоподібного (*n. emboliformis*; у кішки – *n. interpositus*) ядер, що у свою чергу утворюють зв'язки, головним чином, із стовбурними руховими центрами. Ядро Дейтерса – вестибулярний руховий центр – теж прямо одержує сигнали від черв'яка і від флокулонодулярної частки.

Елементи й зв'язки латеральних частин мозочка представлені на Рис. 2.4Б. Проєкції першої йдуть переважно в рухові центри стовбура мозку, а другий – через вентролатеральний таламус (Т) у рухову кору великих півкуль. Пояснення в тексті. Ш – ядро шатра; УЯ – уставне ядро; ЗЯ – зубцювате ядро; ЧЯ – червоне ядро; РФ – ретикулярна формація; ЯД – ядро Дейтерса. До латеральних елементів мозочка йдуть сигнали переважно від кори великих півкуль через ядра моста (*pons*) і нижньої оливи. Нейрони першої групи ядер посилають у кору обох півкуль мозочка моховиті волокна, другої групи – ліаноподібні. У людини одночасно із сильно розвинутою корою великих півкуль добре розвинуті також ядра моста й оливи. Найбільш важливі входи до ядер моста надходять від зорової, тім'яної асоціативної, сенсомоторної, а також премоторної й префронтальної асоціативної областей кори. Назва понтоцеребелум (неоцеребелум) відбиває перевагу зв'язків півкуль мозочка з ядрами моста. Нижня олива одержує проєкції від рухової (моторної) і премоторної (а в людини, можливо, і від інших) областей кори, а також аференти від підкіркових рухових центрів (через центральний тегментальний тракт).

Клітини Пуркіньє півкуль мозочка дають проекції через латеральні зубцюваті ядра (*n. dentati*) до рухових ядер таламуса і далі до рухових областей кори великих півкуль. Через ці два входи півкулі явно одержують інформацію від коркових областей, що активуються у фазу підготовки до руху, тобто беруть участь у його «програмуванні».

2.4. Методика ферментативної ізоляції нейронів

Пуркіньє

Для виділення ізольованих нейронів Пуркіньє, придатних для дослідження методом фіксації потенціалу, був використаний спосіб м'якої ферментативної обробки тканин [180], метод вібродисоції [181] не може бути застосовани для ізоляції нейронів Пуркіньє мозочку щурів через його морфологічні особливості (див. пп. 2.3.), оскільки ці нейрони розташовані моношаром між молекулярний шар (МШ), та гранулярним шаром (ГШ). Після декапітації тварини мозочок щура швидко витягався й переносився в розчин наступного складу (у мМ): NaCl 137, KCl 3, NaHCO₃ 26, глюкоза 30, MgCl₂ 2, KH₂PO₄ 1.5, Na₂HPO₄ 6.3 (pH 7.4, T=0 °C). За допомогою тонкого леза під контролем бінокулярного мікроскопа МБС-10 готувалися поперечні зрізи мозочка товщиною 300-400 мкм. Вони інкубувались при кімнатній температурі (19–24 °C) протягом 30 хвилин у цьому ж розчині, насиченому карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂). Ферментативна обробка проводилася шляхом додавання 2.4мг/мл ферменту протеїнази XXIII *Aspergillus oryzae* у розчин. Вона продовжувалася протягом 25-30 хвилин при 22 °C в умовах постійного насичення розчину карбогеном. Після ферментативної обробки зрізи ретельно (20 хвилин) відмивалися від ферменту в чистому розчині. Цей метод дозволяв використовувати зрізи для одержання ізольованих нейронів протягом 8-10 годин. Ізольовані нейрони виділялися шляхом багаторазового пропущення тканини зрізів через

декілька скляних мікропіпеток (діаметр кінчика від 1.0-0.8 до 0.1-0.3 мм) у розчині Рінгера наступного складу: 150 NaCl, 5 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 глюкози; pH був доведений 1 М розчином NaOH до 7.4. Описана послідовність обробки зрізів мозочка дозволяла одержувати ізольовані нейрони Пуркінє, які можна було ідентифікувати по їхній характерній формі.

2.5. Методики електрофізіологічних досліджень

2.5.1. Метод внутрішньоклітинного діалізу

Для реєстрації іонних струмів через мембрану досліджуваних нейронів був застосований метод внутрішньоклітинної перфузії [182, 183], у модифікації, що дозволяє використовувати скляні мікропіпетки (мікроелектроди). Мікропіпетки виготовлялися за методом Неєра та інших [184] із легкоплавких скляних капілярів діаметром 1.8 мм. Виготовлення піпеток проводилося витяжкою у дві стадії. Методика витяжки була аналогічна використовуваній при виготовленні піпеток для реєстрації струмів від малих ділянок мембрани [36], однак розміри піпеток вибиралися з урахуванням розмірів нейронів. Діаметр кінчика мікропіпетки дорівнював 2-4 мкм, опір становив близько 2-5 МОм. Піпетки заповнювалися внутрішньоклітинним розчином (у mM): 70 Tris-PO₄, 5 EGTA, 40 TEA-Cl, 30 Tris-Cl, 5 Mg-ATP, 0.5 GTP; pH 7.2. Склад позаклітинного розчину (розчин Рінгера) становив (у mM): 130 NaCl, 3 CaCl₂, 5 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES-NaOH; pH=7.4.

2.5.2. Метод фіксації потенціалу на мембрані нейрона

Фіксація потенціалу на мембрані перфузованих нейронів проводилася за допомогою подачі різниці потенціалів на два хлор-срібних електроди, що

знаходились в поза- і внутрішньоклітинних розчинах. Підтримуваний мембранний потенціал і деполяризуючий імпульс подавалися за допомогою внутрішньоклітинного електрода. Обидва електроди підключалися перетворювача «струм-напруга», підсилювача трансмембранних струмів RK-100 (Biologic, Франція).

Після прориву мембрани встановлювався прямий електричний контакт із внутрішньою стороною мембрани. Опір такого контакту (послідовний опір) залежить від геометрії кінчика піпетки й площі зруйнованої частини мембрани. У наших експериментах цей опір складав 2-3 МОм, а похибка підтримуваного потенціалу в залежності від величини кальцієвого струму складала в середньому 3-5 мВ. Порівняно невелика величина послідовного опору дозволяла фіксувати потенціал на клітинній мембрані. Усе це справедливо для кліток із невеликими відростками. Так як нейрони Пуркінє мають дуже розгалужену систему дендритів, то послідовний опір між умістом соми нейрона і постсинаптичним закінченням, розташованим на його дендриті (опір доступу), може значно перевищувати опір самої піпетки і досягати декількох десятків мегаом. У таких умовах може з'явитися відчутна помилка у фіксації потенціалу в постсинаптичному закінченні. На жаль, це - непереборний недолік роботи з цими нейронами. Проте, цю помилку можна істотно зменшити шляхом використання в таких експериментах нейронів, у яких було практично відсутнє дендритне дерево. Такі нейрони завжди з'являються в результаті виділення їх із зрізів шляхом багаторазового пропущення тканини зрізів через декілька скляних мікропіпеток.

2.5.3. Методика реєстрації трансмембранних струмів

Ізольовані нейрони поміщувалися в чашку Петрі, заповнену позаклітинним розчином Рінгера, і встановлену на предметному столику мікроскопа. У цій чашці Петрі під мікроскопічним контролем піпетку з

підтримуваним потенціалом в 0 мВ за допомогою мікроманіпулятора наближали до обраного нейрона. При цьому в піпетці підтримували постійний невеликий позитивний тиск, щоб запобігти її забивання фрагментами ушкоджених кліток. При досягненні необхідної дистанції між піпеткою й кліткою (прогинання мембрани чи навіть відхилення всієї клітки під напором розчину, що впливає) тиск у піпетці скидали і при необхідності короткочасно прикладали невеликий негативний тиск до утворення щільного контакту поверхні нейрона зі стінками піпетки.

Надалі частину мембрани, що знаходилась всередині піпетки, руйнували шляхом подачі до внутрішньої частини піпетки невеликого негативного тиску, після чого у відповідь на деполяризуючий зсув мембранного потенціалу від -100 до -40 мВ спостерігався потенціалкерований вхідний ТТХ-чутливий натрієвий струм. Після прориву внутрішньої частини мембрани опір витоку складав близько 100-200 МОм, однак, через 1-2 хвилини після початку перфузії клітини внутрішньоклітинним розчином, цей опір збільшувався до 0,5-2 ГОм.

2.5.4. Метод фіксації концентрації

Схема експериментальної установки для швидкої аплікації позаклітинних розчинів представлена на Рис. 2.5. Піпетку з перфузованим нейроном за допомогою мікроманіпулятора вміщували в отвір U-подібно зігнутої скляної трубки, що була занурена у позаклітинний розчин. Інший кінець трубки через електромагнітний клапан був сполучений із джерелом негативного гідростатичного тиску (20-30 см водяного стовпа). Після цього, система піпетка-трубка могла знаходитись у повітрі без утрати електричного контакту й змін у характеристиках іонних струмів. Вихідну камеру з ізольованими нейронами заміняли на скляний диск із невеликими заглибленнями (об'ємом 800 мл), котрі заздалегідь заповнювали розчинами для аплікації (див. Рис. 2.5).

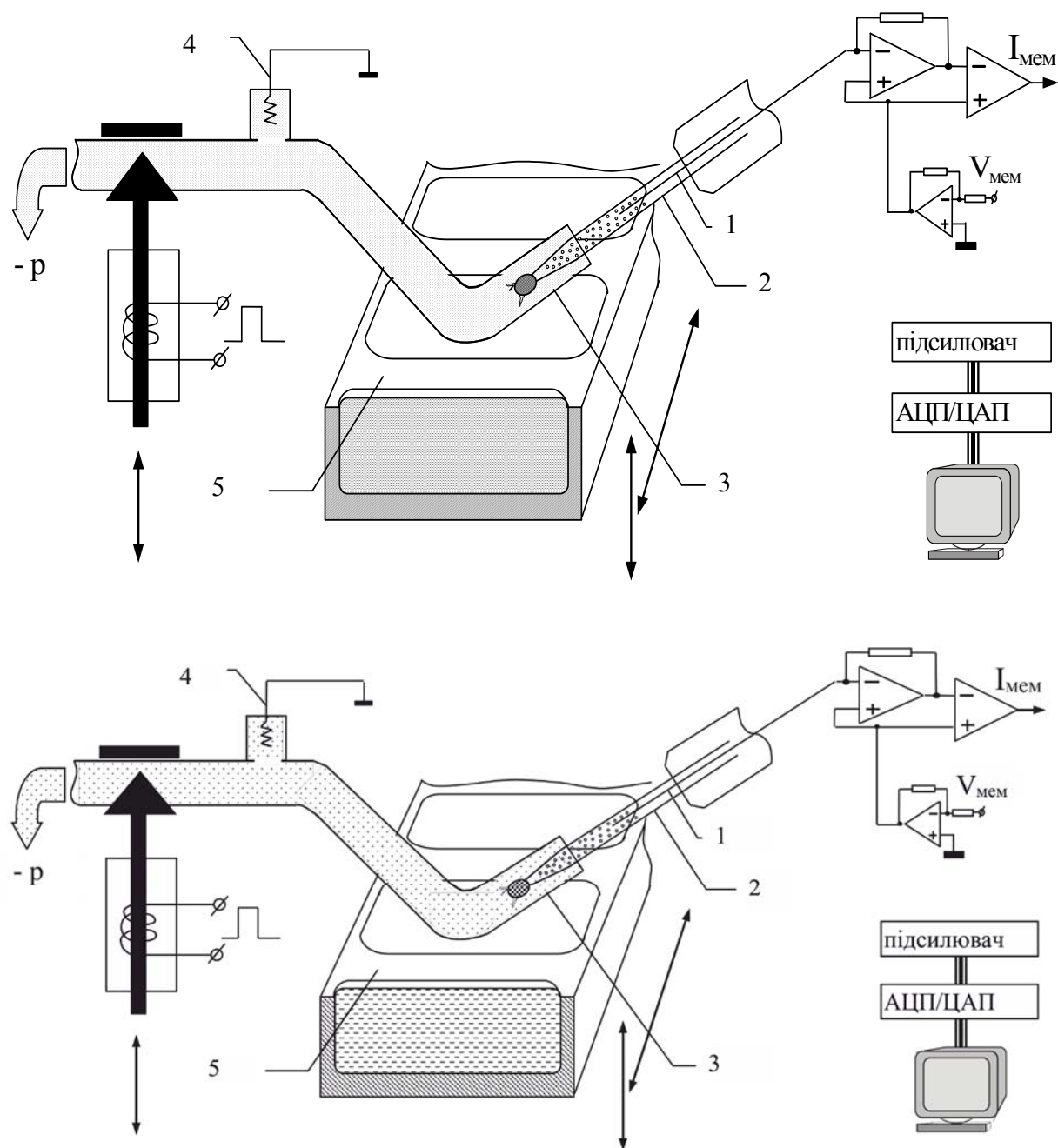


Рис. 2.5 - Принципова схема експериментальної установки. 1- вимірювальний електрод; 2- мікропіпетка, заповнена внутрішньоклітинним розчином; 3- трубка для аплікації; 4 індиферентний електрод; 5 - диск із комірками для розчинів.

При необхідності отримання хемоактивованих струмів синхронно з відкриванням клапана проводився запис струму, що проходить через мембрану досліджуваного нейрона. Використання в наших експериментах пристрою “Jumping Table” (Pharma Robot, Київ, Україна) дозволяло проводити швидку зміну позаклітинних розчинів протягом 15-20 мсек.

Перед аплікацію потрібне заглиблення камери розміщували під системою “піпетка-трубка”, після чого камеру підіймали так, щоб отвір повністю занурився в розчин для аплікації. Програмно кероване відкривання клапана дозволяло швидко змінювати розчин у коліні U-подібної трубки.

При цьому тривалість між аплікаціями речовин складала загалом 4-5 сек. і була лімітована часом, необхідним для перенесення системи “піпетка-трубка” в інше заглиблення диска для аплікації.

Час заміни зовнішньоклітинного розчину оцінювався по швидкості зменшення натрієвого струму при аплікації безнатрієвого розчину. Як правило, час заміни розчину складав не більше 30 мсек. Збільшити швидкість концентраційного стрибку можна було збільшенням гідростатичного тиску, однак зробити це, як правило, не дозволяли вимоги до механічної стійкості клітини.

2.6. Реєстрація даних і обробка результатів

2.6.1. Реєстрація даних

Трансмембранні струми реєструвалися за допомогою підсилювача A-M Systems 2400 (A-M Systems 2400, Карлсборг, США) та фільтрувалися 4-полюсним фільтром Беселя з частотою зрізу 3 або 10 кГц у залежності від експериментальних умов. З виходу фільтра сигнал надходив на контрольний осцилограф і аналого-цифровий перетворювач (АЦП) плати збору даних. Плата збору даних Labmaster (List, Германія), дозволяла виконувати дискретизацію даних у широких частотних межах, що було цілком достатньо для поставлених задач. Стимуляція клітин здійснювалася за допомогою аналогових та цифрових сигналів, що генерувалися платою збору даних. Усі експерименти проходили в повністю автоматичному режимі під керуванням IBM PC сумісного персонального комп'ютера. Зміна

розчинів здійснювалася за допомогою пристрою “Jumping Table™” (Pharma Robot, Київ, Україна), що також повністю керувався комп’ютером через стандартний паралельний інтерфейс комп’ютера.

Використання програмного забезпечення власної розробки дозволило гнучко змінювати параметри реєстрації, а також реалізовувати потрібні протоколи. Дані з плати збору даних зберігалися на жорсткому диску комп’ютера у файлах бінарного формату. Програмне забезпечення експериментальної частини було написане під платформу MS-DOS, що в виявило його деякі обмеження у реєстрації довгих записів.

2.6.2. Обробка експериментальних даних

Аналіз отриманих даних проводився на комп’ютері з використанням аналітичних програмних засобів “Jumping Table™” (Pharma Robot, Київ, Україна) та Microcal Origin (OriginLab Corporation, Нортгемптон, США). Амплітуда кальцієвого струму визначалася від базової лінії до його пікового значення. Положення максимуму кривої ВАХ кальцієвого струму на осі абсцис визначалося за даними методу інтерполяції поліномами експериментальних значень ВАХ. Апроксимація кінетики активації кальцієвих струмів здійснювалася експоненціальними функціями.

Крім окремо визначених випадків, усі експериментальні дані представлені у вигляді середніх арифметичних значень \pm стандартна похибка середнього арифметичного значення.

2.7. Реактиви, що використовувались в експериментах

Усі реактиви, використані для приготування внутрішньо- та зовнішньоклітинних розчинів були виготовлені фірмою Sigma (Сент-Луїс, США), окрім: Ендоморфін-1, DAMGO, СТОР та ω -Aga-IVA - виробництва Tocris (Бристоль, Великобританія).

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Реєстрація струму через кальцієві канали Р-типу

Реєстрація вхідного кальцієвого струму Р-типу через соматичну мембрану морфологічно ідентифікованих нейронів Пуркін'є мозочка щурів

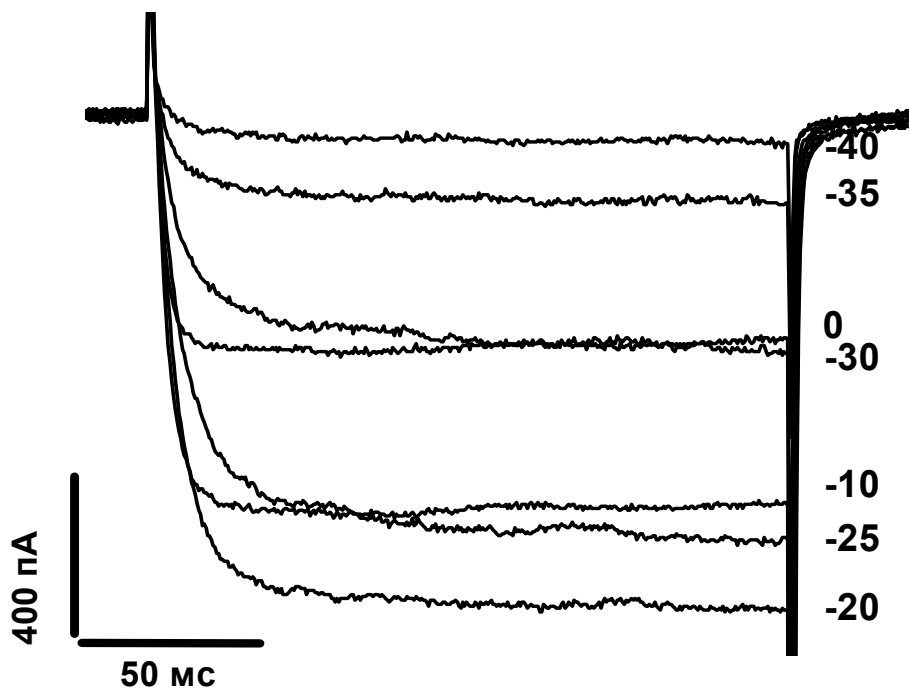


Рис. 3.1- Записи барієвих струмів через кальцієві канали Р типу при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Реєстрація проводилася з інтервалом 5 секунд, при деполяризуючому зміщенні мембранного потенціалу до значень, вказаних біля кожного запису.

проводилася методом «петч-клемп» у конфігурації «ціла клітина» при підтримуваному мембранному потенціалі -70 мВ. Як було показано раніше [104, 106, 180], за таких експериментальних умов весь вхідний струм є

високопороговим кальцієвим струмом Р-типу. Для усунення ефектів пов'язаних із впливом іонів Ca^{2+} на активність потенціалкерованих кальцієвих каналів [158, 185], в усіх проведених експериментах по реєстрації струмів Р-типу, у якості основного проникаючого катіона були використані іони Ba^{2+} . Наявність у внутрішньоклітинному розчині 5 мМ АТФ і 0,5 мМ ГТФ дозволяла нам реєструвати Р-струм на протязі 1-2 годин,

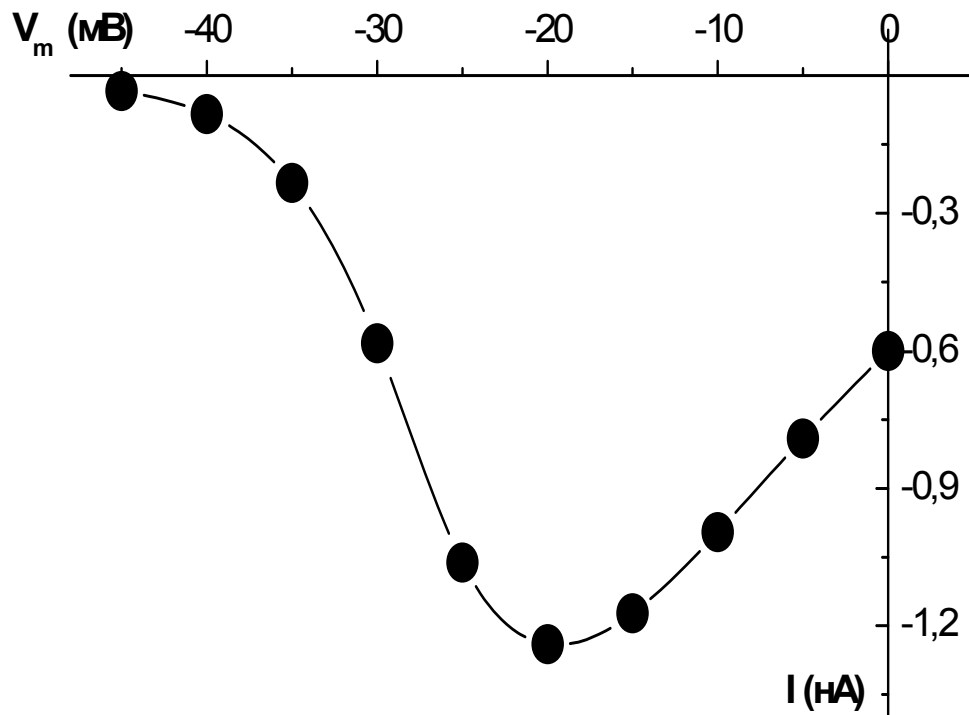


Рис. 3.2- Вольт-амперна характеристика барієвого струму Р типу при підтримуваному потенціалі -70 мВ.

і практично без «run-down» в інтервалі 15-20 хв.

На Рис. 3.1 представлені оригінальні записи кальцієвого струму Р-типу при різних значеннях тестуючого мембранного потенціалу. Початок активації Р-струму спостерігався при значеннях деполяризуючого зсуву мембранного потенціалу від -70 до -55 ÷ -50 мВ. Максимальне значення

амплітуди Р-струму варіювалося від 800 до 1500 пА в залежності від нейрону, а відповідне йому значення мембранного потенціалу спостерігалось при деполяризаційних зсувах мембранної напруги до $-35 \div -25$ мВ. Як видно з представлених на Рис. 3.1, даних, за наших експериментальних умов кінетика активації Р-струму є досить швидкою (порядку мілісекунд), в той час як кінетика інактивації цього струму дуже повільна і сягає декількох сотень мілісекунд, що знаходиться у гарній відповідності з даними інших дослідників [104].

Досліджуваний барієвий струм селективно блокувався ω -Aga-IVA токсином у концентрації 100 нМ, результати цих досліджень представлені на Рис. 3.3.

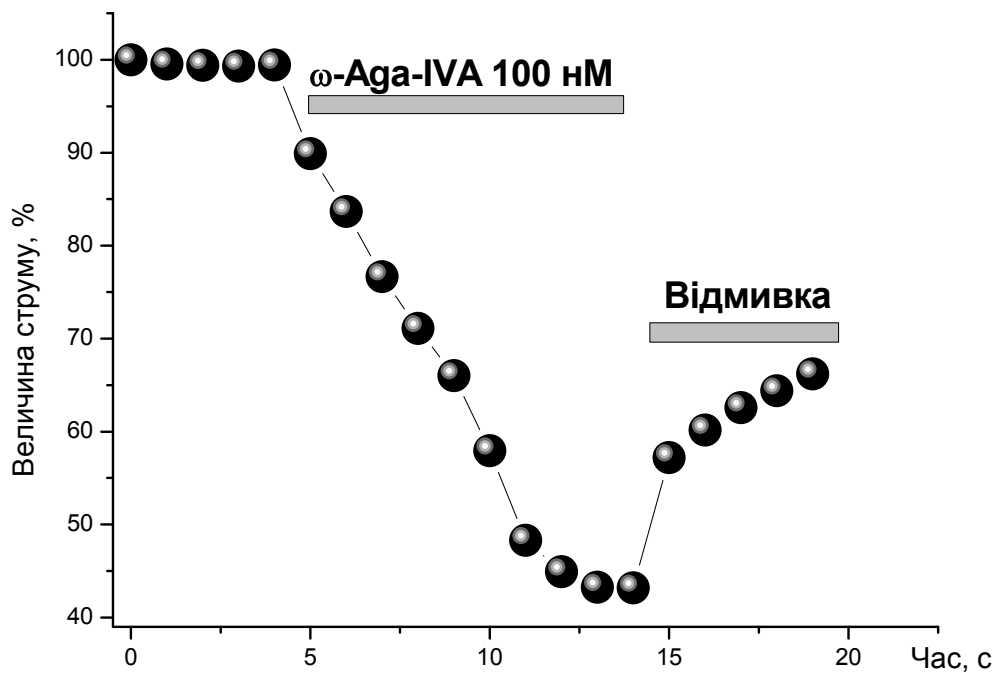


Рис. 3.3 - Блокування ω -Aga-IVA токсином потенціалзалежних кальцієвих струмів Р типу в гостроізолюваних нейронах Пуркінє. Барієві струми викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -30 мВ. Концентрація ω -Aga-IVA токсину становила 100 нМ.

Таким чином, дані цих експериментів є прямим доказом того, що весь зареєстрований нами трансмембранний струм, є високопороговим барієвим струмом через кальцієві канали Р-типу[106].

3.2. Модулюча дія агоністів опіюїдних рецепторів на Р-струм

3.2.1. Вплив морфіну на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркін'є щурів

Неселективний агоніст μ -опіюїдних рецепторів широкого спектру морфін, в концентрації 10 мкМ викликав пригнічення амплітуди Р-струму у 12% (n=5) клітин, у 29% (n=12) морфін не спричиняв ніякого впливу на

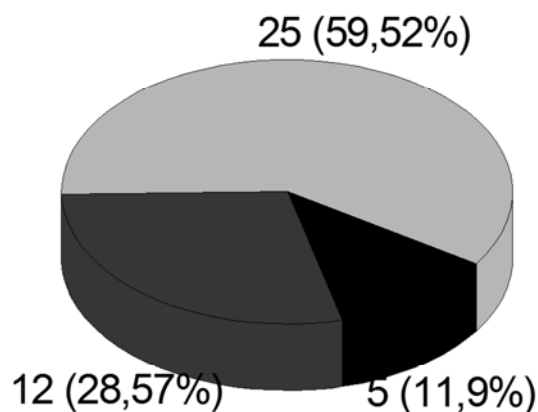


Рис. 3.4 - Діаграма розподілу чутливості Ca^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів до морфіну.

амплітуду Р-струму, а в 59% (n=25) спостерігалась потенціація амплітуди цього струму (Рис. 3.4). Збільшення амплітуди цього струму в присутності

морфіну становило 15 %, а пригнічення - 9% (Рис. 3.5). Ці дані вказують на те, що морфін впливає на кальцієві канали Р-типу різними шляхами, в залежності від типу активованих опіоїдних рецепторів. Так, наприклад, ефект пригнічення Р-струму морфіном, який ми спостерігали у відносно невеликій групі клітин, може бути опосередкованим взаємодією морфіну з κ-опіоїдними рецепторами плазматичної мембрани нейронів Пуркінє [186].

На Рис. 3.6 подані дані експерименту, в якому вивчався ефект потенціації амплітуди Р-струму. На Рис. 3.6А представлено часовий перебіг експерименту впливу 10 мкМ морфіну на Р-струм. Бар'єві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани

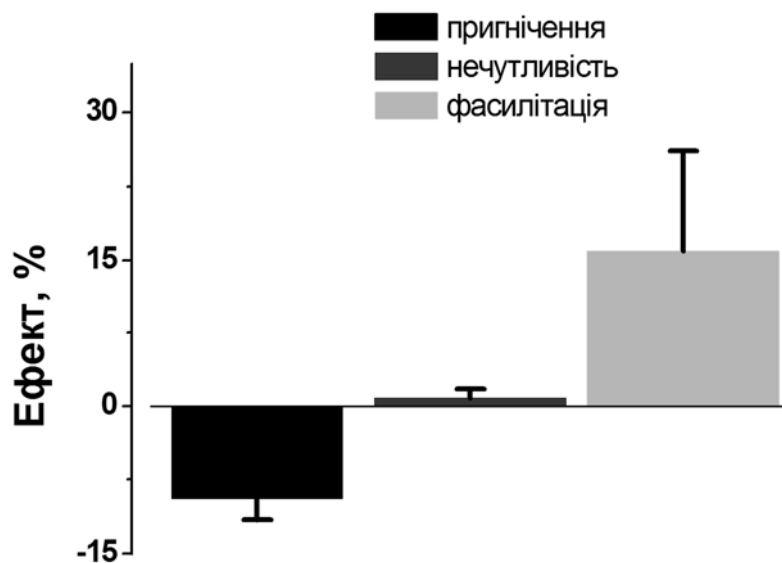


Рис. 3.5 - Статистичні дані впливу морфіну на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Як можна побачити з Рис. 3.6 зовнішньоклітинна аплікація морфіну у концентрації 10 мкМ призводила до швидкого (менше 10 сек.) збільшення

амплітуди відносно контрольного рівня. За відсутності морфіна у зовнішньоклітинному розчині відбувалось швидке повернення амплітуди до

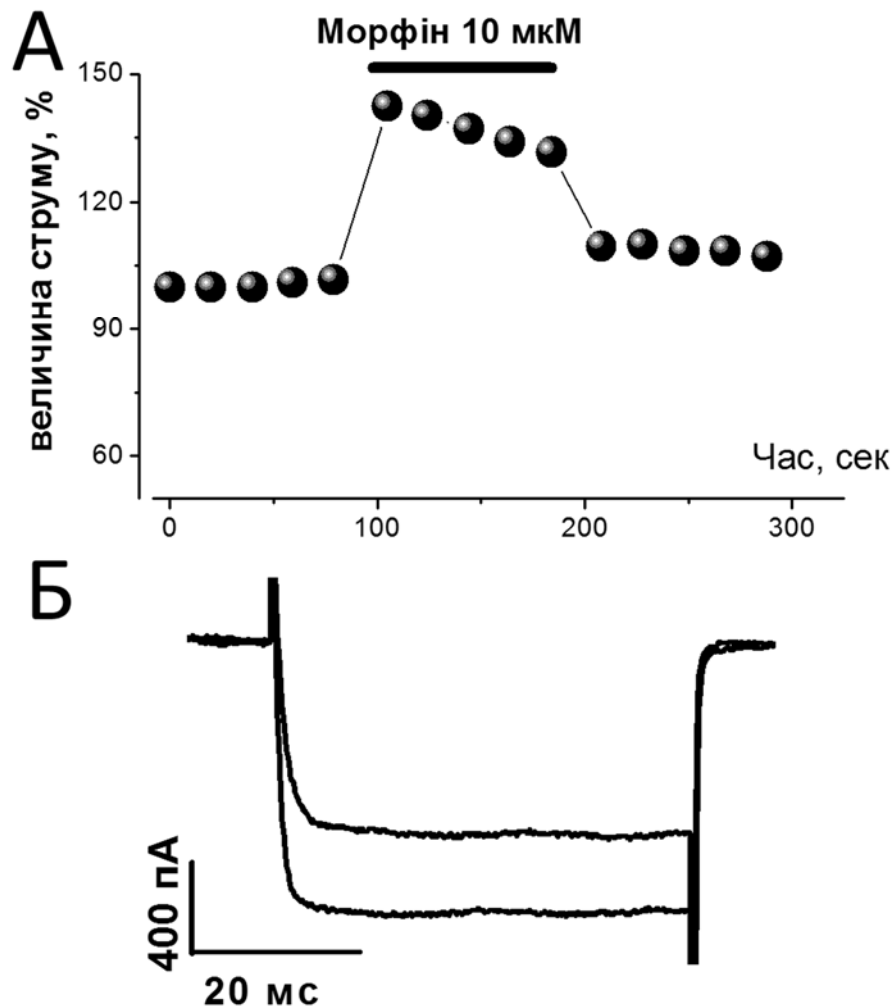


Рис. 3.6 - Модуляція морфіном Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

контрольного рівня.

Рис. 3.6Б відображає оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації морфіну.

Подальші наші дослідження були спрямовані на вивчення ефекту саме потенціації амплітуди Р-струму агоністами опіїдних рецепторів, оскільки цей ефект до сих пір ще не досліджений.

3.2.2. Вплив ендогенного агоністу МОР Ендоморфін-1 на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє мозочку щурів

Селективний ендогенний агоніст МОР Ендоморфін-1 у наномолярних

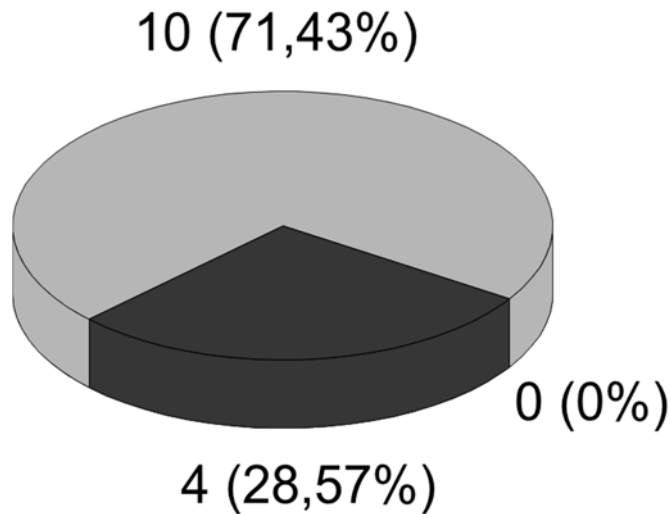


Рис. 3.7 - Діаграма розподілу чутливості Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів до Ендоморфін-1. концентраціях викликав збільшення амплітуди Р-струму у 71% нейронів ($n=10$), в той час як у 29% нейронів ($n=4$) ефект не спостерігався (Рис. 3.7). Ефект потенціації цього струму під дією Ендоморфін-1 для концентрацій 10 нМ та 100 нМ становив $8\pm 1\%$, ($n=6$, $p<0.01$) та $10\pm 1\%$ ($n=8$, $p<0.001$) відповідно Рис. 3.7). Часовий перебіг експерименту впливу 10 нМ та 100 нМ Ендоморфін-1 на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації ендоморфін-1. Бар'єві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на

максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту

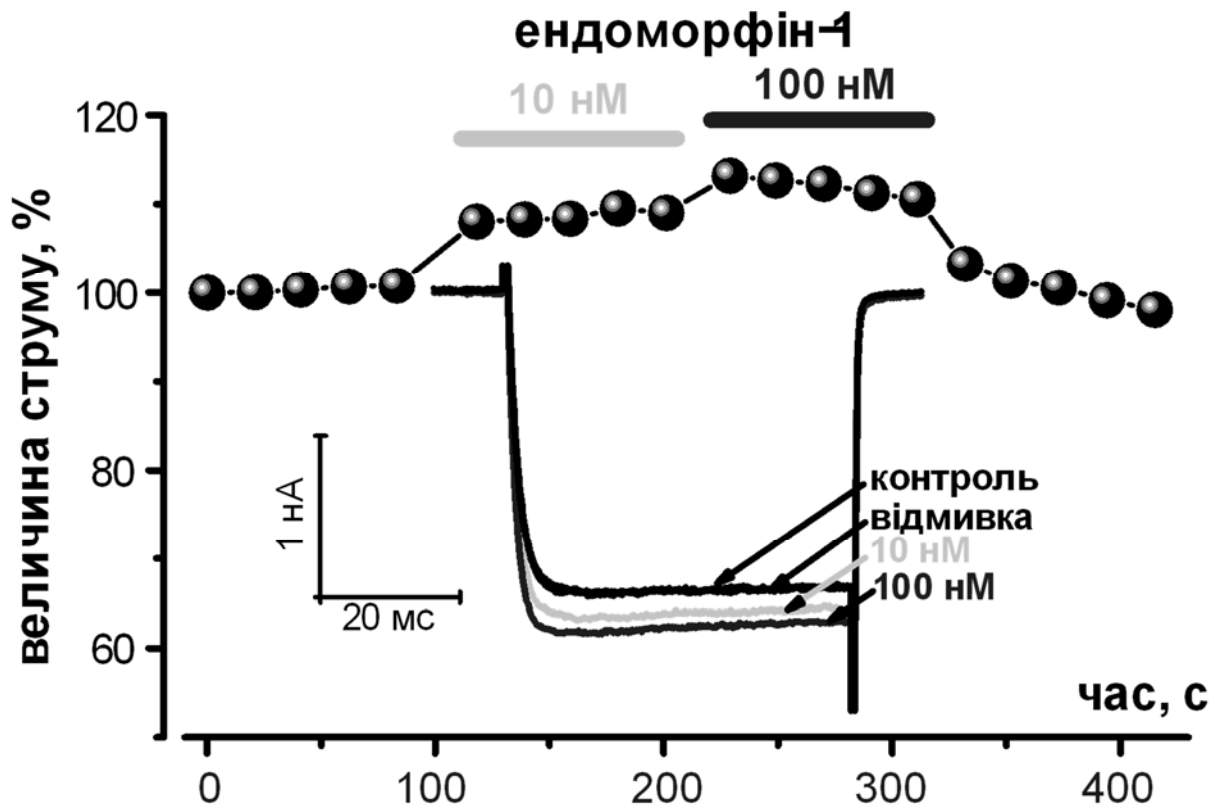


Рис. 3.8 - Модуляція ендоморфін-1 Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів.

нормувалися на амплітуду першого контрольного струму.

Як можна побачити з Рис. 3.8 зовнішньоклітинна аплікація ендоморфіну-1 у концентраціях 10 та 100 нМ призводила до швидкого

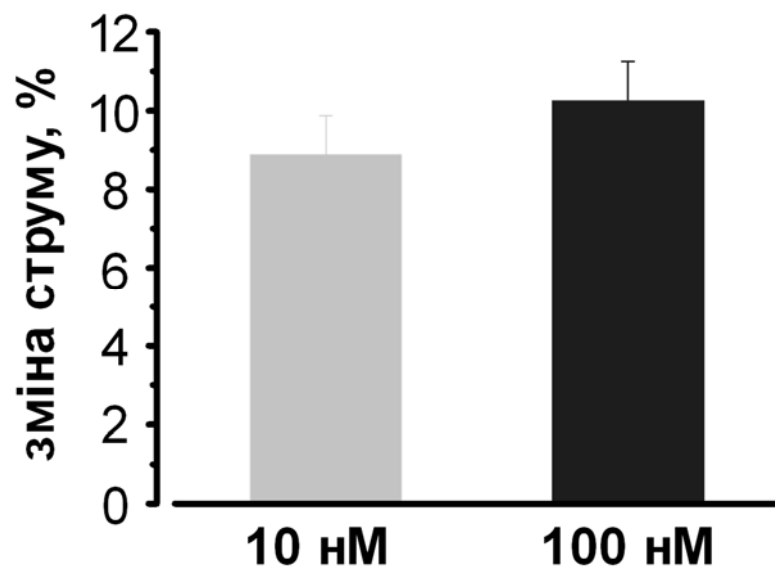


Рис. 3.9 - Статистичні дані впливу різних концентрацій ендоморфін-1 на амплітуду Р-струму. $P < 0,001$ – порівняно з контролем.

збільшення амплітуди відносно контрольного рівня. При усуненні агоністу з омиваючого розчину відбувається відновлення амплітуди струму до контрольного рівня. На Рис. 3.9 представлені середні значення збільшення амплітуд Р-струмів під дією ендоморфін-1 в концентраціях 10 нМ та 10 нМ, як видно з рисунку дія ендогенного опіюїду ендоморфін-1 була дуже подібною на ефекту викликаний 10 мкМ морфіну.

3.2.3. Вплив селективного агоністу MOR DAMGO на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє мозочку щурів

Наступна серія експериментів була проведена із застосуванням

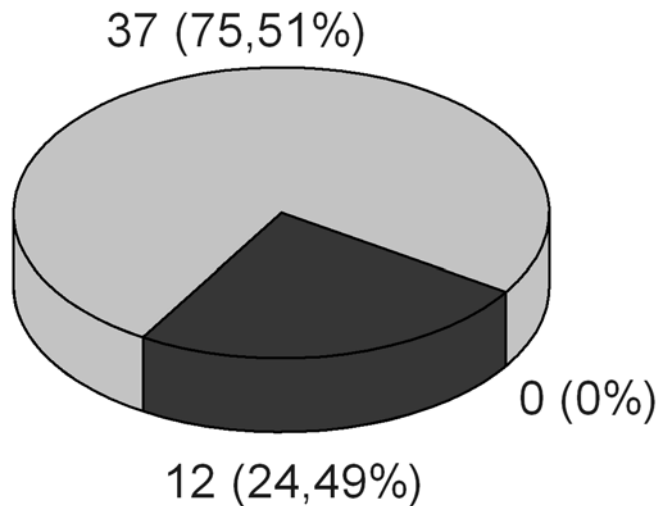


Рис. 3.10 - Діаграма розподілу чутливості Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів до DAMGO.

синтетичного селективного агоніста μ -опіюїдних рецепторів DAMGO. Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO в концентраціях від 1 нМ до 1000 нМ викликала статистично достовірне збільшення амплітуди Р-струму в 76% нейронів ($n=37$), в той час як в 24% нейронів ($n=12$) речовина не викликала ефекту в жодній концентрації (Рис. 3.10).

На Рис. 3.11А представлено часовий перебіг експерименту впливу 1 нМ, 10 нМ та 100 нМ DAMGO на Р-струм. Барієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на

максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму, Рис. 3.11Б - оригінальні записи струмів в контролі та після прикладання різних концентрацій DAMGO. Ефект був швидким (розвивався швидше ніж 10 с) та повністю зворотнім при усуненні агоністу із зовнішньоклітинного розчину.

Ці дані вказують на те, що ефект потенціації Р-струму залежить від концентрації агоністу. Ефект потенціації амплітуди Р-струму який спостерігався при прикладанні DAMGO становив: в концентрації 1 нМ - $6\pm 1\%$ ($n=10$, $p<0.001$), 10 нМ - $10\pm 1\%$ ($n=27$, $p<0.001$), і виходить на насичення в концентрації 100 нМ - $12\pm 1\%$ ($n=12$, $p<0.001$). Прикладання 1000 нМ DAMGO збільшує амплітуду струму на $11\pm 1\%$, ($n=4$, $p<0.001$) (Рис.

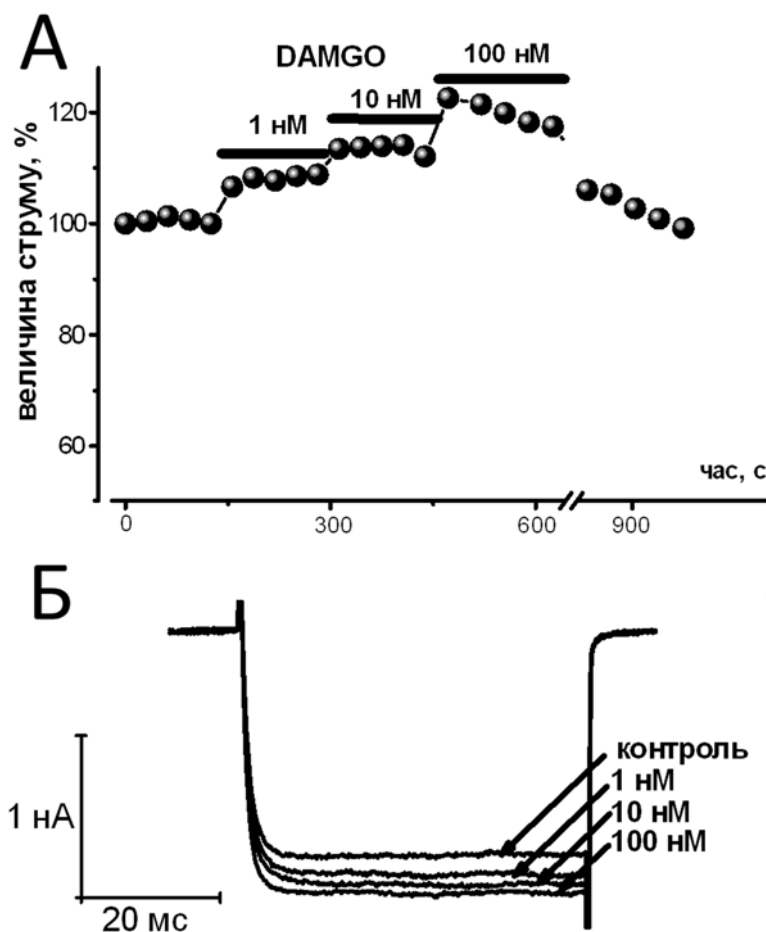


Рис. 3.11 - Вплив DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

3.12). $EC_{50}=1.3\pm0.4$ нмоль/л. Згідно до результатів цих дослідів можна підсумувати, що напівмаксимальна ефективна концентрація (EC_{50}) ліганду знаходиться в межах від 1 до 10 нмоль/л. Це значення EC_{50} близьке до значень, що були отримані Мінами та співавторами (0.87 нМ) і Райнором та співавторами (2 нМ) в експериментах по вивченню зв'язування DAMGO з μ -опіоїдними рецепторами [187, 188].

Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що DAMGO модулює кальцієві канали з ефективністю співставною з афінністю класичного опіоїдного рецептора. Тому для подальшого дослідження дії опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високотргових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, а

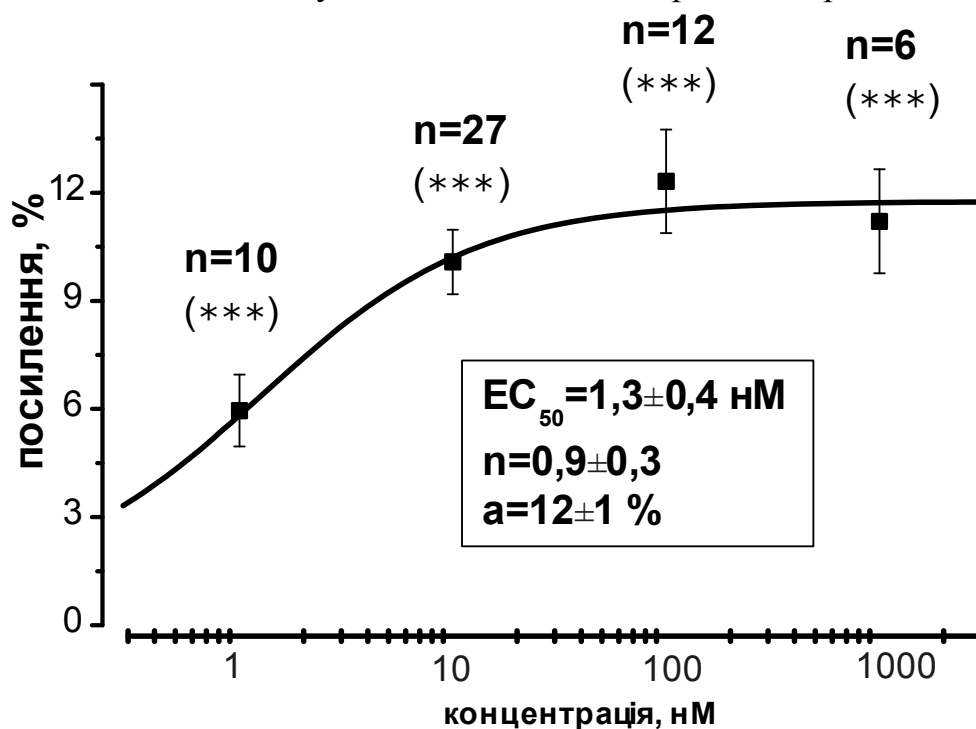


Рис. 3.12 - Крива концентраційної залежності впливу DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

також визначення можливих механізмів, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми, ми використовували селективний агоніст MOR DAMGO в концентрації 10 нМ.

3.2.4. Повторне прикладання DAMGO на Р-струм.

В цій серії експериментів ми намагались визначити чи відбувається десенситизація високоафінного центра зв'язування с агоністами МОР. Добре відомо, що фосфорилування опіоїдних рецепторів певним видом кіназ, наприклад, G-білок зв'язана рецепторна кіназа (GPK) призводить до десенситизації рецептора і його подальшої інтерналізації. Цей процес відбувається навіть в тому випадку якщо агоніст був прикладений на короткий час. Після інтерналізації, рецептор знову може стати

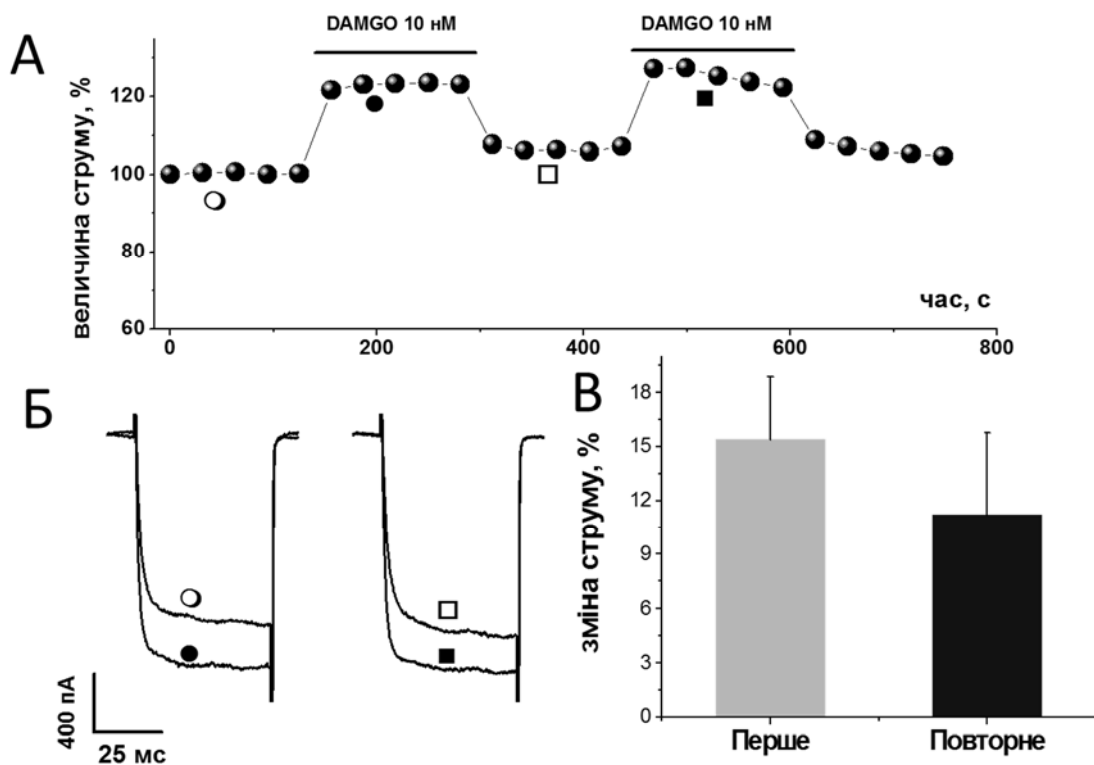


Рис. 3.13 - Відсутність десенситизації рецептора та його подальшої інтерналізації.

функціонально активним і повернутися на мембрану (цей процес називається ресенситизацією). При аплікації агоніста на тривалий час також може відбуватися фосфорилування рецептора і його подальша десенситизація, проте в цьому випадку фосфорилування здійснюється іншими протеїн кіназами: такими як протеїн кіназа А (ПКА) та протеїн кіназа С (ПКЦ), а наступна інтерналізація рецептора відбуватися значно повільніше [189].

Як видно з Рис. 3.13 прикладання 10 нМ агоністу викликало збільшення амплітуди струму. При відмиванні агоністу амплітуда струму знову поверталася до контролю. Подальша аплікація агоністу в тій же концентрації призводила до того ж ефекту ($9 \pm 3\%$, $n=6$, $p<0.05$), так само як при прикладанні агоніста на тривалий час (Рис. 3.13).

На Рис. 3.13А представлено часовий перебіг двох поступових аплікацій 10 нМ DAMGO на амплітуду на Р-струму. Барієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликались деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Рис. 3.13Б містить оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі (○) та після першої аплікації 10 нМ DAMGO (●), □ - контрольний розчин (відмивка від агоністу), ■- повторне прикладання DAMGO (10 нМ).; В - Статистичний аналіз даних впливу повторного прикладання DAMGO на амплітуду Р-струму представлено на Рис. 3.13В ($P<0,01$ – порівняно з контролем).

Виходячи з вищенаведеного, результати експериментів вказують, що ніякої десенситизації та інтерналізації рецептора не спостерігається.

3.2.5. Тривале прикладання високих концентрацій DAMGO

Ефект потенціації Р-струму DAMGO залежить від концентрації агоніста, а не від тривалості прикладання. Після прикладання 10 нМ речовини протягом 5 хвилин, ефект не змінювався та легко був усунений при поверненні до контрольного розчину.

Проте, підвищення конентрації агоніста в 100 разів призводило до виникнення залежності від тривалості прикладання. На Рис. 3.14 показано тривале прикладання DAMGO в концентрації 1000 нМ. Як видно, DAMGO в цій концентрації крім ефекта потенціації, також з часом викликає повільне зменшення амплітуди Р-струму.

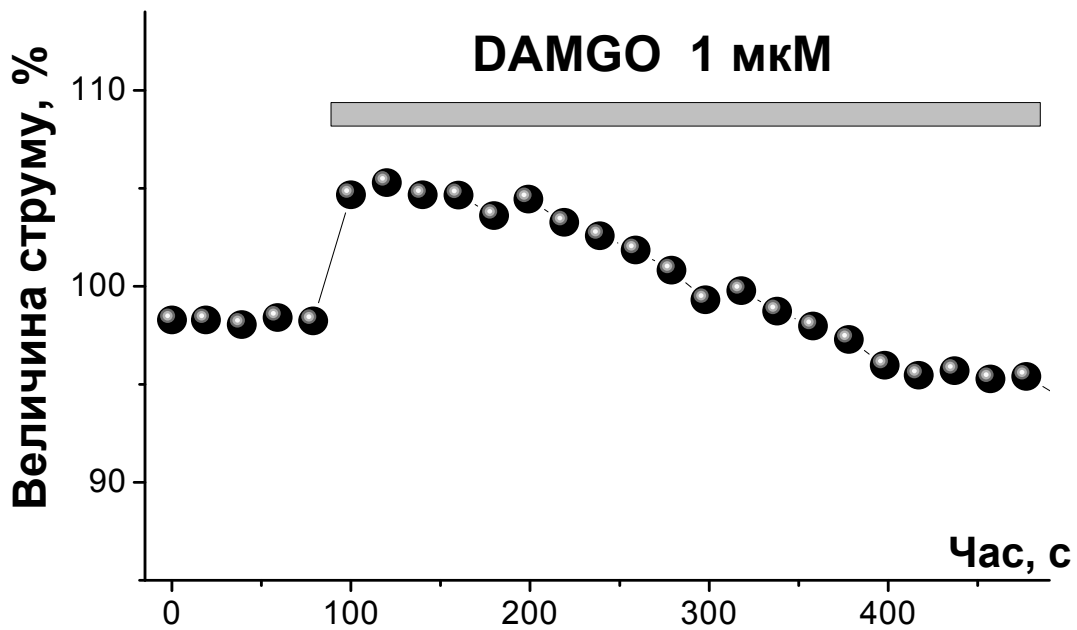


Рис. 3.14 - Модуляція DAMGO Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку шурів. Тривале прикладання агоністу.

3.2.6. Потенціалзалежність ефекту DAMGO

Далі нами було досліджено залежність ефекту потенціації Р-струму DAMGO від мембранного потенціалу нейрону. На Рис. 3.15 представлено оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. Записи струмів були зроблені з інтервалом у 5 с при зміщенні мембранного потенціалу до рівня, вказаного біля кожного запису. На Рис. 3.16 представлено ВАХ побудовані по записах Р-струмів наведених на Рис. 3.15.

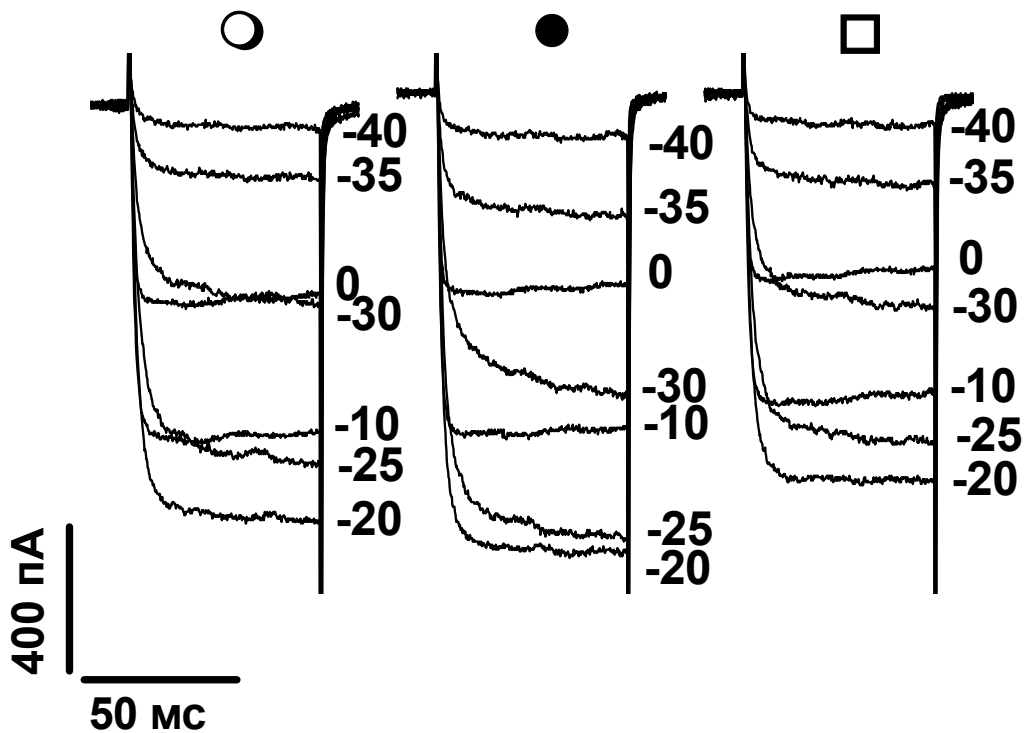


Рис. 3.15- Вплив аплікації 10 нМ DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів при різних потенціалах.

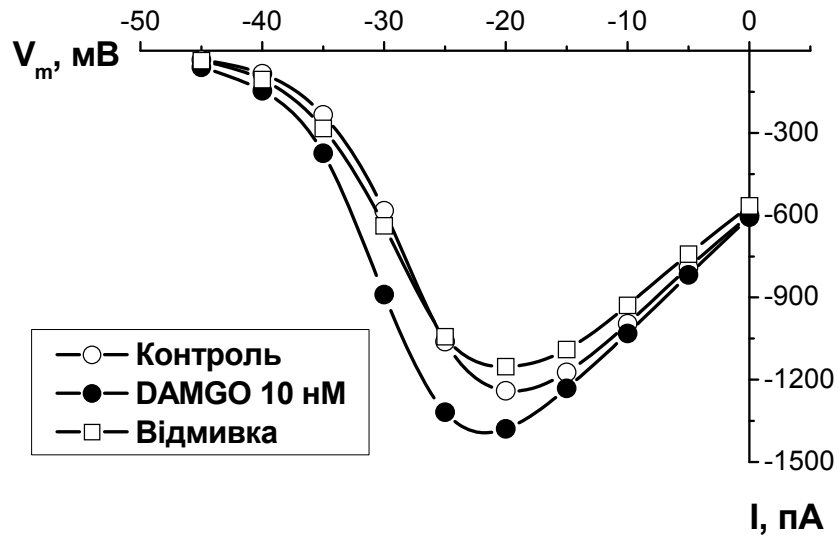


Рис. 3.16 – ВАХ Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу під впливом 10 нМ DAMGO.

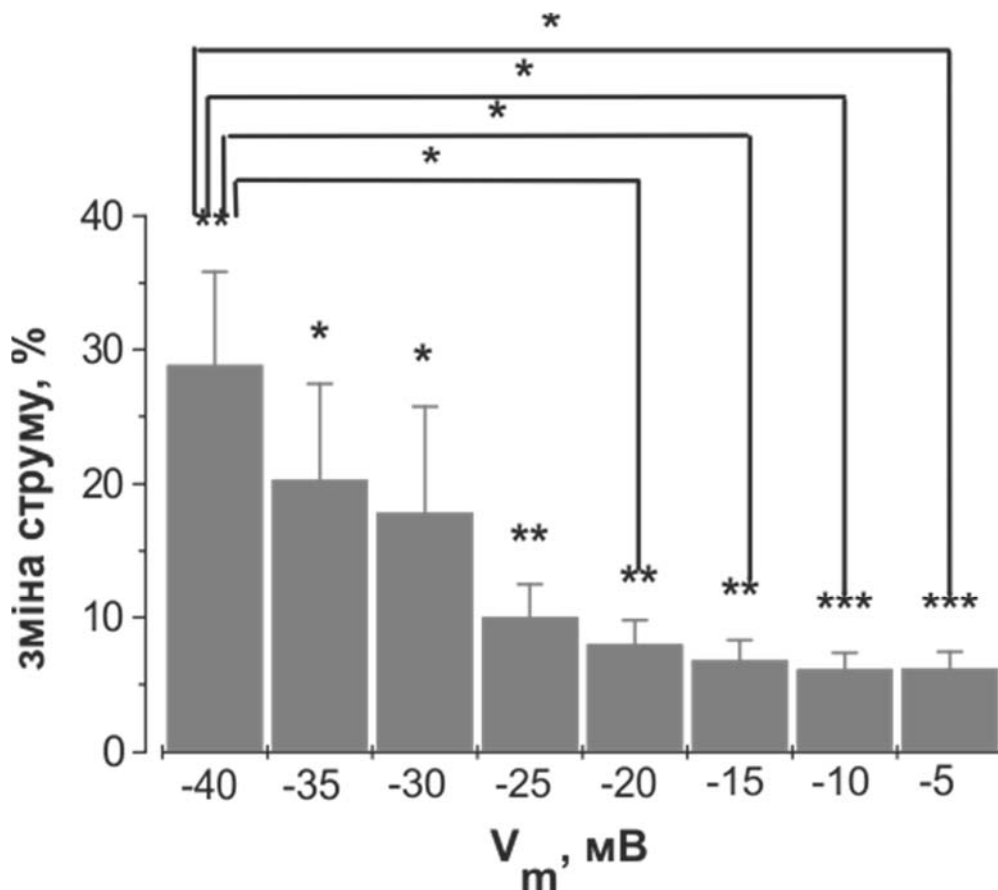


Рис. 3.17- Зведені дані, що показують потенціалзалежність ефекту DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

В попередньо проведених експериментах показано, що модуляція Р-

струму DAMGO проявляється в широкому діапазоні потенціалів. Як показано на Рис. 3.17 ефект був особливо виражений ліворуч від піку кривої ВАХ. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) виявив, що криві ВАХ суттєво відрізняються в межах -40 мВ ($29 \pm 7\%$), до -20 мВ ($8 \pm 2\%$).

3.3. Вплив іонів Ca^{2+} на модуляцію DAMGO кальцієвого Р-струму

Серед внутрішньоклітинних агентів, які можуть змінювати активність кальцієвих каналів, перш за все потрібно виділити самі іони Ca^{2+} , котрі здатні як безпосередньо впливати на мембранні канали, так і активувати різні кальцій-залежні білки. Для з'ясування ролі іонів кальцію у модуляції

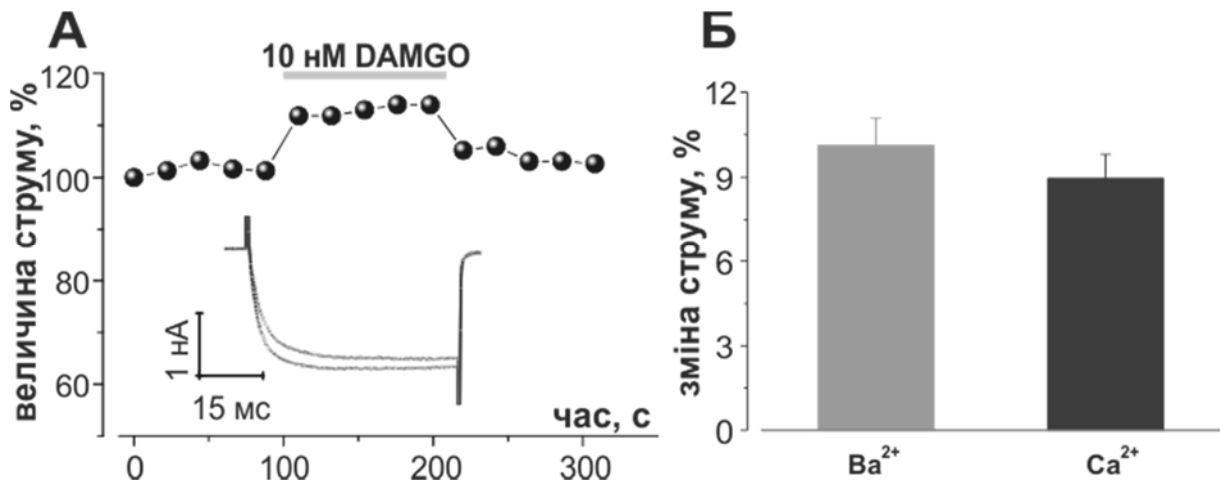


Рис. 3.18- Модуляція DAMGO струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів не залежить від проникаючого катіону.

кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR ми провели серію експериментів в яких було досліджено ефект DAMGO в залежності від типу проникаючого катіону. Як показано на Рис. 3.18 зовнішньоклітинна аплікація DAMGO, селективного агоніста MOR, в концентрації 10 нМ спричиняла таке ж саме швидке (менш ніж за 10 с) збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 0.7\%$, $n=7$, $p<0.001$), як і в наших попередніх експериментах, у яких основним проникаючим катіоном були іони Ba^{2+} ($10 \pm 1\%$, $n=27$, $p<0.001$).

На Рис. 3.18А представлено часовий перебіг експерименту впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Статистичний

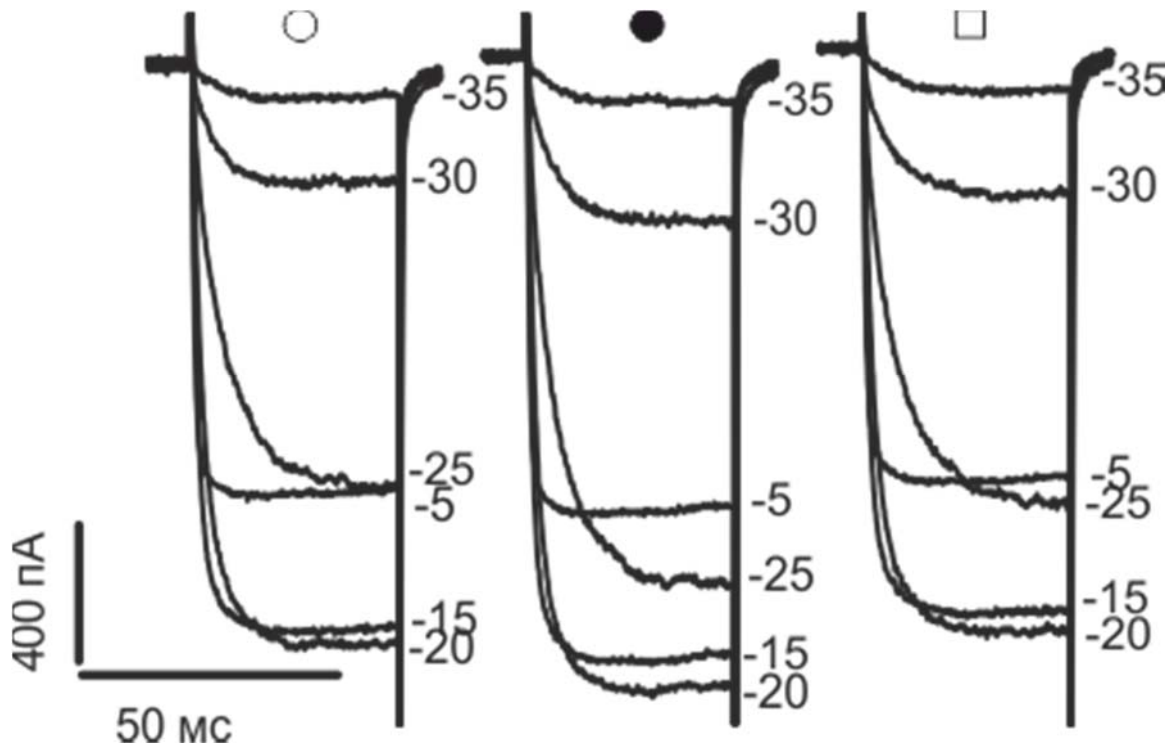


Рис. 3.19 - Вплив аплікації 10 нМ DAMGO на Ca^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів при різних потенціалах.

аналіз даних впливу 10 нМ DAMGO на амплітуду Р-струму при різних проникаючих катіонах.повторного прикладання DAMGO на амплітуду Р-струму представлено на Рис. 3.18Б ($P < 0,001$ – порівняно з контролем).

Ефект DAMGO був потенціалзалежним так само як у випадку коли внутрішньоклітинний розчин містив іони Ba^{2+} (Рис. 3.19). DAMGO також не

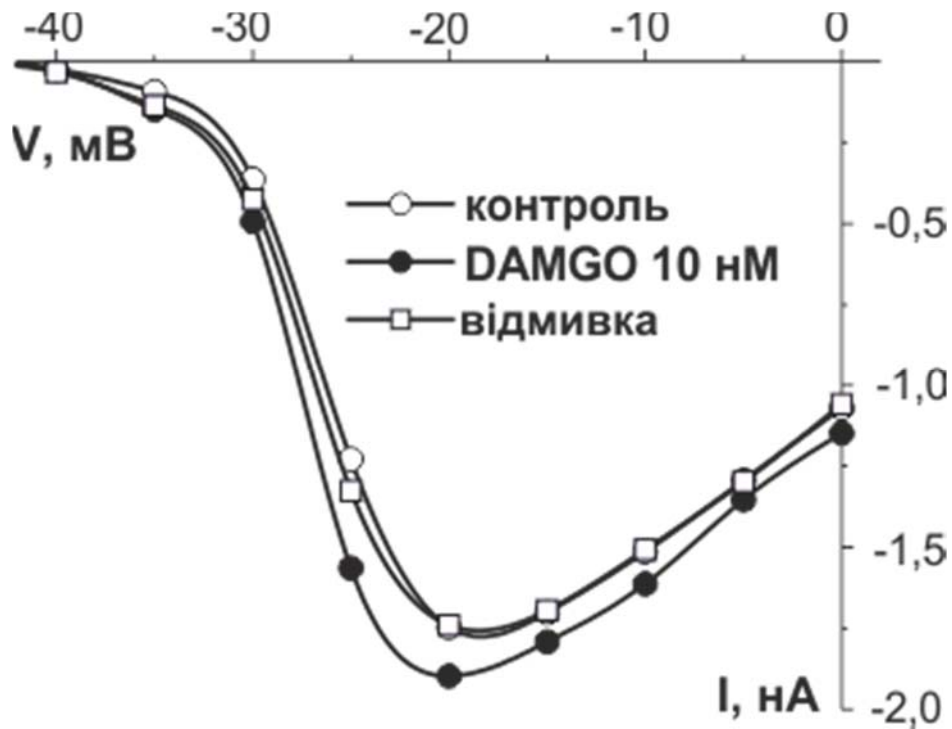


Рис. 3.20 – ВАХ Ca^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу під впливом 10 нМ DAMGO.

впливав на кінетику активації та інактивації Р-струму, його ВАХ (Рис. 3.20) і його ефект був повністю зворотнім після відмивання від агоністу.

3.4. Антагоністи опіоїдних рецепторів.

3.4.1. Вплив налоксону модуляцію DAMGO Р-струму

Щоб виявити можливе залучення класичних опіоїдних рецепторів до модуляції Р-струму агоністами опіоїдних рецепторів, ми проводили досліди в присутності більш широко використовуваного антагоніста опіоїдів, налоксону. Прикладання налоксону в концентрації 100 нмоль/л також приводило до потенціації Р-струму ($5 \pm 1\%$, $n=4$, $p<0.05$).

На Рис. 3.21 показаний експеримент в якому одразу після аплікації 100 нМ налоксону відбувається швидке збільшення на $5 \pm 1\%$ ($n=5$, $p<0.01$) у 62.5% нейронів амплітуді Р-струму, а потім наступне повільне зменшення амплітуди цього струму, в 37.5% нейронів ($n=3$) жодного ефекту не

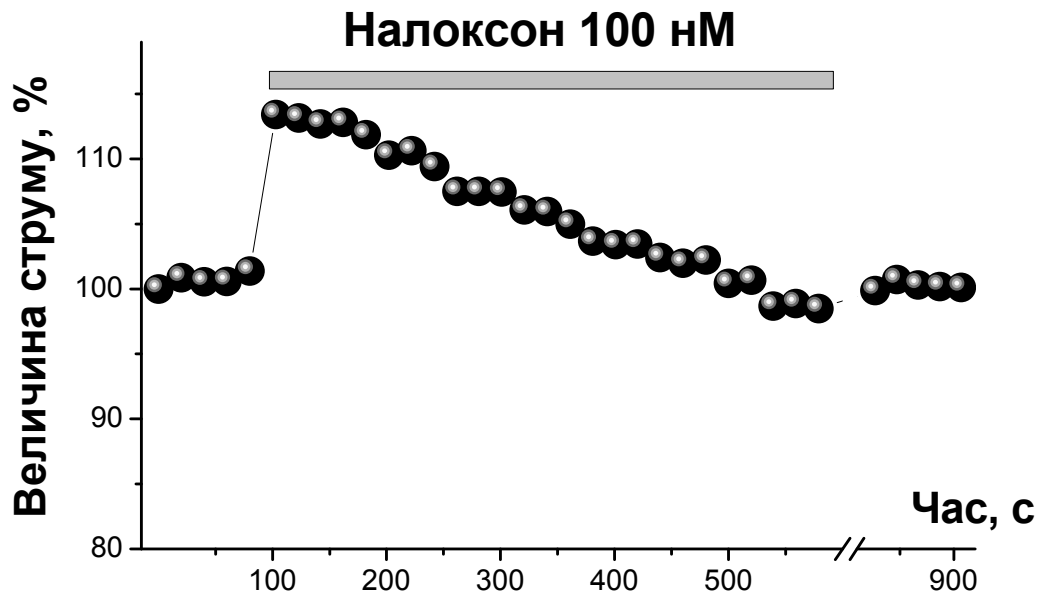


Рис. 3.21- Вплив аплікації 100 нМ налоксону на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів.

спостерігалось. Таке повільне пригнічення амплітуди Р-струму, очевидно, пов'язане з активацією налоксоном окрім механізму, що відповідає за збільшення амплітуди Р-струму, інших додаткових механізмів регуляції активності Р-каналів.

В наступній серії експериментів клітини, в яких спостерігався ефект потенціації Р-струму в присутності 10 нМ DAMGO ($10 \pm 2.5\%$, $n=5$, $p<0.05$), були проінкубовані в розчині, що містив 100 нМ налоксону. На Рис. 3.22 представлений часовий хід впливу 100 нМ налоксону на збільшення амплітуди Р-струму під дією DAMGO 10 нМ та оригінальні записи реєстрацій струмів. Струми викликались деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мВ тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Записи струмів : ○-контрольний розчин, ●-аплікація DAMGO (10 нМ), □-аплікація налоксону (100 нМ), ■-прикладання DAMGO (10 нМ) на фоні налоксону (100 нМ), ♦-відмивання

від налоксону, ▼-прикладання DAMGO (10 нМ). Як видно з Рис. 3.22, при

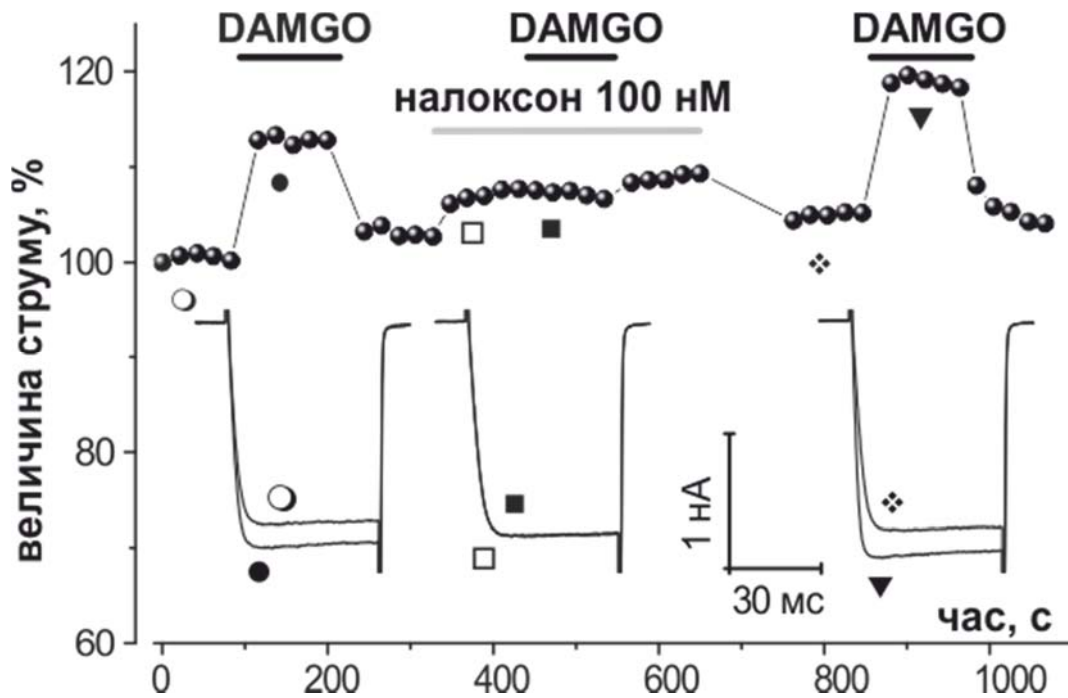


Рис. 3.22 - Усунення налоксоном потенціюючого ефекту DAMGO на Ca^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

подальшій аплікації 10 нМ DAMGO на фоні 100 нМ налоксону ($4.9 \pm 0.5\%$,

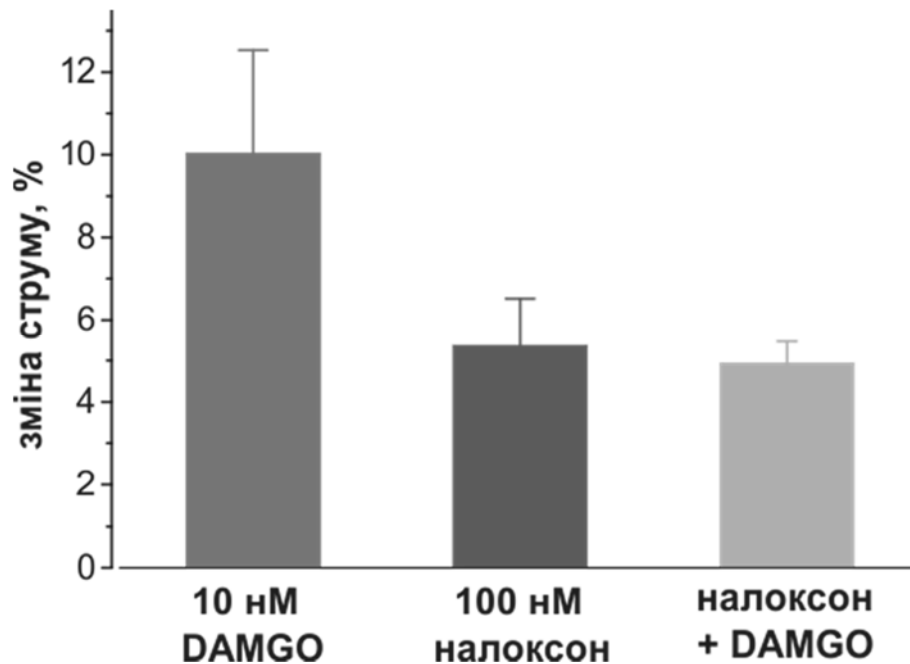


Рис. 3.23 - Сукупні дані впливу прикладання DAMGO на амплітуду Р-струму на тлі налоксону.

$n=5$, $p<0.001$) не було виявлено жодного додаткового ефекту в порівнянні з попереднім ефектом власне налоксону $5\pm1\%$ ($n=5$, $p<0.01$, Рис. 3.23).

3.4.2. Вплив СТОР модуляцію DAMGO кальцієвого Р-струму

Відомо, що налоксон може взаємодіяти з усіма опіоїдними рецепторами [187]. Щоб виявити який з типів опіоїдних рецепторів залучений до модуляції даного струму, ми використали могутній і надзвичайно селективний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів СТОР.

Як показано на Рис. 3.24 СТОР безпосередньо не впливав на Р-струм ($0.9\pm1.2\%$, $n=6$, $p>0.4$).

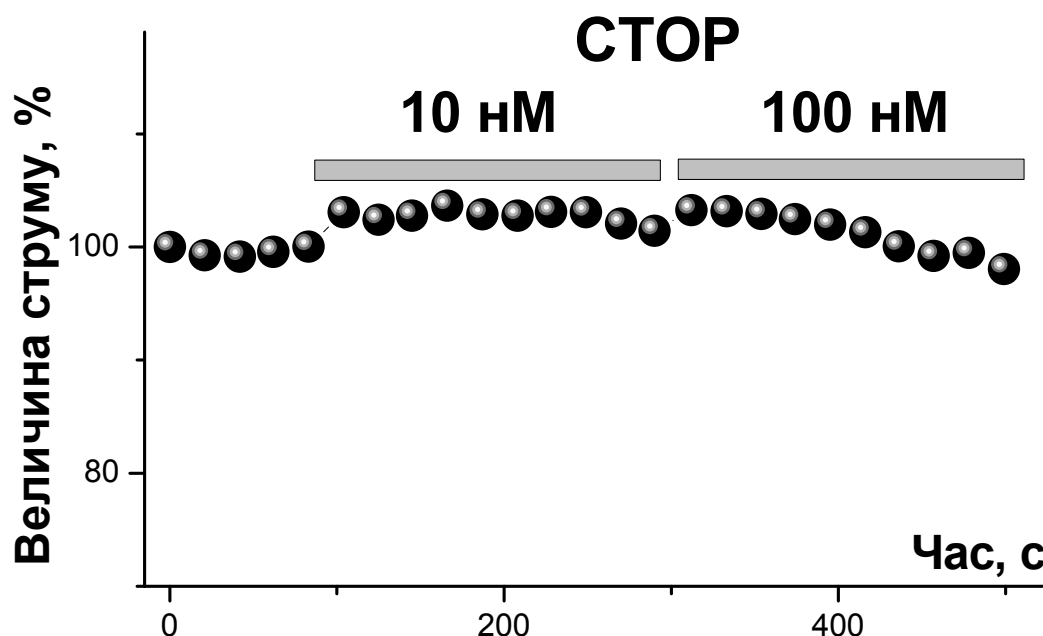


Рис. 3.24 – Аплікація 100 нМ СТОР не впливає на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

На Рис. 3.25 показано часовий хід дії СТОР 100 нМ на збільшення амплітуди Р-струму під дією DAMGO 10 нМ та оригінальні записи реєстрацій струмів. Струми викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мВ тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду

першого контрольного струму. Записи струмів : ○-контрольний розчин, ●-

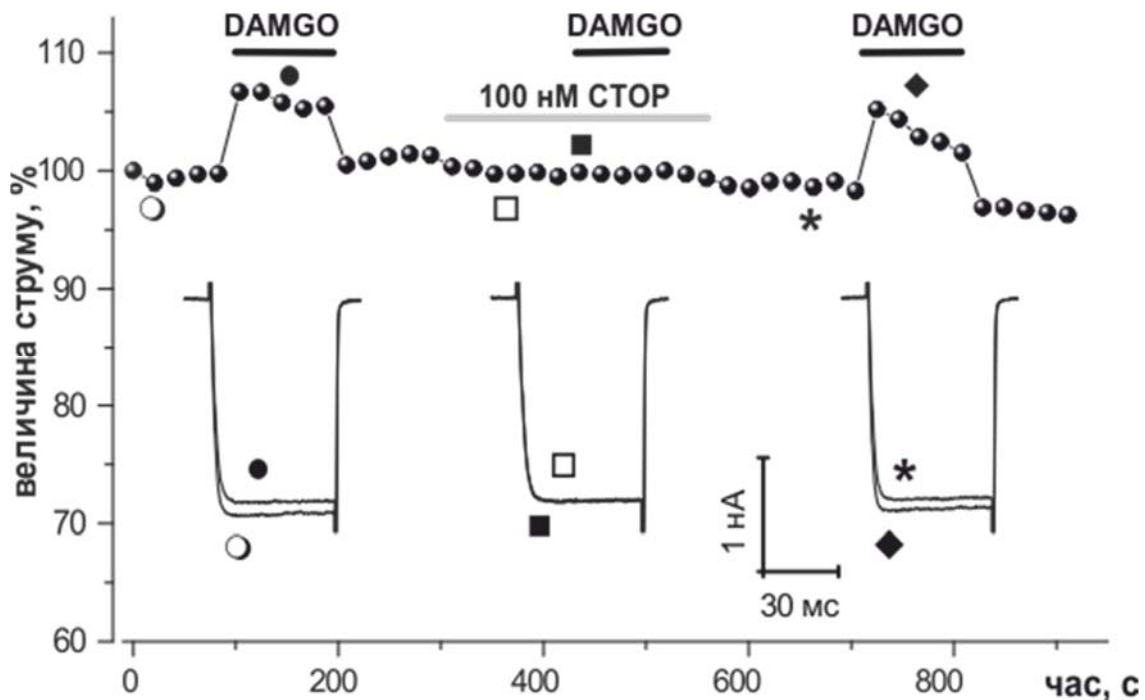


Рис. 3.25 - Усунення СТОР потенціюючого ефекту DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів.

аплікація DAMGO (10 нМ), □-аплікація СТОР (100 нМ), ■-прикладання DAMGO (10 нМ) на фоні СТОР (100 нМ), ♦-відмивання від СТОР, ▼-

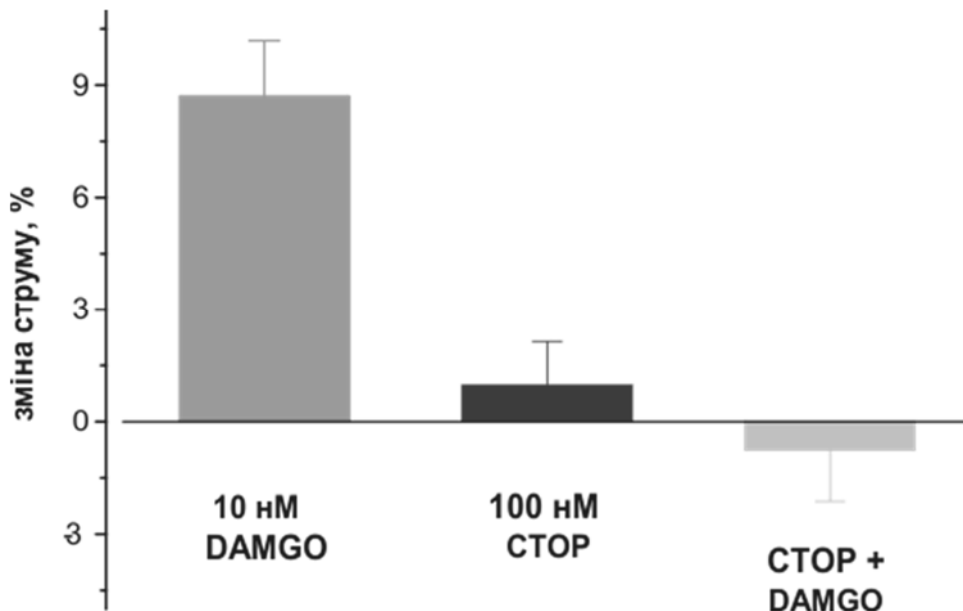


Рис. 3.26 - Сукупні дані впливу прикладання DAMGO на амплітуду Р-струму на тлі налоксону.

прикладання DAMGO (10 нМ); Прикладання 10 нМ DAMGO в присутності 100 нМ СТОР (Рис. 3.26) не викликало зростання амплітуди Р-струму

($0.8 \pm 1.4\%$, $n=6$, $p>0.84$) в порівнянні з контрольним прикладанням 10 нМ DAMGO $9 \pm 1.5\%$ ($n=6$, $p<0.01$).

3.5. Вплив кальмодуліна на модуляцію Р-каналів агоністами MOR

Як відомо, кальмодулін (CaM) є одним з внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів [190, 191]. Він забезпечує Ca^{2+} -залежну регуляцію багаточисельних внутрішньоклітинних ферментів та може змінювати активність кальцієвих каналів. Для встановлення можливої участі в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR рецепторів, нами було проведено серію дослідів з використанням антагоністу кальмодулін-регульованих ензимів кальмідазолу (CMZ).

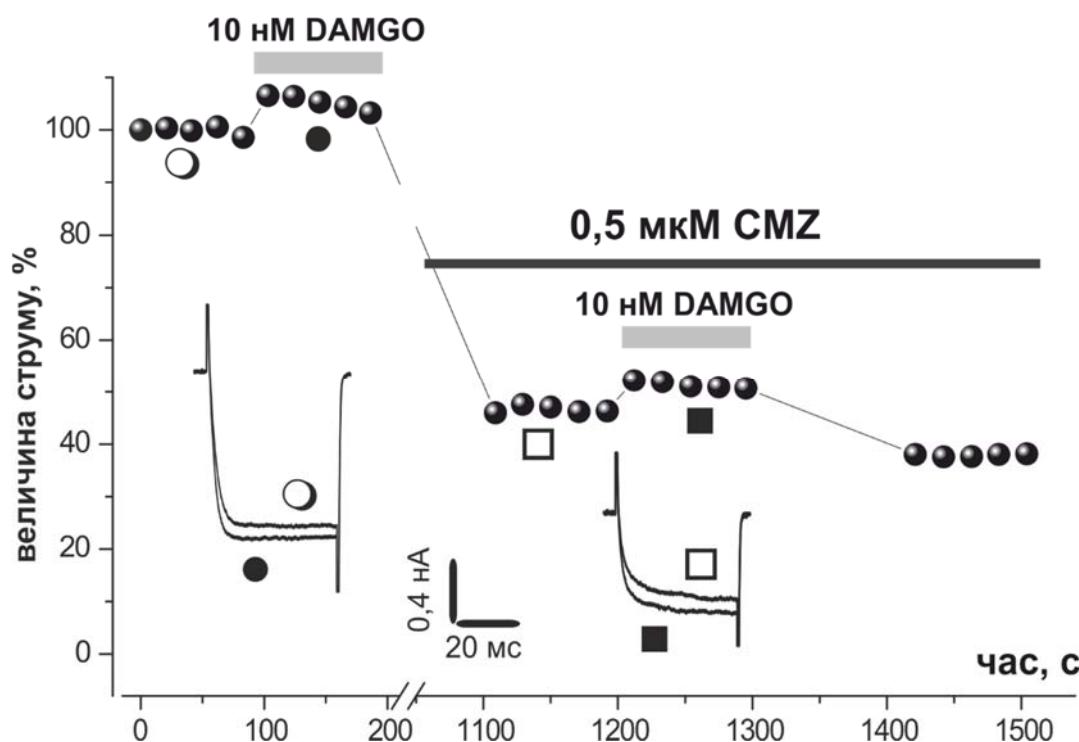


Рис. 3.27 - Кальмідазол викликає пригнічення амплітуди Ca^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу та частково усуває потенціацію струму, спричинену 10 нМ DAMGO.

Відповідно до наших попередніх даних [192] зовнішньоклітинна аплікація CMZ у концентрації 0,5 мкМ викликала часткове пригнічення амплітуди кальцієвого струму Р-типу. Збільшення концентрації CMZ до 1 мкМ призводило до практично повного пригнічення струму протягом декількох хвилин.

У цій серії експериментів нами досліджувався можливий вплив CMZ на ефект посилення струму під дією 10 нМ DAMGO. На Рис. 3.27 представлені часовий хід дії кальмідазолу 500 нМ на збільшення амплітуди Р-струму під дією DAMGO 10 нМ та оригінальні записи реєстрацій струмів.

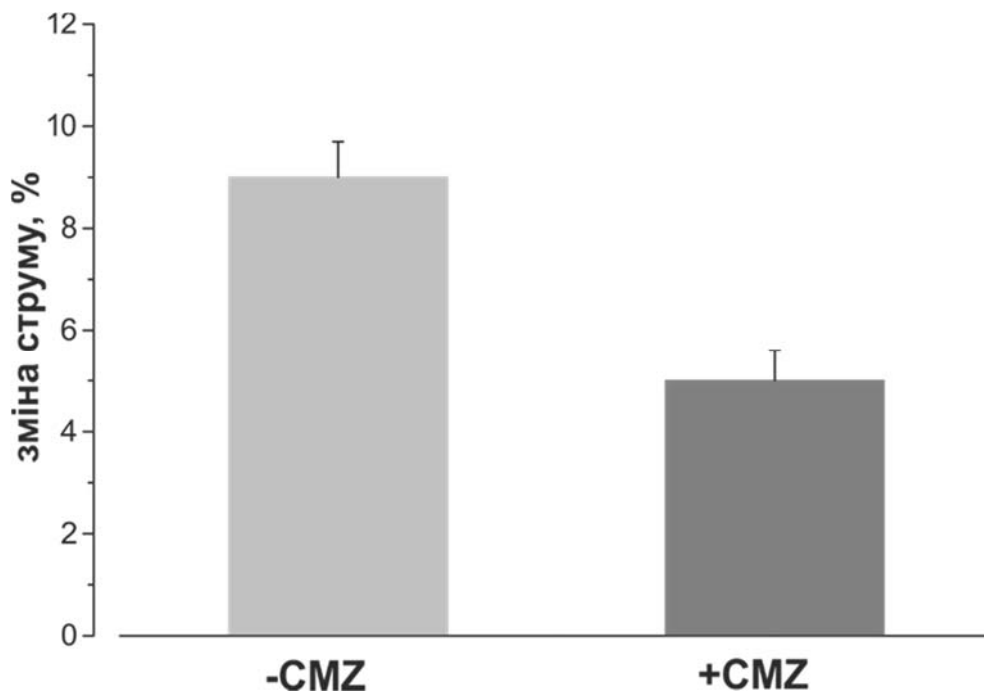


Рис. 3.28 Сукупні дані впливу прикладання DAMGO на амплітуду Р-струму на тлі CMZ.

Записи струмів : ○-контрольний розчин, ●- аплікація DAMGO (10 нМ), □- аплікація кальмідазолу (500 нМ), ■-прикладання DAMGO (10 нМ) на тлі кальмідазолу (500 нМ).

У контрольних умовах, аплікація DAMGO призводила до збільшення струму на $9 \pm 0.7\%$ ($n=7$, $p<0.001$), після усунення DAMGO з зовнішньоклітинного розчину, досліджуваний нейрон інкубували протягом 10 хвилин у зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 мкМ CMZ, що призводило до двократного зменшення амплітуди струму у порівнянні з

контрольними значеннями. Подальше прикладання DAMGO на тлі CMZ спричиняло статистично достовірне збільшення амплітуди струму на $5 \pm 0,6\%$ ($n=5$, $p<0,05$) (Рис. 3.28). Таким чином, CMZ суттєво зменшував величину досліджуваного ефекту, проте на відміну від модуляції, що викликана гіперфорином [192], повністю її не усував.

3.6. Вплив вторинних посередників на ефект DAMGO.

Відомо, опіоїди регулюють діяльність різних видів протеїнкіназ, як наприклад, протеїнкіназу C (ПКЦ), цАМФ-залежну протеїнкіназу A (ПКА), кальцій/кальмодулінзалежну протеїнкіназу II (CaMKII), протеїнкіназу G (PKG), а також циклічну АМФ [193, 194]. Активація цих кіназ може підсилити активність кальцієвих каналів Р-типу.

3.6.1. Модуляція Р-каналів агоністами MOR не чутлива до внутрішньоклітинного цАМФ.

цАМФ є вторинним посередником, який приймає участь у внутрішньоклітинної передачі сигналу та необхідний для реалізації дії багатьох гідрофільних гормонів, таких як глюкагон і адреналін, які не можуть проходити через плазматичну мембрану, нейромедіаторів та інших первинних посередників. Він також бере участь в активації протеїнкіназ. Крім того, цАМФ зв'язується і регулює функцію іонних каналів [195]. Тому в наступних експериментах присвячених дослідженню можливої участі цАМФ у модуляції Р-струму 10 нМ DAMGO, ми використовували у внутрішньоклітинному розчині цАМФ у концентрації 500 мкМ [196].

На Рис. 3.29А представлено часовий перебіг впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт

тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Записи струмів: ○ - контрольний розчин, ● - прикладання 10 нМ DAMGO в умовах внутрішньоклітинної перфузії клітини 500 мкМ цАМФ.

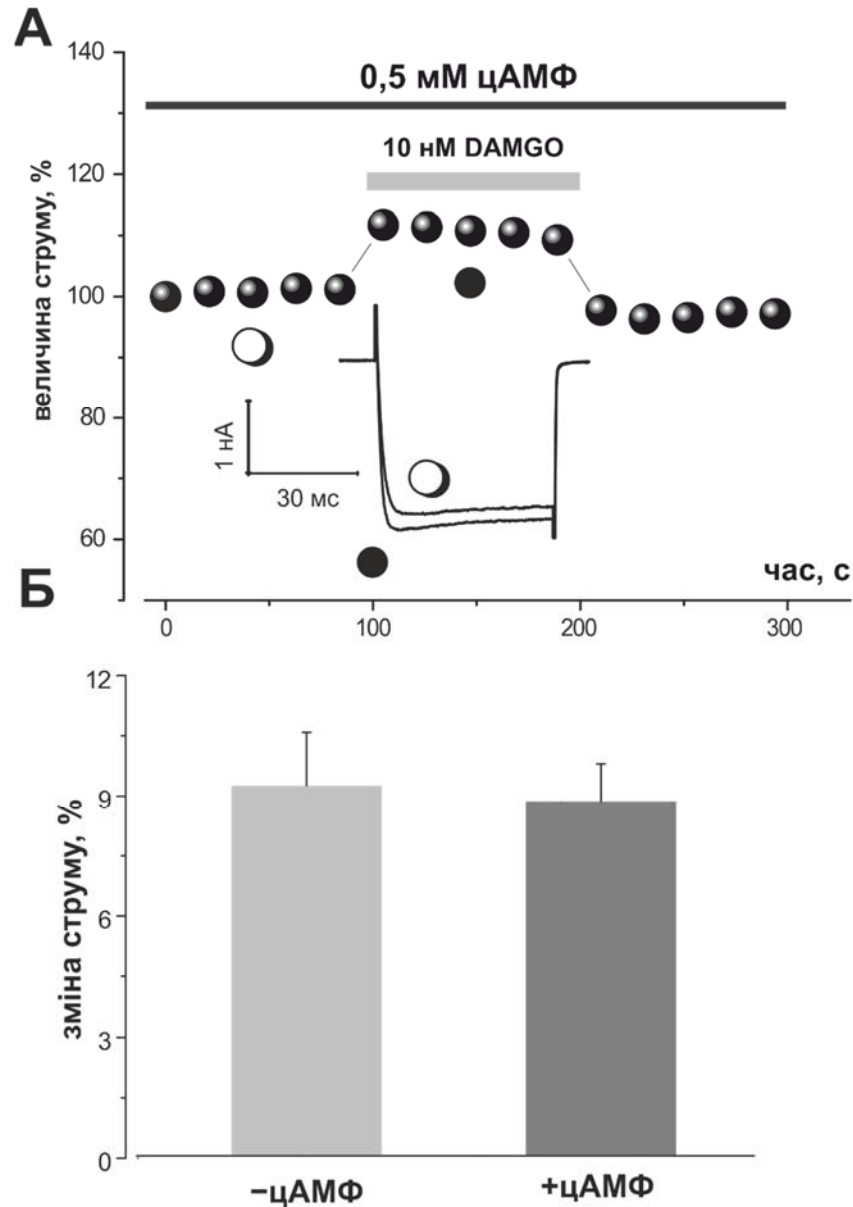


Рис. 3.29 - цАМФ не впливає на ефект 10 нМ DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

Через 20 хв після початку перфузії нейрона Пуркінє внутрішньоклітинним розчином, що містить 500 мкМ цАМФ, аплікація 10 нМ DAMGO викликала збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 1.2\%$, $n=8$,

$p < 0.001$). Видалення DAMGO з позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди Р-струму.

Проте, як показано на Рис. 3.29Б присутність цАМФ у внутрішньоклітинному розчині не впливала на модуляцію струму, спричинену агоністом MOR DAMGO ($9 \pm 0,9\%$, $n=6$, $p < 0.01$).

Ці результати вказують, що викликана DAMGO потенція Р-струму не є опосередкованою цАМФ-залежними механізмами.

3.6.2. Модуляція Р-каналів агоністами MOR відбувається без участі ПКА та ПКЦ.

Активація ПКА [193] або ПКЦ [194] може підсилити активність кальцієвих каналів Р-типу. Для того, щоб визначити чи були залучені ПКА або ПКЦ в модуляцію Р-струму DAMGO, був використаний неспецифічний блокатор обох кіназ, H7. На Рис. 3.30А представлено часовий перебіг впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму.

Внутрішньоклітинна перфузія клітини з H7 (10 мкМ) [197] протягом 20 хв. не усувала ефект DAMGO на Р-струм ($7 \pm 0.5\%$, $n=7$, $p < 0.001$) (Рис. 3.30Б). Ці результати вказують, що викликана DAMGO потенція Р-струму не опосередкована ПКА або ПКЦ.

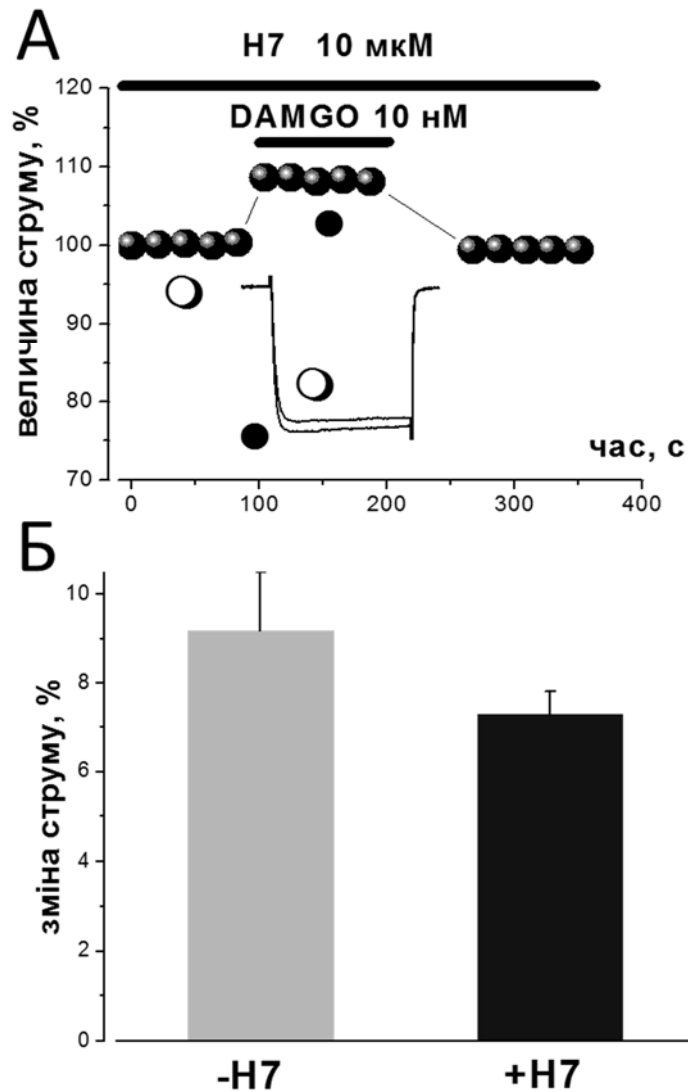


Рис. 3.30 - H7 не усуває потенціюючий ефект 10 нМ DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів.

Внутрішньоклітинна перфузія нейронів з неспецифічним блокатором обох кіназ, H89 (10 мкМ) [198] протягом 20 хв., також не усувала ефект DAMGO на Р-струм ($8 \pm 0.5\%$, $n=3$, $p<0.01$).

3.6.3. Відсутність впливу G-білків на модуляцію опіоїдами кальцієвих каналів Р-типу.

Як було показано [199], модуляція кальцієвих каналів Р-типу в нейронах Пуркін'є щура за участю G_i -білків викликає потенціалозалежну

зміну амплітуди та кінетики активації Р-струму. В попередньо проведених нами експериментах внутрішньоклітинна перфузія нейронів розчином, що містить ГТФ- γ -S (негідролізуємий аналог ГТФ) в концентрації 500 мкМ, призводила до потенціалозалежного сповільнення кінетики активації та до зменшення амплітуди Р-струму. Як показано на Рис. 3.31 всі ці ефекти, могли бути повністю усунені прикладанням деполяризуючого імпульсу тривалістю 50 мс до значень мембранного потенціалу +100 мВ.

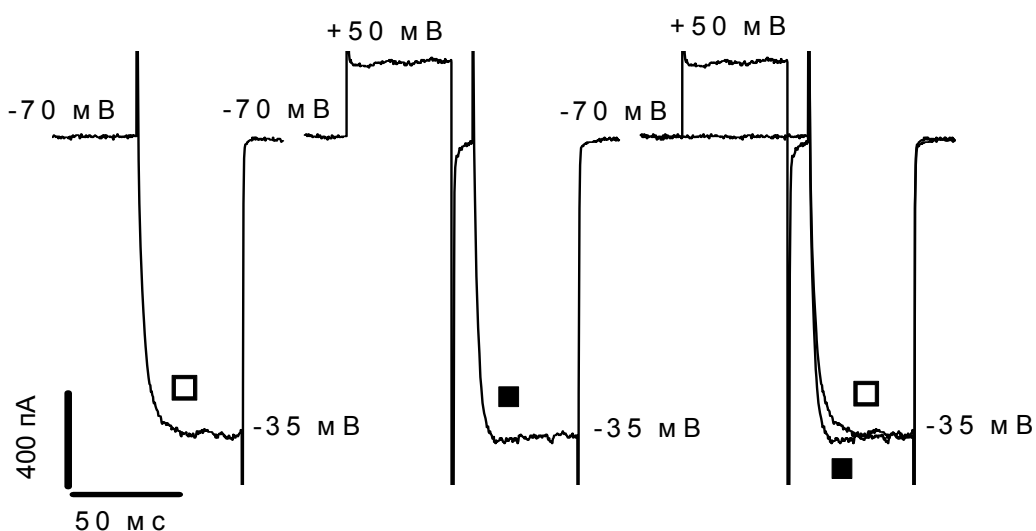


Рис. 3.31 - Записи Р-струмів при різних протоколах стимуляції клітини. Клітина була перфузована протягом 25 хв внутрішньоклітинним розчином, що містив 500 мкМ ГТФ- γ -S. Сповільнення кінетики активації, та зменшення амплітуди Р-струму усувається зміщенням мембранно мембранного потенціалу до +100 мВ.

Отже, дані цих експериментів вказують на присутність в нашій експериментальній системі функціонально-активних G-білків, здатних модулювати роботу Р-каналів.

Як відомо, існує два типи G-білок опосередкованої модуляції кальцієвих каналів: потенціалзалежна, що зумовлена взаємодією $G_{\beta\gamma}$ субодиниці з кальцієвим каналом [200], та потенціалнезалежна, за участі G_{α} субодиниці [201].

3.6.3.1. Модуляція Р-струму DAMGO в умовах парної стимуляції клітини.

Відомо, що потенціал-залежна модуляція кальцієвих каналів може бути усунена прикладанням деполяризуючого імпульсу до додатніх значень мембранного потенціалу [202].

На рисунку Рис. 3.32А наведено оригінальні записи реєстрацій Ba^{2+} струму через кальцієві канали Р-типу контролі та після аплікації DAMGO в умовах парної стимуляції клітини. Записи струмів були зроблені з інтервалом у 5 с при зміщенні мембранного потенціалу до рівня, вказаного біля кожного запису. Записи струмів: ○-контрольний розчин, ●-контрольний розчин в умовах парної стимуляції клітини, □-аплікація 10 нМ DAMGO в умовах звичайної стимуляції, ■-прикладання 10 нМ DAMGO в умовах парної стимуляції клітини. Рис. 3.32Б відображає ВАХ побудовані по записах Р-струмів наведених на Рис. 3.32А.

Для того, щоб з'ясувати чи залучена у механізм модуляції Р-струму агоністами MOR потенціалзалежна взаємодія $G_{\beta\gamma}$ субодиниці з кальцієвим каналом, ми провели серію експериментів в котрих перед основним тестуючим зміщенням мембранного потенціалу подавався деполяризуючий імпульс тривалістю 50 мс до значень мембранного потенціалу +50 мВ. Як видно з Рис. 3.32В позаклітинна аплікація DAMGO, як і раніше, викликала збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 1.3\%$, $n=5$, $p<0.01$). Модулююча дія 10 нМ DAMGO на Р-струм зберігалася і в тому випадку, коли тестуючому імпульсу передував преімпульс тривалістю 50 мс до +50 мВ. У цих експериментах, як і раніше, спостеріглось збільшення амплітуди Р-струму в

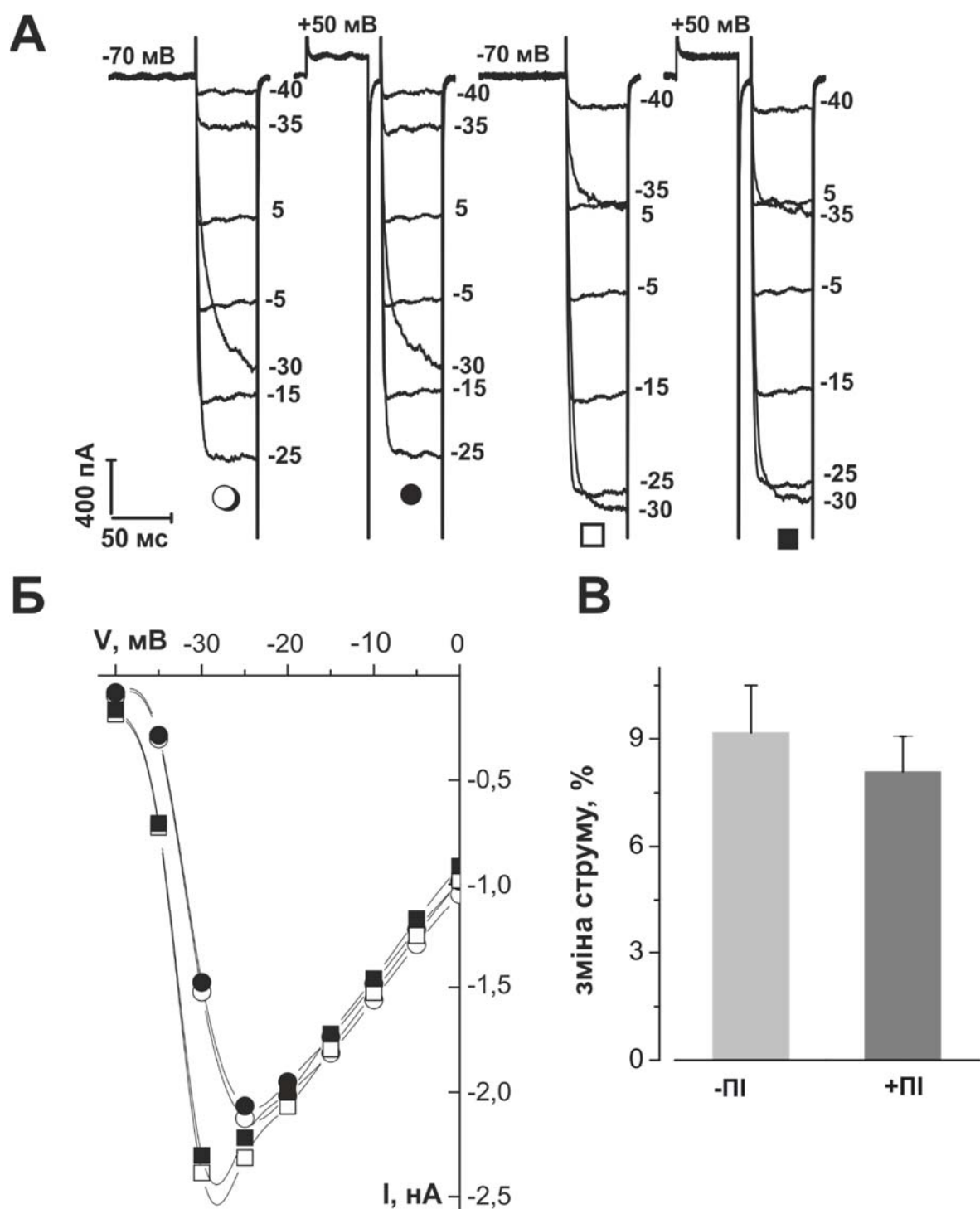


Рис. 3.32 - Модуляція струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінєс під впливом DAMGO: незалежність від потенціалу.

порівнянні з контрольним ($8 \pm 1\%$, $n=5$, $p<0.01$). Видалення DAMGO з позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди Р-струму.

3.6.3.2. Модуляція P-струму DAMGO в умовах внутрішньоклітинної перфузії нейронів розчином, що містить ГТФ- γ -S.

Як вже було зазначено раніше, у всіх наших експериментах, проведених через 15-20 хв після початку перфузії нейронів Пуркінє

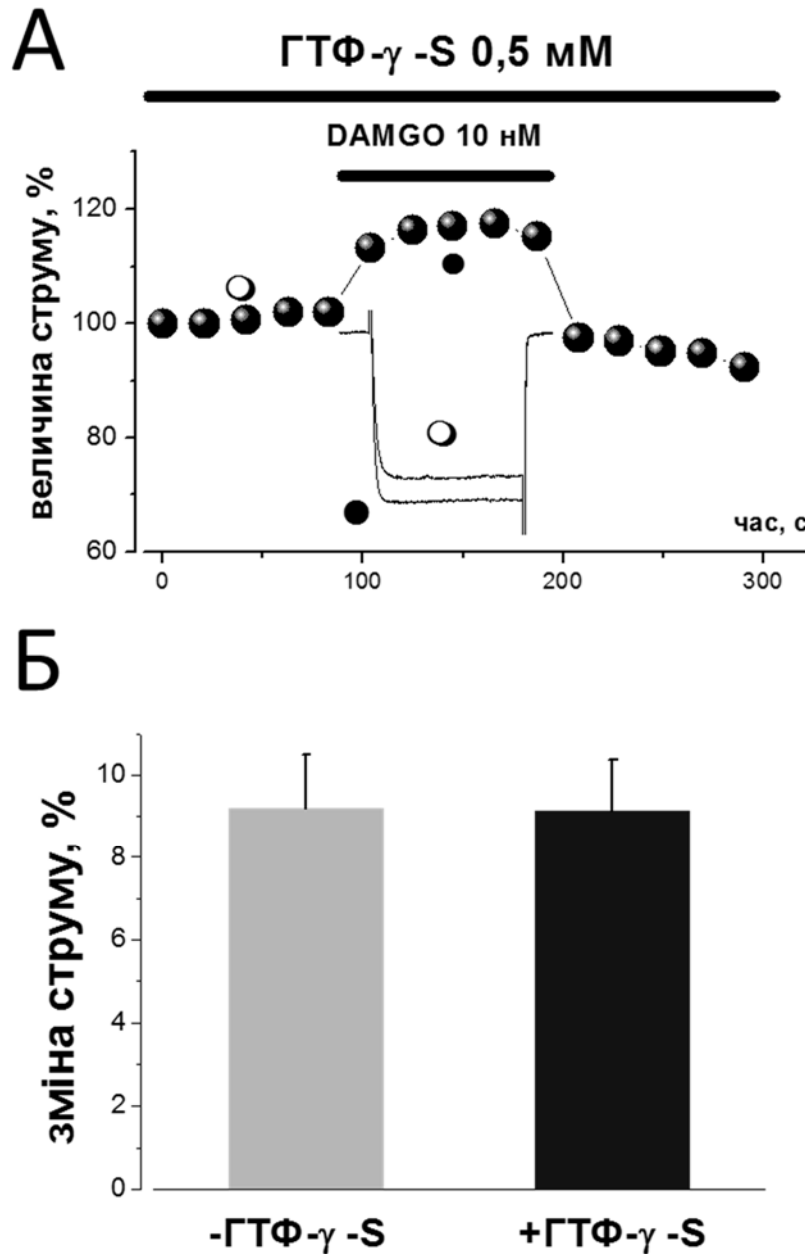


Рис. 3.33- ГТФ- γ -S не усуває потенціюючий ефект DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

внутрішньоклітинним розчином, що містить ГТФ- γ -S (незворотній

неселективний активатор G-білків) в концентрації 500 мкМ, спостерігалось уповільнення кінетики активації та зменшення амплітуди Р-струму (Рис. 3.31). Проте, у всіх цих експериментах подальша позаклітинна аплікація DAMGO в концентрації 10 нМ, викликала збільшення амплітуди реєстрованого Р-струму. На Рис. 3.33А представлений часовий перебіг впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO при перфузії клітини внутрішньоклітинним розчином, що містить ГТФ- γ -S в концентрації 500 мкМ.

Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликались деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму. Через 20 хв після початку перфузії нейрона Пуркінє внутрішньоклітинним розчином, що містить 500 мкМ ГТФ- γ -S, аплікація 10 нМ DAMGO викликала збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 1.2\%$, $n=8$, $p<0.001$). Видалення DAMGO з позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди Р-струму. Проте, як показано на Рис. 3.33 присутність ГТФ- γ -S (500 мкМ) у піпетці не усувала ефект 10 нМ DAMGO ($9 \pm 1.2\%$, $n=8$, $p<0.001$).

Таким чином, дані цих експериментів вказують на те, що активація G-білків, під дією ГТФ- γ -S, не впливає на модуляцію DAMGO кальцієвих каналів Р-типу.

3.6.3.3. Модуляція Р-струму DAMGO в умовах внутрішньоклітинної перфузії нейронів розчином що містить ГДФ- β -S.

В наступних наших експериментах для дослідження потенціал незалежного впливу G-білків на модуляцію Р-струму під дією DAMGO ми

використали у внутрішньоклітинному розчині ГДФ- β -S (незворотній блокатор G-білків) замість ГТФ. На Рис. 3.34А представлено часовий перебіг впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO при перфузії клітини

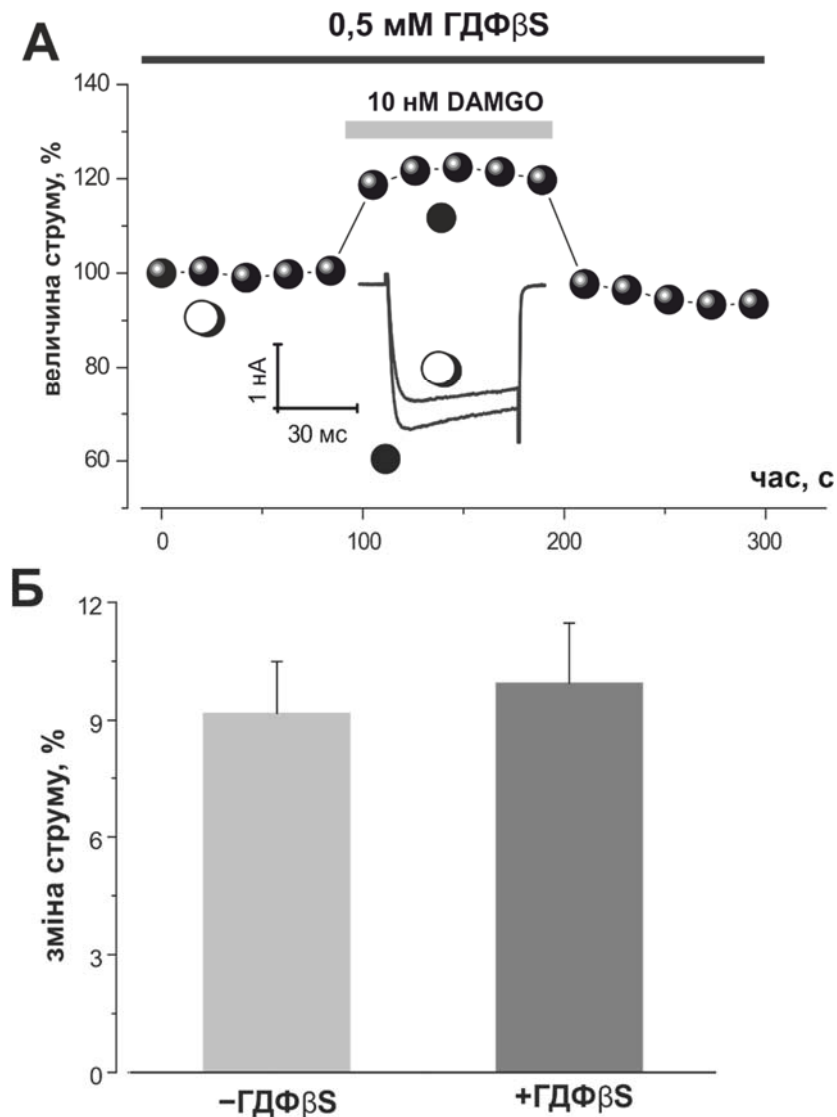


Рис. 3.34 - ГДФ- β -S 500 мкМ не усуває потенціюючий ефект 10 нМ DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

внутрішньоклітинним розчином, що містить ГДФ- β -S в концентрації 500 мкМ. Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликалися деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ.

Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму.

Через 20 хв після початку перфузії нейрона Пуркінє внутрішньоклітинним розчином, що містить 500 мкМ ГДФ- β -S, аплікація 10 нМ DAMGO викликала збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 1.2\%$, $n=8$, $p<0.001$). Видалення DAMGO з позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди Р-струму.

Проте, як показано на Рис. 3.34 присутність ГДФ- β -S (500 мкМ) у піпетці не усувала ефект 10 нМ DAMGO ($10 \pm 1.5\%$, $n=9$, $p<0.001$).

Таким чином, інактивація G-білків, що була спричинена дією ГДФ- β -S, не впливала на модуляцію Р-струму під дією DAMGO.

3.6.3.4. Модуляція Р-струму DAMGO в умовах внутрішньоклітинної перфузії нейронів розчином що містить ГДФ.

Добре відомо, що G-білки повністю інактивуються при гідролізі ГТФ до ГДФ. Додавання значної кількості ГДФ у внутрішньоклітинний розчин запобігає зв'язуванню ГТФ з G-білками та їх подальшій активації. Тому в наступних експериментах присвячених дослідженню потенціал-незалежного впливу G-білків на модуляцію Р-струму під дією DAMGO, у внутрішньоклітинному розчині було застосовано ГДФ в концентрації 500 мкМ. На Рис. 3.35А показані часовий перебіг впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO при перфузії клітини внутрішньоклітинним розчином, що містить ГДФ в концентрації 500 мкМ. Кальцієві струми крізь кальцієві канали Р-типу викликались деполяризацією клітинної мембрани від -70 до -20 мілівольт тривалістю 50 мс кожні 20 секунд. Струми реєструвалися на максимумі ВАХ. Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту нормувалися на амплітуду першого контрольного струму.

Перфузія клітини, перед прикладанням агоністу MOR, тривала 15-25 хвилин. За цей час, будь-яка активність G-білків, була усунена. Як показано

на Рис. 3.35 позаклітинна аплікація DAMGO, як і раніше, викликала збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 1.3\%$, $n=5$, $p<0.01$). Модулююча дія 10 нМ DAMGO на Р-ток зберігалася і після 20 хв перфузії нейрона Пуркінє

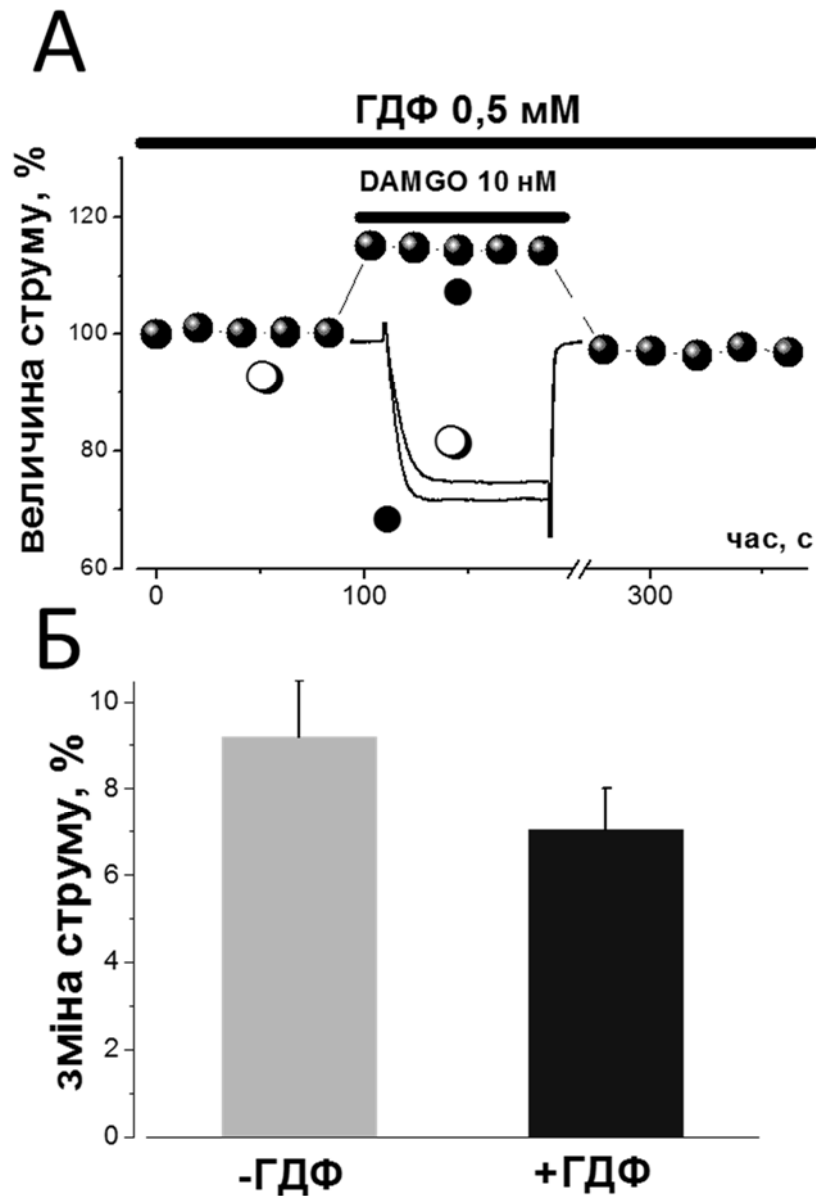


Рис. 3.35 - ГДФ не усуває потенціюючий ефект DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.

внутрішньоклітинним розчином, що містить 500 мкМ ГДФ. У цих експериментах, як і раніше, спостеріглось збільшення амплітуди Р-струму в порівнянні з контрольним ($7 \pm 1\%$, $n=5$, $p<0.01$). Видалення DAMGO з

позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди Р-струму.

Таким чином, дані цих експериментів вказують на те, що активація G-білків, під дією ГДФ, не впливає на модуляцію DAMGO кальцієвих каналів Р-типу.

У підсумку дані експериментів з визначення участі G-білків в досліджуваній модуляції переконливо вказують на те, що викликана DAMGO модуляція Р-каналів не є опосередкованою G-білками.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Модуляція опіоїдами високопорогових кальцієвих каналів

Опіоїдні рецептори належать до великої суперсім'ї GPCRs та складаються з 7 трансмембранних доменів, які з'єднуються трьома зовнішньоклітинними та трьома внутрішньоклітинними петлями, зовнішньоклітинну N-кінцеву ділянку, та внутрішньоклітинний C-кінцевий хвіст (Рис. 4.1) [203]. Встановлено, що основними місцями зв'язування G-білка з опіоїдним рецептором являється 2-га и 3-тя внутрішньоклітинна петля і можливо “ближня” частина C-терміналі. Вважають, що різні $G\alpha$ субодиниці зв'язуються з 3-ю внутрішньоклітинною петлею, а взаємодія G-білку з 2-ю внутрішньоклітинною петлею призводить до його активації. На першій та другій зовнішньоклітинній петлях знаходиться по одній цистеїновій амінокислоті, котрі вочевидь, утворюють дисульфідний зв'язок (S-S). Різні типи опіоїдних рецепторів мають до 60% гомології (найбільший відсоток гомології мають трансмембранні спіралі, а найменший – N- и C-терміналі). В експериментах (з мутантними та химерними рецепторами) в яких вивчалось зв'язування рецептора з лігандом було встановлено, що всі опіоїдні рецептори мають схожий зв'язуючий центр, який розташований у внутрішній ділянці, яка утворена трансмембранними спіралями 3, 4, 5, 6 и 7. Цей ліганд-зв'язуючий центр частково прикритий зовнішньоклітинними петлями які, можливо, виконують роль селективного фільтра при зв'язуванні ліганда з рецептором. Поки що залишається відкритим питання щодо ключових амінокислотних залишків, які беруть участь у рецепції. Вирішення цієї проблеми

забезпечить подальший прогрес у розробці нових високоефективних фармакологічних засобів. Головним напрямком досліджень у цій галузі є клонування мутантних форм опіоїдних рецепторів [195].

Припущення про те, що знеболюючий ефект опіатів опосередковується специфічним рецептором, виникло у 1950-х роках. Воно ґрунтувалося на залежності викликаних ефектів від структури та

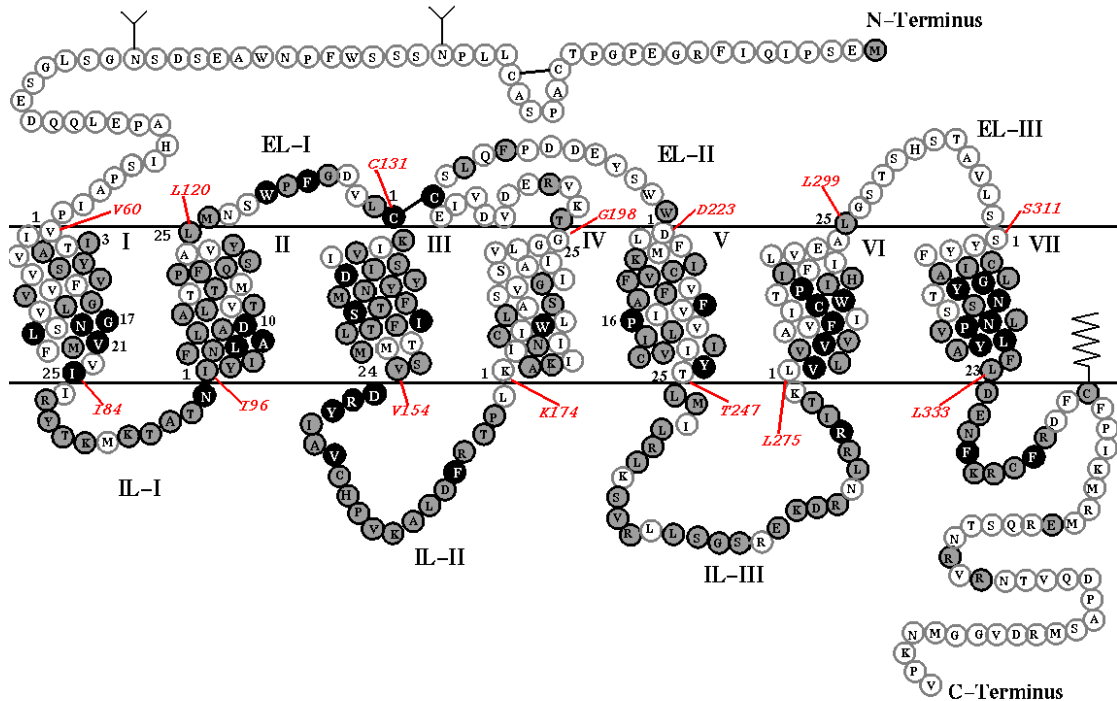


Рис. 4.1 - Структура опіоїдного рецептора.

стехіометрії досліджуваних речовин. Концепція щодо існування кількох типів опіоїдних рецепторів з'явилася для пояснення подвійного ефекту синтетичного опіоїду – налорфіну [195]. З одного боку, він послаблює знеболюючий ефект морфіну на людський організм, а з іншого, сам по собі є анестетиком. Мартін у 1967 р. прийшов до висновку, що знеболюючий ефект налорфіну пов'язаний з опіоїдним рецептором, відмінним від того, що забезпечує аналгетичний ефект морфіну. Пізніше рецептор, що зв'язувався з налорфіном, був названий к-опіоїдним. Подальші дослідження, проведені на хронічних спинальних собаках, у ході яких дослідні зразки агоністів – морфін, кетазоцин, N-аллілнорметазоцин (SKF

10047), виявили різні фармакологічні властивості; засвідчили існування кількох підтипів опіоїдних рецепторів – μ , δ та κ [195].

Результати численних робіт свідчать на користь існування трьох чітко визначених або “класичних” типів опіоїдних рецепторів – MOR (μ - му “морфін”), DOR (δ - дельта, від “*deferens*”, був вперше ідентифікований у *vas deferens* миші), та KOR (κ - каппа “кетотиклазоцин”), а також опіоїдоподібного рецептора NOP (*nociceptin/orphanin FQ* або ORL1), що вважається членом родини опіоїдних рецепторів, але має дуже низький рівень зв’язування з усіма відомими опіоїдними лігандами. Клоновані гени, що кодують ці підтипи рецепторів. Ґрунтуючись на фармакологічних дослідженнях, виділяють ϵ -, ι -, λ - та ζ -опіоїдні рецептори. σ -рецептор, який раніше зараховували до опіоїдних рецепторів, більше не відносять до цієї родини [195]. Кожен з цих типів володіє своїми унікальними фармакологічними властивостями, що дозволяє фармакологічними методами розділяти основні типи опіоїдних рецепторів.

4.2. Опіоїдні рецептори мозочку та їх фізіологічні функції

Агоністами опіоїдних рецепторів являються як ендогенні пептиди, так і екзогенні не пептидні молекули (ліганди). Основні ендогенні опіоїдні пептиди утворюються з 4 попередників: *pro-opiomelanocortin*, *proenkephalin*, *prodynorphin* и *pronociceptin/orphanin FQ*. За виключенням останнього (*pronociceptin/orphanin FQ*) всі пептиди, утворені з попередників містять послідовність з 5 амінокислот TyrGlyGlyPheMet/Leu. *Nociceptin/orphanin FQ*, доречі, містить *phenylalanine* (F) замість *tyrosine* на N-терміналі, залишок необхідний для високо-афінного зв’язування з класичними опіоїдними рецепторами. Виключення складають селективні агоністи MOR Ендоморфін-1 та 2, які являються тетрапептидами та мають

структуру відмінну від інших ендогенних пептидів (попередник для Ендоморфін-1 та 2 до сих пір ще не знайдений). В таблиці наведені основні ендогенні агоністи опіоїдних рецепторів для 4 типів опіоїдних рецепторів.

Таблиця 4.1 - Ендогенні ліганди опіоїдних рецепторів

Тип рецептора	Агоністи
μ-опіоїдні	ендоморфіни, енкефаліни, ендорфіни
δ-опіоїдні	енкефаліни, ендорфіни
κ-опіоїдні	динорфіни
ORL1	проноцицептин/орфанін

Активація опіоїдних рецепторів ендогенними і екзогенними лігандами приводить до безлічі ефектів (збуджуючий або інгібуючий), які включають знеболення, дихальну депресію, ейфорію, живлення, вивільнення гормонів, зниження шлунковокишкового транзиту, відчуття занепокоєння. Вони залежать від таких параметрів як концентрація агоніста, тривалість преінкубації агоніста, тип рецептора, тип G-білка з якими взаємодіє рецептор, а також активації різних внутрішньоклітинних шляхів. Взагалі, агоністи селективні до MOR або DOR рецепторів беззаспокійливі та викликають ейфорію, тоді як агоністи селективні до KOR переважно викликають дисфорію. Морфій і інші опіоїди є засобами вибору для лікування хронічного болю. Проте головне обмеження до їх тривалого використання - розвиток фізіологічної "толерантності". Сильне зменшення беззаспокійливих ефектів спостерігалось у більшості пацієнтів протягом тривалого застосування наркотичних знеболювальних. На додаток до толерантності, фізіологічна "залежність", яка приводить до необхідності безперервного використання та збільшення доз наркотика, щоб запобігти розвитку симптомів відміни опіоїдів, може виникати у деяких пацієнтів. По цих причинах були винайдені тваринні моделі толерантності, залежності і

згубної звички, щоб визначити механізми, які лежать в основі цих складних явищ.

Ранні дослідження на головному та спинному мозку щурів з використанням іонофоретичних методів виявили, що морфін може пригнічувати чи збуджувати окремі нейрони. Викликане опіоїдами пригнічення нейрональної активності відбувається насамперед внаслідок активації калієвих каналів плазматичної мембрани нейронів. Наразі відомо, що опіоїдні рецептори активують низку калієвих каналів, зокрема: G-білок активовані калієві канали внутрішнього випрямлення, кальцій-активовані калієві канали, калієві канали внутрішнього випрямлення, дендротоксин-чутливі калієві канали та калієві канали М-типу. Як і інші члени родини G_i/G_o -спряжених рецепторів, усі підтипи опіоїдних рецепторів здатні пригнічувати високопорогові потенціал-активовані кальцієві канали. Втім, у деяких типах клітин активація опіоїдних рецепторів призводить до зростання концентрації вільного кальцію всередині клітини, викликаючи вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо чи збільшуючи вхід кальцію за рахунок дигідропіридин-чутливих механізмів [195, 203].

Результати численних досліджень свідчать про те, що опіоїди пригнічують вивільнення нейромедіаторів. Перші дані про це, було отримано на периферичній нервовій системі: виявилось, що морфін сповільнював перистальтику у клубовій кишці мурчаків за рахунок пригнічення вивільнення ацетилхоліну. Пізніше було показано, що морфін пригнічує викид норадреналіну (та, імовірно, АТФ) з постгангліонарних симпатичних нервових закінчень, що іннервують мигальну перетинку kota та сім'явивідні протоки миші. Ранні дослідження на головному мозку показали, що опіати пригнічують викид ацетилхоліну та норадреналіну з нейронів кори головного мозку. Подальші дослідження засвідчили, що опіоїди здатні пригнічувати вивільнення глутамату, ГАМК та гліцину у різних ділянках центральної нервової системи, активуючи той чи інший підтип опіоїдних рецепторів. Спочатку вважалося, що це відбувається за

рахунок підвищення калієвої провідності та інгібування потенціал-керованих кальцієвих каналів. Однак пізніше було показано, що опіоїди можуть безпосередньо пригнічувати роботу систем, відповідальних за вивільнення нейромедіаторів. Таким чином, опіоїди здатні пригнічувати викид нейромедіаторів за рахунок одного чи кількох механізмів. Значення кожного з цих механізмів може відрізнятися у різних синапсах. Хоча опіоїди здійснюють, головним чином, пригнічуючий вплив на нервову систему, вони опосередковують збуджуючі ефекти у кількох ділянках головного мозку, що відповідають за супраспинальну аналгезію (наприклад, периаквадуктальна сіра речовина) чи відчуття ейфорії/винагороди (вентральна ділянка покори). Наразі вважається, що викликане опіоїдами збудження одних нейронів обумовлюється пригніченням вивільнення нейромедіаторів (зокрема, ГАМК) з інтернейронів. Опіоїдні рецептори, як і інші G_i/G_o -спряжені рецептори, здатні пригнічувати аденілатциклазу, що призводить до зниження внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. У первинних сенсорних нейронах цАМФ регулює роботу катіонних каналів, що активуються гіперполяризацією (I_h). Знижуючи рівень цАМФ в клітині, опіоїди ефективно пригнічують I_h , послаблюючи пейсмейкерну активність та зменшуючи частоту потенціалів дії. У такий спосіб опіоїди скорочують потік ноціцептивної інформації до центральної нервової системи. Після припинення обробки клітин опіоїдами рівень цАМФ в нейронах зростає і за рахунок підвищення активності ПКА збільшується викид нейромедіаторів. За цих умов, пригнічення аденілатциклази опіоїдами призведе до зменшення викиду нейротрансмітерів, викликаного активацією ПКА [195].

Сучасні дані показують, що найбільша експресія MOR є у мозочку (більша у 2 рази ніж в нейронах ДКГ та спинному мозку), хвостатому та прилеглому ядрі людини (лат. *nucleus accumbens*- група нейронів у вентральній частині смугастого тіла, що є важливою частиною мезолімбічного шляху задіяна у системі винагород, формуванні задоволення, сміху, залежності, агресії, страху та ефекту плацебо. Прилегле

ядро отримує інформацію від дофамінових нейронів вентральної тегментальної зони та глутамінових нейронів префронтальної кори, мигдалеподібного тіла та гіпокампу. Тут відбувається аналіз сенсорної та емоційної інформації і формування поведінкової відповіді на мотивуючі подразник.

На Рис. 4.2 стандартними імуногістохімічними методиками показана експресія МОР і ДОР рецепторів в мозочку щура. Спочатку МОР та ДОР були промарковані первинними поліклональними кролячими антитілами. Імуногістохімічний сигнал був ампліфікований біотин-тирамідним кітом. Потім клітини були візуалізовані за допомогою 3,3'-діамінобензидіпіном

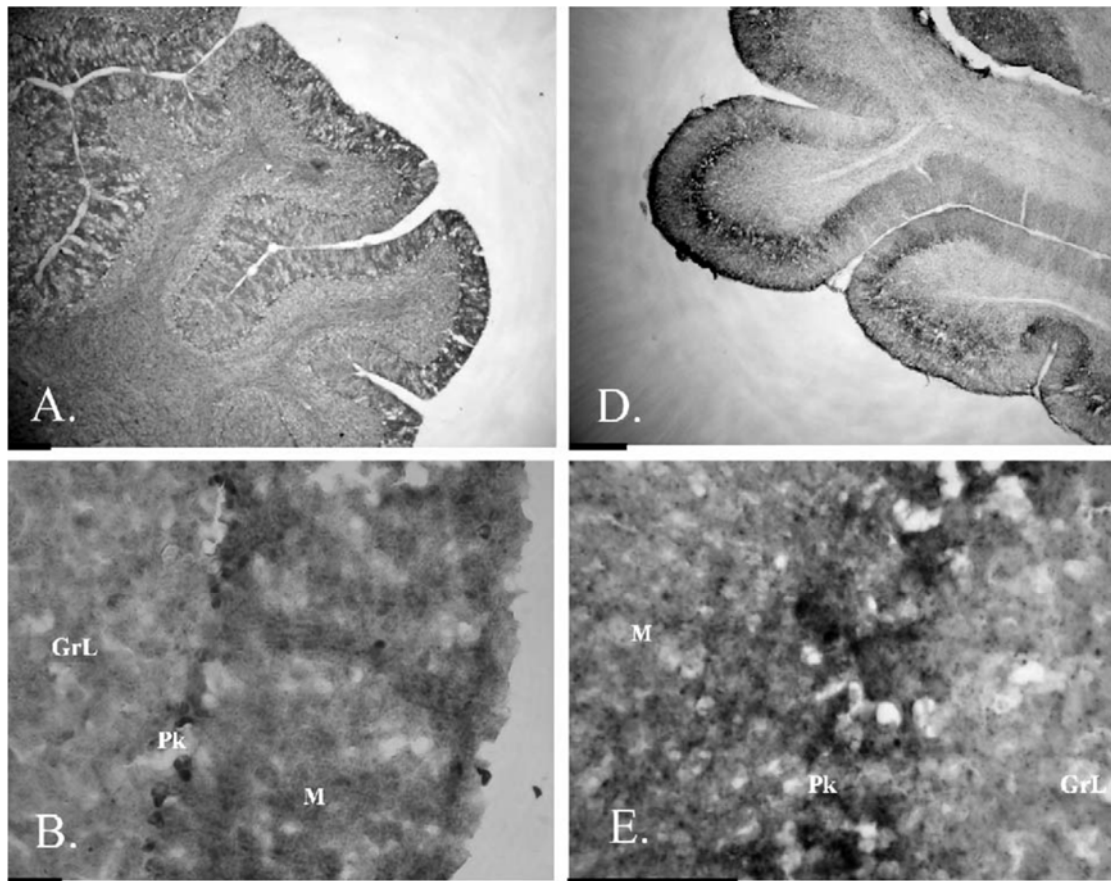


Рис. 4.2 - Експресія МОР і ДОР у мозочку щурів (Е.М. Mrkusich et al., 2004)

(DAB). На рисунку зліва показана експресія ДОР, а справа – МОР. На рисунку зображено, що експресія МОР виражена у нейронах Пуркін'є та молекулярному шарі мозочку. Панелі В і Е відображають збільшене

зображення. Позначено: Pk – шар клітин Пуркін'є, GrL-гранулярний шар, M-молекулярний шар.

4.3. Класичні ефекти опіодіїв на кальцієві канали

Високопорогові кальцієві канали (N-, L-, P/Q- і R-типу) присутні як у центральних так і у периферичних нейронах нервової системи ссавців. Вони є одним з основних регуляторів активності нейронів. Вони регулюють вхід кальцію в клітину, тим самим виступаючи у ролі посередників та регуляторів таких важливих Ca^{2+} залежних процесів як експресія генів, секреція гормонів, збудливість мембрани та синаптична передача [204, 205]. У зв'язку з їхньою життєво необхідною функцією у клітинній регуляції, кальцієві канали модулюються набором внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що забезпечує потужні шляхи для регуляції біологічної функції шляхом контролю входу кальцію в клітину. Потенціал керовані кальцієві канали P/Q-типу є одним із найважливіших компонентів синаптичної передачі в мозку у ссавців [9]. Навіть незначні зміни властивостей цих каналів, можуть істотно впливати на ефективність синаптичної передачі впливаючи на концентрації серотоніну, норадреналіну, глутамату, ГАМК та інших нейропередатчиків. У даній роботі було встановлено, що механізм передачі сигналу від μ -опіоїдного рецептора до кальцієвого каналу P-типу в мембрані нейронів Пуркін'є мозочка щурів не опосередковується G-білками і відбувається без участі таких вторинних посередників, як іони кальцію, PKA, PKC та CaMKII.

Агоністи опіоїдних рецепторів впливаючи на одні й ті ж препарати призводять до протилежних ефектів, як до збудження так і до пригнічення, в залежності від таких параметрів як концентрація агоніста, тривалість преінкубації агоніста, типу рецептора, типу G-білку з яким взаємодіє рецептор, та активації різних внутрішньоклітинних шляхів. Зокрема показано, що агоністи опіоїдних рецепторів можуть викликати збільшення

або зменшення амплітуди калієвого і кальцієвого струму в залежності від типу рецептора і від типу внутрішньоклітинного шляху [187]. Встановлено, що алкалоїдний агоніст MOR морфін у мікромольних концентраціях також взаємодіє з κ - та δ -опіоїдними рецепторами [187, 188].

4.4. Некласичний вплив опіодіїв на кальцієві канали Р-типу

У наших експериментах агоністи опіоїдних рецепторів також викликали протилежні ефекти. Аплікація морфіну (неселективний алкалоїдний агоніст) в концентраціях від 1 до 100 мкМ в 12% клітин викликала пригнічення амплітуди Р-струму, тоді як у 29% клітин жодного ефекту не спостерігалось, а в 59% клітин спостерігалась потенціація амплітуди цього струму. Пригнічення амплітуди Р- в присутності морфіну, можливо, було спричинено активацією KOR або DOR [186], тоді як збільшення амплітуди Р-струму могло бути зумовлено взаємодією цього агоністу з MOR. Поясненням випадків, коли дія морфіну не спостерігалась, може бути взаємна компенсація протилежних ефектів (потенціація та інгібування амплітуди Р-струму). Таким чином, ці дані вказують на те, що морфін у мікромольному діапазоні концентрацій не є селективним агоністом MOR і, можливо, регулює кальцієві канали Р-типу різними шляхами, в залежності від того, який тип рецепторів переважно ним активований.

Наступна серія експериментів була проведена із застосуванням синтетичного селективного агоніста MOR DAMGO. Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO в концентраціях від 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л викликала статистично достовірне збільшення амплітуди Р-струму в 76% нейронів), в той час як в 24% нейронів речовина не викликала ефекту в жодній концентрації. В експериментах проведених з метою визначення залежності ефекту DAMGO від концентрації було показано, що збільшення амплітуди

Р-струму спостерігалось вже при прикладанні DAMGO в концентрації 1 нмоль/л і досягало насиченої дії в концентрації 100 нмоль/л. Згідно до результатів цих дослідів можна підсумувати, що напівмаксимальна ефективна концентрація (EC_{50}) ліганду знаходиться в межах від 1 до 10 нмоль/л. Ці значення EC_{50} близькі до тих, що були отримані Мінамі та іншими [187] (0.87 нмоль/л) і Райнором та іншими [188] (2 нмоль/л) в експериментах по вивченню зв'язування DAMGO з μ -опіоїдними рецепторами. Дані цих експериментів відрізняються від даних, що були отримані Канемасою та його співавторами [186] в роботі, де вони досліджували модулюючу дію агоністів КОР на кальцієвий струм Р-типу в нейронах Пуркінє. Ці автори показали, що пригнічення цього струму селективним агоністом КОР U50488 відбувається значно повільніше (протягом хвилини) та залежить від частоти стимуляції клітини. Для порівняння ми провели експерименти в яких агоніст був прикладений на тривалий час в концентрації 1000 нМ. Виявилось, що DAMGO в цій концентрації крім ефекта потенціації, також викликає повільне зменшення амплітуди Р-струму. Така дія, вочевидь, пов'язана з тим, що DAMGO в цій концентрації вже може активувати інші типи опіоїдних рецепторів, що в свою чергу, як було показано Канемасою та співавторами [186], може призводити до пригнічення амплітуди Р-струму. Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що DAMGO модулює кальцієві канали з ефективністю співставною з афінністю класичного опіоїдного рецептора. Тому для подальшого дослідження дії опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, а також визначення можливих механізмів, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми, ми використовували DAMGO в концентрації 10 нМ.

Аплікація 10 нМ DAMGO призводила до швидкого зростання амплітуди Р-струму. Ефект був більш виражений за від'ємних значень мембранного потенціалу. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA)

виявив, що криві ВАХ суттєво відрізняються в межах -40 мВ ($29 \pm 7\%$), до -20 мВ ($8 \pm 2\%$). Розвиток ефекту не залежав від стимуляції клітини та був повністю зворотнім при усуненні агоніста із зовнішньоклітинного розчину. Ефект потенціації Р-струму DAMGO залежить від концентрації агоніста, а не від тривалості прикладання. Після прикладання речовини в концентрації 10 нМ протягом 5 хвилин, ефект не змінювався та легко був усунений при поверненні до контрольного розчину.

Ендогенний селективний агоніст МОР Ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях ($EC_{50}=7.7$ нмоль/л) може спричиняти модуляцію потенціал активованих кальцієвих каналів [206]. В наших експериментах Ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях викликав збільшення амплітуди Р-струму. Ефект потенціації цього струму під дією Ендоморфін-1 для концентрацій 10 нМ та 100 нМ був слабшим $8 \pm 1\%$ та $10 \pm 1\%$ відповідно, у порівнянні з ефектом DAMGO $10 \pm 1\%$ та $12 \pm 1\%$ для тих самих концентрацій та розвивався більш повільно, ніж ефект, спричинений DAMGO. Отримані нами дані вказують на те, що селективні агоністи μ -опіоїдних рецепторів при взаємодії в наномолярних концентраціях з високоафінним центром зв'язування МОР можуть викликати потенціацію Р-струму, в той самий час як неселективна активація опіоїдних рецепторів призводить до протилежних ефектів, представлених вище.

Добре відомо, що фосфорилювання опіоїдних рецепторів певним видом кіназ, наприклад, G-білок зв'язана рецепторна кіназа (GPK) призводить до десенситизації рецептора і його подальшої інтерналізації. Цей процес відбувається навіть в тому випадку якщо агоніст був прикладений на короткий час. Після інтерналізації, рецептор знову може стати функціонально активним і повернутися на мембрану (цей процес називається ресенситизацією). При аплікації агоніста на тривалий час також може відбуватися фосфорилювання рецептора і його подальша десенсітізація, проте в цьому випадку фосфорилювання здійснюється іншими протеїн кіназами: такими як протеїн кіназа А (ПКА) та протеїн

кіназа С (ПКЦ), а наступна інтерналізація рецептора відбуватися значно повільніше [189]. Ми спробували з'ясувати чи відбувається десенситизація високоафінного центру зв'язування з агоністами MOR. Перше прикладання агоніста на викликало швидке збільшення амплітуди струму, протягом 2-3 хвилин інкубації клітини у розчині, що містить агоніст, не відбувалося ніяких подальших змін в амплітуді струму. При усуненні агоніста амплітуда струму знову поверталася до контролю. Подальша аплікація агоніста в тій же концентрації та на той самий час призводила до того ж ефекту. Таким чином, в наших експериментів при додатку агоніста на 2-3 хвилини ніякої десенситизації та інтерналізації не спостерігалось (можливо, це пов'язано з відсутністю фосфорилування рецептора GPK).

Антагоністи блокують агоніст-залежну активацію рецептора, але можуть мати різні ефекти в основних активних рецепторах. Субстанції, що пригнічують основну сигнальну активність рецептора, названі зворотні (інверсні) агоністи, тоді як нейтральні антагоністи не впливають на основну передачу сигналів. Як було показано недавно, ліганди можуть бути агоністами, нейтральним антагоністом, або зворотними агоністами, для того ж типа рецепторів, залежно від клітинного контексту. Це явище - названий багатообразний агонізм [207].

Налоксон - антагоніст опіїдних рецепторів з високою спорідненістю до μ -, помірною спорідненістю до κ - і відносно низькою спорідненістю до δ -опіїдних рецепторів [187]. Встановлено [208], що ця речовина може виступати в якості нейтрального антагоніста в клітинах, які попередньо не перебували під дією агоніста. У клітинах, що були проінкубовані з морфіном, налоксон проявляє себе як зворотній агоніст, який пригнічує базальну активність μ -опіїдних рецепторів [208]. Подібний вплив налоксону як агоністу μ - та κ -опіїдних рецепторів також було виявлено у клітинах яєчника китайського хом'яка [209]. Таким чином, налоксон є багатограним (різнобічним) агоністом MOR [208].

У наших експериментах аплікація 100 нМ налоксону спричиняла швидке та незначне $5 \pm 1\%$ збільшення амплітуди Р-струму і повністю усувала ефект 10 нМ DAMGO. Ці дані вказують на те, що DAMGO і налоксон модулюють Р-струм через взаємодію з одним і тим самим високо-афінним центром зв'язування, який має фармакологічні властивості подібні до MOR.

Сильнодіючий та високоселективний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів CTOP, повністю усунув ефект DAMGO. CTOP сам по собі не викликав змін на Р-струмі. Повторне прикладання 10 нМ DAMGO в присутності 100 нмоль/л CTOP не викликало зростання амплітуди Р-струму в порівнянні з контрольним прикладанням агоніста. Отримані дані вказують на те, що збільшення амплітуди струму відбувається шляхом активації MOR [210].

Опіоїдні рецептори належать до великої суперсім'ї GPCRs. Як клас, GPCRs мають фундаментальну фізіологічну важливість, опосередковуючи ефекти більшості відомих медіаторів і гормонів. В багатьох роботах було показано, що опіоїдні рецептори можуть зв'язуватися як з PTX (*pertussis toxin-sensitive*) гетеротримерними G_i/G_o білками, так і з PTX нечутливими G_s і G_z білками [202, 211-214]. При активації опіоїдних рецепторів обидві $G\alpha$ та $G\beta\gamma$ субодиниці взаємодіють з багатьма внутрішньоклітинними системами, наприклад, подавляють активність аденілат циклази та потенціал-керованих кальцієвих каналів, і навпаки, стимулюють активність фосфоліпази C β (PLC β), а також збільшують G-білок активований вхідний калієвий струм (GIRK $_s$).

Чільне місце у переліку шляхів модуляції входу кальцію в клітину займає G-білок-опосередкована модуляція високотривалих кальцієвих каналів. “Класичні” механізми модуляції високотривалих кальцієвих каналів опіоїдами опосередковані шляхом активації PTX-чутливих ГТФ-зв'язаних G_i/o білків [212]. Ці G-білки являють собою гетеротримерні структури, що складаються з трьох субодиниць: α , β та γ . У стані спокою G-

білки зв'язані з гуанозиндифосфатом. Ліганд, зв'язуючись із метаботропним рецептором, викликає у ньому конформаційні зміни, котрі, у свою чергу, призводять до різкого збільшення спорідненості G-білка до гуанозинтрифосфату. В результаті чого, гетеротримерний комплекс розпадається на α (зв'язану з ГТФ) та $\beta\gamma$ димерну субодиниці. Вільні субодиниці G-білка регулюють велику кількість ефекторних білків, зокрема, кальцієві канали N та P/Q типу [215].

Розрізняють два типи G-білок опосередкованої регуляції кальцієвих каналів: потенціал-залежну та потенціал-незалежну. Потенціалнезалежна модуляція носить повільний характер пов'язаний з тим, що воно опосередковується як правило дифундуючими в цитоплазмі вторинними посередниками [216]. Потенціалзалежне, мембрано-розділене пригнічення, навпаки, швидке й опосередковане прямою взаємодією каналу з вільними $G\beta\gamma$ димерами [201, 215].

Результати експериментів, проведених нами з метою визначення участі потенціалнезалежної модуляція G-білками у механізмі збільшення амплітуди P-струму під дією DAMGO показали, що ефект DAMGO на P-струм внутрішньоклітинна перфузія нейронів розчинами, що містили незворотні блокатори G-білків ГДФ β S або ГДФ, або їх ГТФ γ S, не викликала змін у модуляції P-струму під дією DAMGO. Тобто модуляція ВПКС P-типу агоністами MOR не зумовлена потенціалнезалежною G-білок опосередкованою регуляцією.

Відомо, що потенціал-залежна модуляція кальцієвих каналів може бути усунена прикладанням деполяризуючого імпульсу до високих позитивних значень мембранного потенціалу [202, 217]. Для того, щоб з'ясувати чи відбувається така G-білок опосередкована потенціал-залежна модуляція P-струму агоністами MOR, ми провели серію експериментів в котрих перед основним тестуючим зміщенням мембранного потенціалу подавався деполяризуючий імпульс тривалістю 50 мс до значень мембранного потенціалу +50 мВ. Модулююча дія DAMGO на кальцієві

канали Р-типу зберігалось в умовах парної стимуляції клітини. Отже, модуляція агоністами МОР Р-струму не зумовлена взаємодією Gβγ субодиниці з кальцієвим каналом. Ми можемо зробити висновок, що викликана DAMGO модуляція Р-каналів не є опосередкованою G-білками.

Отже, отримані нами дані вказують на те, що механізм модуляції кальцієвих каналів Р-типу під дією DAMGO повністю відрізняється від “класичного” G-білок опосередкованого механізму модуляції цього каналу під дією агоністів МОР. Однак, збільшується число спостережень, які вказують на новий, G –білок-незалежний механізм, через який GPCRs можуть ініціювати біохімічні сигнали і модулювати нейрональну збудливість [218, 219]. Відповідно цим даним, GPCRs можуть безпосередньо опосередковувати рецепторну сигналізацію, як у випадку з G –білками або здатні викликати певні ефекти, активуючи системи трансдукції, які включають скафолд протеїни, або фізично пов’язують рецептор з різними ефекторними системами через ці скафолд протеїни [219, 220]. У біології, скафолд протеїни є важливими регуляторами багатьох ключових сигнальних шляхів. Незважаючи на те, що їх функції до кінця не визначені, можна припустити, що вони взаємодіють і / або зв’язуються з різними учасниками сигнального шляху, та поєднують їх у комплекси, тим самим регулюють передачу сигналу до певних ділянок клітини, таких як плазматична мембрана, цитоплазми, ядро, комплекс Гольджі, ендосоми і мітохондрії. Скафолд протеїни діють принаймні чотирма способами: зв’язують складові сигналізації, локалізують ці компоненти в конкретних ділянках клітини, регулюють передачу сигналу шляхом координації позитивних і негативних сигналів зворотного зв’язку, і ізолюючи білки сигналізації від конкуруючих білків. Azzi і співавтори [220] продемонстрували, що ліганди зазвичай в загальному класифіковані як зворотні агоністи, можливо, регулюють залучення скафолд протеїнів, у передачу сигналів рецепторів. Ці автори знайшли що β₂AR ліганди подібні до ICI118551 і propranolol, які є зворотними агоністами для Gs-

стимульованої аденілатциклази, індукують часткові відповіді агоніста mitogen-активованих протеїн кіназ через активацію скафолд протеїнів [220].

Дані деяких досліджень свідчать, що агоністи опіоїдних рецепторів викликають незалежну (“некласичну”) від G-білків модуляцію іонних каналів, взаємодіючи з різними видами опіоїдних рецепторів [13] [11] [14, 15]. Keren і співавтори [14] показали, що викликана опіоїдами потенціація кальцієвих каналів N-типу не є опосередкованою активацією ГТФ-зв’язаних білків G_1 і G_0 у клітинах нейробластоми людини SK-N-SH. Abdulla і співавтори [11] продемонстрували, що ноцицептин (з високою спорідненістю, 100 нмоль/л) пригнічує T-тип кальцієвих каналів через G-білок незалежний механізм, активуючи опіоїдні рецептори типу opioid-receptor-like (ORL1). Ця модуляція не змінювала кінетику струму і не залежала від прикладання тестуючого імпульсу. Подібно до цих спостережень, в наших експериментах, модуляція кальцієвих каналів P-типу DAMGO не була опосередкованою G-білками, не викликала жодних змін в кінетиці цього струму і залежала від прикладання тестуючого імпульсу. Нарешті, Twitchell та співавтори [13] знайшли, що DAMGO збільшує активність Ca^{2+} -залежного K^+ струму через механізм, який є незалежним від G-білків, протеїнкіназ, або протеїнофосфатаз. В цілому, велика частина даних ясно вказує, що є альтернативний механізм, яким опіоїди можуть регулювати діяльність іонних каналів незалежно від G-білків, або процесів залежних від фосфорилування. Цей молекулярний механізм ще дуже мало досліджений і він потребує подальшого вивчення. Можливо, що опіоїдні рецептори можуть модулювати кальцієвий струм через зв’язок з скафолд протеїни шляхом Na^+/H^+ обміну [221] або через прямі білок-білок взаємодії так само як метаботропні глутаматні рецептори підтипу 1 (mGluR1) модулюють кальцієві канали [222]. Ми також не виключаємо, що агоністи опіоїдних рецепторів безпосередньо взаємодіють з модулюючим сайтом в межах P-каналу.

Опіоїди регулюють діяльність різних видів протеїнкіназ, як наприклад протеїнкіназу С (PKC), цАМР залежну протеїнкіназу А (PKA), кальцій/кальмодулінзалежну протеїнкіназу II (CaMKII) і протеїнкіназу G (PKG) [193, 194]. Активація PKA або PKC може полегшити діяльність кальцієвих каналів Р-типу. У проведених нами експериментах, з використанням неспецифічних блокаторів кіназ H7, H89, також не було виявлено ніякої участі PKA та PKC у механізмі збільшення амплітуди Р-струма під дією DAMGO. цАМФ є вторинним месенджером, який приймає участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу та необхідний для реалізації дії багатьох гідрофільних гормонів, таких як глюкагон і адреналін, які не можуть проходити через плазматичну мембрану, нейромедіаторів та інших первинних посередників. Він також бере участь в активації протеїнкіназ. Крім того, цАМФ зв'язується і регулює функцію іонних каналів. Опіоїдні рецептори, як і інші G_i/G_o -спряжені рецептори, здатні пригнічувати аденілатциклазу, що призводить до зниження внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. У первинних сенсорних нейронах цАМФ регулює роботу катіонних каналів, що активуються гіперполяризацією (I_h). Знижуючи рівень цАМФ в клітині, опіоїди ефективно пригнічують I_h , послаблюючи пейсмейкерну активність та зменшуючи частоту потенціалів дії. У такий спосіб опіоїди скорочують потік ноціцептивної інформації до центральної нервової системи. Після припинення обробки клітин опіоїдами рівень цАМФ в нейронах зростає і за рахунок підвищення активності PKA збільшується викид нейромедіаторів [195, 223]. У цих умовах, супресія активності аденілатциклази опіоїдами має призвести до послаблення вказаного вище вивільнення, викликаного активацією PKA. цАМФ є універсальним регулятором активності кальцієвих каналів, проте у наших експериментах його присутність у внутрішньоклітинному розчині не впливала на ефект DAMGO (інтенсивність позитивної модуляції кальцієвих Р-струмів).

Серед внутрішньоклітинних агентів, які можуть змінювати активність кальцієвих каналів, перш за все потрібно виділити самі іони Ca^{2+} , котрі здатні як безпосередньо впливати на мембранні канали [224], так і активувати різні кальцій-залежні білки [158]. Щоб перевірити чи іони Ca^{2+} впливають на описану модуляцію, ми провели експерименти, (використовуваного в більшості експериментів). Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO, селективного агоністу μ -опіоїдних рецепторів, в концентрації 10 нМ за умов використання іонів Ca^{2+} як носія Р-струму, замість Ba^{2+} , спричиняла таке ж саме збільшення амплітуди Р-струму, як і в наших попередніх експериментах, коли основним проникаючим катіоном були іони Ba^{2+} . DAMGO також не впливав на кінетику активації та інактивації Р-струму і був повністю зворотнім після відмивання від агоністу. Таким чином, вхід іонів кальцію не впливає на модуляцію опіоїдами Р-струму.

Як відомо, кальмодулін (CaM) є одним з внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів [190, 191]. більшість взаємодій CaM з білками є Ca^{2+} -залежними [225], але також відомі також Ca^{2+} -незалежні шляхи активації кальмодуліна [225]. Зокрема, було встановлено, що при відсутності Ca^{2+} , кальмодулін зв'язується з IP3 рецепторами мозочка щурів і інгібує IP3- зв'язування та мобілізацію кальцію (ссилка). Він забезпечує Ca^{2+} -залежну регуляцію багаточисельних внутрішньоклітинних ферментів та може змінювати активність кальцієвих каналів. Встановлено, що CaM конкурує з G-білком за зв'язування з третьою внутрішньоклітинною петлею MOR. Ця речовина крім зворотнього зв'язування з CaM також пригнічує активацію різних CaM-залежних ферментів таких, як Ca^{2+} /CaM-залежна протеїнкінази II (CaMKII) [226], кальційнейрин (Ca^{2+} /CaM-залежної протеїнфосфатази), аденілатциклаза, та інш. Ці ферменти можуть бути залучені в нейрональні процеси шляхом фосфорилування та дефосфорилування специфічних білків.

При аплікації агоніста МОР СаМ вивільняється у внутріклітинний примембранний простір і може взаємодіяти з центрами зв'язування розташованими на інших мембранних структурах. Було показано, що кальцієві канали Р-тіпа так само мають центр зв'язування з СаМ який розташований на С-теміналі. Взаємодія СаМ з цим центром зв'язування може викликати збільшення амплітуди Р-струму. Для встановлення можливої участі кальмодуліну у модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами МОР рецепторів, нами було проведено серію дослідів з використанням антагоністу кальмодулін-регульованих ензимів кальмідазолу (CMZ).

Відповідно до наших попередніх даних [192] зовнішньоклітинна аплікація CMZ у концентрації 0,5 мкМ викликала часткове пригнічення амплітуди кальцієвого струму Р-типу. Збільшення концентрації CMZ до 1 мкМ призводило до практично повного пригнічення струму протягом декількох хвилин. У наступній серії експериментів нами було досліджено можливий вплив CMZ на ефект посилення струму під дією 10 нМ DAMGO. Прикладання 0,5 мкМ CMZ, призводило до двократного зменшення амплітуди струму у порівнянні з контрольними значеннями. Подальше прикладання DAMGO на фоні CMZ спричиняло статистично достовірне збільшення амплітуди струму на $5 \pm 0,6\%$. Таким чином, CMZ суттєво зменшував величину досліджуваного ефекту, проте на відміну від модуляції, що викликана гіперфорином [192] повністю її не усував. Отже, модуляція Р-каналів агоністами МОР може бути залежною від кальмодулін-регульованих ензимів. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації EGTA до 10 мМ ніяк не вплинуло на ефект CMZ, що вказує на його незалежність від Ca^{2+} /СаМКП залежних кіназ та фосфатаз. Відомо, що кальмідазол самі по собі викликає пригнічення активності кальцієвих каналів [192, 227], що так само не є опосередкованим Ca^{2+} /СаМКП-залежними шляхами. Навпаки, показано, що кальмідазол прямо взаємодіє з кальцієвим каналом гладеньких м'язів [227]. Вищенаведене вказує на те, що

на кальцієвому каналі існує високоафінний алостеричний сайт зв'язування для агоністів MOR, який з більш низькою афінністю взаємодіє з кальмідазолом.

4.5. Можливі молекулярні механізми неklasичного ефекту модуляції кальцієвих каналів R-типу опіоїдами.

Отже, наші дані вказують на здатність агоністів опіоїдних рецепторів викликати двосторонні ефекти на кальцієві канали R-типу: потенціацію шляхом взаємодії з MOR та інгібування шляхом активації KOR та DOR, або безпосередньо через взаємодію із R-каналами [186]. Експерименти з неспецифічним агоністом опіоїдних рецепторів морфіном також свідчать про здатність опіоїдів взаємодіяти одночасно з μ - та іншими-опіоїдними рецепторами в тій самій клітині, що приводить до виникнення конкуруючих ефектів на кальцієві канали R-типу.

Разом, опіоїди викликають двосторонні ефекти на кальцієві канали R-типу: блокування через G-білок опосередкований шлях, який активується μ -опіоїдними рецепторами або через безпосередній вплив на R-канали [186] та потенціацію струму G-білок незалежним шляхом, який залучає взаємодію з високоафінним зв'язуючим сайтом, схожим на μ -опіоїдний рецептор.

Таким чином, усі отримані нами данні свідчать про те, що існує є альтернативний механізм, яким опіоїди можуть регулювати активність іонних каналів незалежно від G-протеїнів, або процесів залежних від фосфорилування. Так, останнім часом збільшується число робіт, які вказують на новий, G-білок-незалежний механізм, завдяки якому GPCR можуть ініціювати біохімічні сигнали і модулювати нейрональну збудливість активуючи системи трансдукції в яких залучені скафолд протеїни [218, 219]. У нашому випадку, можливо, що MOR модулюють R-струм через зв'язок зі скафолд протеїнами, які можуть безпосередньо опосередковувати рецепторну сигналізацію, або фізично пов'язувати

рецептор з різноманітними ефекторними системами через PDZ домени [228], аналогічно до того, як КОР стимулюють Na^+/H^+ обмін [221]. Проте, найбільш імовірним є те, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами МОР задіяний високоафінний центр зв'язування розташований на самому каналі, і опіоїди виступають високоафінними алостеричними модуляторами цього каналу.

В результаті проведених досліджень показано існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів опіоїдами. Результати дисертаційної роботи насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки отримані принципово нові дані про модулюючу дію агоністів опіоїдних рецепторів на високопороговий кальцієвий струм Р-типу. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, що здійснюють регуляцію високопорогових кальцієвих каналів, а також для пошуку нових шляхів спрямованого фармакологічного впливу на них. Характерна модуляція опіоїдами кальцієвих каналів може виявитись зручним фармакологічним інструментом для специфічної регуляції мозкової діяльності.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати власного дослідження впливу ендогенних та екзогенних опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, та окреслені можливі механізми, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми.

1. Методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” визначено, що агоністи опіоїдних рецепторів викликають зміни амплітуди кальцієвого струму Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів. Неселективні агоністи опіоїдних рецепторів викликають різнобічні ефекти на кальцієві канали Р-типу: фасилітацію та пригнічення внаслідок їх дії на різні типи опіоїдних рецепторів.
2. В роботі вперше досліджено ефект фасилітації кальцієвого струму Р-типу, який спричиняють селективні агоністи μ -опіоїдних рецепторів. Концентрація половинного ефекту для DAMGO становить лише 1.7 нМ що відповідає величині афінності центра зв’язування класичного μ -опіоїдного рецептора. Фасилітація кальцієвого струму Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів має виражену залежність від потенціалу.
3. DAMGO, ендоморфін і налоксон модулюють Р-струм через взаємодію з одним і тим самим високоафінним центром зв’язування, який має фармакологічні властивості подібні до μ -опіоїдного рецептора.
4. На відміну від класичної негативної модуляції кальцієвих каналів μ -опіоїдними рецепторами, досліджуваний ефект фасилітації струмів Р-типу не є опосередкованим гетеротримерними G-білками. Окрім того, цей ефект не залежить від активності PKA, PKC, цАМФ, кальмодуліну та концентрації внакрішньоклітинного кальцію.

5. Механізм модуляції кальцієвих каналів Р-типу під дією DAMGO повністю відрізняється від “класичного” G-білок опосередкованого механізму. Альтернативним механізмом, яким опіоїди можуть регулювати діяльність іонних каналів незалежно від G-білків, або процесів залежних від фосфорилування може бути модуляція через зв’язок зі скафолд протеїнами або безпосередня взаємодія MOR з кальцієвим каналом. Також, цілком можливо, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR задіяний високоафінний центр зв’язування розташований на самому каналі, і опіоїди виступають високоафінними алостеричними модуляторами цього каналу.

СПИСОК ВИОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Calcium ions in nerve cell function. Oxford neuroscience series. / Kostyuk P. – Oxford: Oxford University Press, 1992. – Т. 1: Oxford neuroscience series.
2. Rasmussen H., Barrett P. Q. Calcium messenger system: an integrated view // *Physiol Rev.* – 1984. – Т. 64, № 3. – С. 938-84.
3. Kawai T., Watanabe M. Effects of ryanodine on the spike after-hyperpolarization in sympathetic neurones of the rat superior cervical ganglion // *Pflugers Arch.* – 1989. – Т. 413, № 5. – С. 470-5.
4. Kostyuk P. G., Krishtal O. A. Effects of calcium and calcium-chelating agents on the inward currents in the membrane of mollusc neurons // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1977. – Т. 270. – С. 569-580.
5. Kostyuk P. G., Shuba Ya M., Savchenko A. N. Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons // *Pflugers Arch.* – 1988. – Т. 411, № 6. – С. 661-9.
6. Smith S. J., Augustine G. J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release // *Trends Neurosci.* – 1988. – Т. 11, № 10. – С. 458-64.
7. Konnerth A., Dreessen J., Augustine G. J. Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – Т. 89, № 15. – С. 7051-5.
8. Miyamoto T., Okada Y. NMDA receptor, protein kinase C and calmodulin system participate in the long-term potentiation in guinea pig superior colliculus slices // *Brain Res.* – 1993. – Т. 605, № 2. – С. 287-92.
9. Wu L. G., Westenbroek R. E., Borst J. G., Catterall W. A., Sakmann B. Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses // *J Neurosci.* – 1999. – Т. 19, № 2. – С. 726-36.

10. Kim C. J., Rhee J. S., Akaike N. Modulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels in the rat periaqueductal gray neurons by mu-type opioid agonist // J Neurophysiol. – 1997. – T. 77, № 3. – C. 1418-24.
11. Abdulla F. A., Smith P. A. Nociceptin inhibits T-type Ca^{2+} channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism // J Neurosci. – 1997. – T. 17, № 22. – C. 8721-8.
12. Carabelli V., Carra I., Carbone E. Localized secretion of ATP and opioids revealed through single Ca^{2+} channel modulation in bovine chromaffin cells // Neuron. – 1998. – T. 20, № 6. – C. 1255-68.
13. Twitchell W. A., Rane S. G. Nucleotide-independent modulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} channel current by a mu-type opioid receptor // Mol Pharmacol. – 1994. – T. 46, № 5. – C. 793-8.
14. Keren O., Gafni M., Sarne Y. Opioids potentiate transmitter release from SK-N-SH human neuroblastoma cells by modulating N-type calcium channels // Brain Res. – 1997. – T. 764, № 1-2. – C. 277-82.
15. Keren O., Gafni M., Sarne Y. Potentiation of transmitter release from NMB human neuroblastoma cells by kappa-opioids is mediated by N-type voltage-dependent calcium channels // Brain Res. – 1999. – T. 843, № 1-2. – C. 193-8.
16. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // J Physiol. – 1952. – T. 117, № 4. – C. 500-44.
17. Fatt P., Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres // J Physiol. – 1953. – T. 120, № 1-2. – C. 171-204.
18. Fatt P., Ginsborg B. L. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres // J Physiol. – 1958. – T. 142, № 3. – C. 516-43.
19. Hagiwara S., Naka K. I. The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca^{2+} // J. Gen. Physiol. – 1964. – T. 48. – C. 141-162.

20. Hagiwara S., Nakajima S. Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle // J Gen Physiol. – 1966. – T. 49, № 4. – C. 807-18.
21. Hagiwara S., Ozawa S., Sand O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish // J Gen Physiol. – 1975. – T. 65, № 5. – C. 617-44.
22. Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration // J Physiol. – 1967. – T. 192, № 2. – C. 479-92.
23. Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes // Prog Biophys Mol Biol. – 1973. – T. 26. – C. 1-43.
24. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Doroshenko P. A. Calcium currents in snail neurones. I. Identification of calcium current // Pflugers Arch. – 1974. – T. 348, № 2. – C. 83-93.
25. Trautwein W., McDonald T. F., Tripathi O. Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle // Pflugers Arch. – 1975. – T. 354, № 1. – C. 55-74.
26. Brown H. F., McNaughton P. A., Noble D., Noble S. J. Adrenergic control of cardiac pacemaker currents // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 1975. – T. 270, № 908. – C. 527-37.
27. Cedar H., Kandel E. R., Schwartz J. H. Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. I. Increased synthesis in response to synaptic stimulation // J Gen Physiol. – 1972. – T. 60, № 5. – C. 558-69.
28. Reuter H. Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle // J Physiol. – 1974. – T. 242, № 2. – C. 429-51.
29. Tsien R. W., Giles W., Greengard P. Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac purkinje fibres // Nat New Biol. – 1972. – T. 240, № 101. – C. 181-3.

30. Tsien R. W. Adrenaline-like effects of intracellular iontophoresis of cyclic AMP in cardiac Purkinje fibres // *Nat New Biol.* – 1973. – T. 245, № 143. – C. 120-2.
31. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I. Intracellular perfusion // *J Neurosci Methods.* – 1981. – T. 4, № 3. – C. 201-10.
32. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // *Nature.* – 1975. – T. 257, № 5528. – C. 691-3.
33. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Shakhovalev Y. A. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones // *J Physiol.* – 1977. – T. 270, № 3. – C. 545-68.
34. Fedulova S. A., Kostyuk P. G., Veselovsky N. S. Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP // *Brain Res.* – 1981. – T. 214, № 1. – C. 210-4.
35. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I. Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurones // *J Physiol.* – 1981. – T. 310. – C. 403-21.
36. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres // *Nature.* – 1976. – T. 260, № 5554. – C. 799-802.
37. Hosey M. M., Chang F. C., O'Callahan C. M., Ptasienski J. L-type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. Purification and phosphorylation // *Ann N Y Acad Sci.* – 1989. – T. 560. – C. 27-38.
38. Birnbaumer L., Campbell K. P., Catterall W. A., Harpold M. M., Hofmann F., Horne W. A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., et al. The naming of voltage-gated calcium channels // *Neuron.* – 1994. – T. 13, № 3. – C. 505-6.
39. Stea A., Soong T. W., Snutch T. P. The voltage-gated calcium channels // *Handbook of Receptors and Channels; Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels* / North R. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1995. – C. 113-152.
40. Perez-Reyes E., Cribbs L. L., Daud A., Lacerda A. E., Barclay J., Williamson M. P., Fox M., Rees M., Lee J. H. Molecular characterization of a neuronal low-

voltage-activated T-type calcium channel // *Nature*. – 1998. – T. 391, № 6670. – C. 896-900.

41. Catterall W. A., Seagar M. J., Takahashi M., Nunoki K. Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels // *Annals of New York Academy of Sciences*. – 1989. – T. 560. – C. 1-14.

42. Tang S., Mikala G., Bahinski A., Yatani A., Varadi G., Schwartz A. Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel // *J.Biol.Chem.* – 1993. – T. 268, № 18. – C. 13026-13029.

43. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. – T. 3, № 8.

44. Dolphin A. C. The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G-proteins // *Exp Physiol.* – 1995. – T. 80, № 1. – C. 1-36.

45. Carbone E., Lux H. D. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons // *Biophys J.* – 1984. – T. 46, № 3. – C. 413-8.

46. Fedulova S. A., Kostyuk P. G., Veselovsky N. S. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones // *J Physiol.* – 1985. – T. 359. – C. 431-46.

47. Веселовский Н. С., Федулова С. А. Два типа кальциевых каналов с соматической мембране нейронов спинальных ганглиев крыс // *ДАН СССР*. – 1983. – Т. 268. – С. 747-750.

48. Nowycky M. C., Fox A. P., Tsien R. W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity // *Nature*. – 1985. – T. 316, № 6027. – C. 440-3.

49. Olivera B. M., Gray W. R., Zeikus R., McIntosh J. M., Varga J., Rivier J., de Santos V., Cruz L. J. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails // *Science*. – 1985. – T. 230, № 4732. – C. 1338-43.

50. Aosaki T., Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to

- dihydropyridines and w-conotoxin GVIA // *Pflugers Arch.* – 1989. – T. 414, № 2. – C. 150-156.
51. Ferroni A., Mancinelli E., Camagni S., Wanke E. Two high voltage-activated calcium currents are present in isolation in adult rat spinal neurons // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1989. – T. 159, № 2. – C. 379-84.
52. Llinas R., Sugimori M., Lin J. W., Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – T. 86, № 5. – C. 1689-93.
53. Lee K. S., Tsien R. W. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells // *Nature.* – 1983. – T. 302, № 5911. – C. 790-4.
54. Randall A., Tsien R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons // *J Neurosci.* – 1995. – T. 15, № 4. – C. 2995-3012.
55. Varadi G., Mori Y., Mikala G., Schwartz A. Molecular determinants of Ca^{2+} channel function and drug action // *Trends Pharmacol Sci.* – 1995. – T. 16, № 2. – C. 43-9.
56. Wheeler D. B., Randall A., Tsien R. W. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission // *Science.* – 1994. – T. 264, № 5155. – C. 107-11.
57. Kostyuk P. G. Calcium channels in the neuronal membrane // *Biochim Biophys Acta.* – 1981. – T. 650, № 2-3. – C. 128-50.
58. Reuter H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain // *Curr Opin Neurobiol.* – 1996. – T. 6, № 3. – C. 331-7.
59. Snutch T. P., Reiner P. B. Ca^{2+} channels: diversity of form and function // *Curr Opin Neurobiol.* – 1992. – T. 2, № 3. – C. 247-53.
60. Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W.,

- Catterall W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels // *Neuron*. – 2000. – T. 25, № 3. – C. 533-5.
61. Tsien R. W., Ellinor P. T., Horne W. A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels // *Trends Pharmacol Sci*. – 1991. – T. 12, № 9. – C. 349-54.
62. Albillos A., Artalejo A. R., Lopez M. G., Gandia L., Garcia A. G., Carbone E. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells // *J Physiol*. – 1994. – T. 477, № Pt 2. – C. 197-213.
63. Bossu J. L., Feltz A., Thomann J. M. Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones // *Pflugers Arch*. – 1985. – T. 403, № 4. – C. 360-8.
64. Fenwick E. M., Marty A., Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells // *J Physiol*. – 1982. – T. 331. – C. 599-635.
65. Carbone E., Lux H. D. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones // *J Physiol*. – 1987. – T. 386. – C. 547-570.
66. Matteson D. R., Armstrong C. M. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells // *J Gen Physiol*. – 1986. – T. 87, № 1. – C. 161-82.
67. Lux H. D., Carbone E., Zucker H. Na^+ currents through low-voltage-activated Ca^{2+} channels of chick sensory neurones: block by external Ca^{2+} and Mg^{2+} // *J Physiol*. – 1990. – T. 430. – C. 159-188.
68. Fox A. P., Nowycky M. C., Tsien R. W. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones // *J Physiol*. – 1987. – T. 394. – C. 149-72.
69. Bean B. P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology // *J Gen Physiol*. – 1985. – T. 86, № 1. – C. 1-30.
70. Carbone E., Lux H. D. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones // *J Physiol*. – 1987. – T. 386. – C. 571-601.

71. Narahashi T., Tsunoo A., Yoshii M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells // *J Physiol.* – 1987. – T. 383. – C. 231-49.
72. Akaike N., Kostyuk P. G., Osipchuk Y. V. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones // *J Physiol.* – 1989. – T. 412. – C. 181-95.
73. Tang C. M., Presser F., Morad M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel // *Science.* – 1988. – T. 240, № 4849. – C. 213-5.
74. Yaari Y., Hamon B., Lux H. D. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons // *Science.* – 1987. – T. 235, № 4789. – C. 680-2.
75. Carbone E., Swandulla D. Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation // *Prog Biophys Mol Biol.* – 1989. – T. 54, № 1. – C. 31-58.
76. Bean B. P. Classes of calcium channels in vertebrate cells // *Annu Rev Physiol.* – 1989. – T. 51. – C. 367-84.
77. Lopez M. G., Villarroja M., Lara B., Martinez Sierra R., Albillos A., Garcia A. G., Gandia L. Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells // *FEBS Lett.* – 1994. – T. 349, № 3. – C. 331-7.
78. Plant T. D. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells // *J Physiol.* – 1988. – T. 404. – C. 731-47.
79. Madison D. V., Nicoll R. A. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro // *J Physiol.* – 1984. – T. 354. – C. 319-31.
80. Platzer J., Engel J., Schrott-Fischer A., Stephan K., Bova S., Chen H., Zheng H., Striessnig J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels // *Cell.* – 2000. – T. 102, № 1. – C. 89-97.
81. Bech-Hansen N. T., Naylor M. J., Maybaum T. A., Pearce W. G., Koop B., Fishman G. A., Mets M., Musarella M. A., Boycott K. M. Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness // *Nat Genet.* – 1998. – T. 19, № 3. – C. 264-7.

82. Striessnig J., Bolz H. J., Koschak A. Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca^{2+} channels // *Pflügers Arch.* – 2010. – T. 460, № 2. – С. 361-74.
83. Swandulla D., Armstrong C. M. Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons // *J Gen Physiol.* – 1988. – T. 92, № 2. – С. 197-218.
84. Eckert R., Tillotson D. L. Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in caesium-loaded giant neurones of *Aplysia californica* // *J Physiol.* – 1981. – T. 314. – С. 265-80.
85. Eckert R., Chad J. E. Inactivation of Ca channels // *Prog Biophys Mol Biol.* – 1984. – T. 44, № 3. – С. 215-67.
86. Tillotson D. Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1979. – T. 76, № 3. – С. 1497-500.
87. Durroux T., Gallo-Payet N., Payet M. D. Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland // *J Physiol.* – 1988. – T. 404. – С. 713-29.
88. Крышталь О. А. Блокирующее действие ионов кадмия на кальциевый входящий ток в мембране нервной клетки // *ДАН СССР.* – 1976. – Т. 321. – С. 1003-1005.
89. Пономарёв В. Н., Нарушевичус Э. В., Чемерис Н. К. Блокирующее действие ионов Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} на величину входящего тока через кальциевые каналы нейронов прудовика // *Нейрофизиология.* – 1980. – Т. 12. – С. 297-302.
90. Hirning L. D., Fox A. P., McCleskey E. W., Olivera B. M., Thayer S. A., Miller R. J., Tsien R. W. Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons // *Science.* – 1988. – T. 239, № 4835. – С. 57-61.
91. Regan L. J., Sah D. W., Bean B. P. Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin // *Neuron.* – 1991. – T. 6, № 2. – С. 269-280.

92. Carbone E., Sher E., Clementi F. Ca currents in human neuroblastoma IMR32 cells: kinetics, permeability and pharmacology // *Pflugers Arch.* – 1990. – T. 416, № 1-2. – C. 170-9.
93. Dupont J. L., Bossu J. L., Feltz A. Effect of internal calcium concentration on calcium currents in rat sensory neurones // *Pflugers Arch.* – 1986. – T. 406, № 4. – C. 433-5.
94. Codignola A., Tarroni P., Clementi F., Pollo A., Lovallo M., Carbone E., Sher E. Calcium channel subtypes controlling serotonin release from human small cell lung carcinoma cell lines // *J Biol Chem.* – 1993. – T. 268, № 35. – C. 26240-7.
95. Pollo A., Lovallo M., Biancardi E., Sher E., Socci C., Carbone E. Sensitivity to dihydropyridines, w-conotoxin and noradrenaline reveals multiple high-voltage-activated Ca^{2+} channels in rat insulinoma and human pancreatic beta-cells // *Pflugers Arch.* – 1993. – T. 423, № 5-6. – C. 462-471.
96. Wanke E., Ferroni A., Malgaroli A., Ambrosini A., Pozzan T., Meldolesi J. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1987. – T. 84, № 12. – C. 4313-7.
97. Williams M. E., Brust P. F., Feldman D. H., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue A. F., Velicelebi G., Ellis S. B., Harpold M. M. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel // *Science.* – 1992. – T. 257, № 5068. – C. 389-95.
98. Fox A. P., Nowycky M. C., Tsien R. W. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones // *J Physiol.* – 1987. – T. 394. – C. 173-200.
99. Plummer M. R., Logothetis D. E., Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons // *Neuron.* – 1989. – T. 2, № 5. – C. 1453-63.
100. Plummer M. R., Hess P. Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels // *Nature.* – 1991. – T. 351, № 6328. – C. 657-9.

101. Delcour A. H., Lipscombe D., Tsien R. W. Multiple modes of N-type calcium channel activity distinguished by differences in gating kinetics // *J Neurosci.* – 1993. – T. 13, № 1. – C. 181-94.
102. McCleskey E. W., Fox A. P., Feldman D. H., Cruz L. J., Olivera B. M., Tsien R. W., Yoshikami D. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1987. – T. 84, № 12. – C. 4327-4331.
103. Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K. R., Fox A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation // *Trends Neurosci.* – 1988. – T. 11, № 10. – C. 431-438.
104. Mintz I. M., Adams M. E., Bean B. P. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons // *Neuron.* – 1992. – T. 9, № 1. – C. 85-95.
105. Sullivan J. M., Lasater E. M. Sustained and transient calcium currents in horizontal cells of the white bass retina // *J Gen Physiol.* – 1992. – T. 99, № 1. – C. 85-107.
106. Mintz I. M., Venema V. J., Swiderek K. M., Lee T. D., Bean B. P., Adams M. E. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA // *Nature.* – 1992. – T. 355, № 6363. – C. 827-829.
107. Uchitel O. D., Protti D. A., Sanchez V., Cherksey B. D., Sugimori M., Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – T. 89, № 8. – C. 3330-3.
108. Bindokas V. P., Adams M. E. omega-Aga-I: a presynaptic calcium channel antagonist from venom of the funnel web spider, *Agelenopsis aperta* // *J Neurobiol.* – 1989. – T. 20, № 4. – C. 171-88.
109. Wakamori M., Yamazaki K., Matsunodaira H., Teramoto T., Tanaka I., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., Sekiguchi N., Mori E., Mori Y., Imoto K. Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 52. – C. 34857-67.

110. Regan L. J. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis // *J Neurosci.* – 1991. – T. 11, № 7. – C. 2259-69.
111. Usowicz M. M., Sugimori M., Cherksey B., Llinas R. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells // *Neuron.* – 1992. – T. 9, № 6. – C. 1185-99.
112. Sather W. A., Tanabe T., Zhang J. F., Mori Y., Adams M. E., Tsien R. W. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunits // *Neuron.* – 1993. – T. 11, № 2. – C. 291-303.
113. Zhang J. F., Randall A. D., Ellinor P. T., Horne W. A., Sather W. A., Tanabe T., Schwarz T. L., Tsien R. W. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons // *Neuropharmacology.* – 1993. – T. 32, № 11. – C. 1075-1088.
114. Ellinor P. T., Zhang J. F., Randall A. D., Zhou M., Schwarz T. L., Tsien R. W., Horne W. A. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel // *Nature.* – 1993. – T. 363, № 6428. – C. 455-8.
115. Toro-Castillo C., Thapliyal A., Gonzalez-Ochoa H., Adams B. A., Meza U. Muscarinic modulation of Cav2.3 (R-type) calcium channels is antagonized by RGS3 and RGS3T // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – T. 292, № 1. – C. C573-80.
116. Randall A. D., Tsien R. W. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels // *Neuropharmacology.* – 1997. – T. 36, № 7. – C. 879-93.
117. Williams M. E., Marubio L. M., Deal C. R., Hans M., Brust P. F., Philipson L. H., Miller R. J., Johnson E. C., Harpold M. M., Ellis S. B. Structure and functional characterization of neuronal α_{1E} calcium channel subtypes // *J Biol Chem.* – 1994. – T. 269, № 35. – C. 22347-22357.
118. Schneider T., Wei X., Olcese R., Costantin J. L., Neely A., Palade P., Perez-Reyes E., Qin N., Zhou J., Crawford G. D., et al. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca^{2+} channel α_1 subunit // *Recept Channels.* – 1994. – T. 2, № 4. – C. 255-70.

119. Soong T. W., Stea A., Hodson C. D., Dubel S. J., Vincent S. R., Snutch T. P. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family // *Science*. – 1993. – T. 260, № 5111. – C. 1133-6.
120. Elliott E. M., Malouf A. T., Catterall W. A. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons // *J Neurosci*. – 1995. – T. 15, № 10. – C. 6433-44.
121. Hell J. W., Westenbroek R. E., Breeze L. J., Wang K. K., Chavkin C., Catterall W. A. N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – T. 93, № 8. – C. 3362-7.
122. Day N. C., Shaw P. J., McCormack A. L., Craig P. J., Smith W., Beattie R., Williams T. L., Ellis S. B., Ince P. G., Harpold M. M., Lodge D., Volsen S. G. Distribution of α_{1A} , α_{1B} and α_{1E} voltage-dependent calcium channel subunits in the human hippocampus and parahippocampal gyrus // *Neuroscience*. – 1996. – T. 71, № 4. – C. 1013-1024.
123. Volsen S. G., Day N. C., McCormack A. L., Smith W., Craig P. J., Beattie R., Ince P. G., Shaw P. J., Ellis S. B., Gillespie A., et al. The expression of neuronal voltage-dependent calcium channels in human cerebellum // *Brain Res Mol Brain Res*. – 1995. – T. 34, № 2. – C. 271-82.
124. Soliakov L., Wonnacott S. Voltage-sensitive Ca^{2+} channels involved in nicotinic receptor-mediated $^{[3H]}$ dopamine release from rat striatal synaptosomes // *J Neurochem*. – 1996. – T. 67, № 1. – C. 163-70.
125. Waterman S. A. Multiple subtypes of voltage-gated calcium channel mediate transmitter release from parasympathetic neurons in the mouse bladder // *J Neurosci*. – 1996. – T. 16, № 13. – C. 4155-61.
126. Ikeda S. R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits // *Nature*. – 1996. – T. 380, № 6571. – C. 255-258.
127. Martin-Moutot N., Charvin N., Leveque C., Sato K., Nishiki T., Kozaki S., Takahashi M., Seagar M. Interaction of SNARE complexes with P/Q-type

- calcium channels in rat cerebellar synaptosomes // *J Biol Chem.* – 1996. – T. 271, № 12. – C. 6567-70.
128. Hagiwara S., Byerly L. Calcium channel // *Annu Rev Neurosci.* – 1981. – T. 4. – C. 69-125.
129. Crunelli V., Lightowler S., Pollard C. E. A T-type Ca^{2+} current underlies low-threshold Ca^{2+} potentials in cells of the cat and rat lateral geniculate nucleus // *J Physiol.* – 1989. – T. 413. – C. 543-61.
130. Boland L. M., Dingledine R. Multiple components of both transient and sustained barium currents in a rat dorsal root ganglion cell line // *J Physiol (Lond).* – 1990. – T. 420:223-45. – C. 223-245.
131. Huguenard J. R. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons // *Annu Rev Physiol.* – 1996. – T. 58. – C. 329-48.
132. Kostyuk P. G. Low-voltage activated calcium channels: achievements and problems // *Neuroscience.* – 1999. – T. 92, № 4. – C. 1157-63.
133. Tarasenko A. N., Kostyuk P. G., Eremin A. V., Isaev D. S. Two types of low-voltage-activated Ca^{2+} channels in neurones of rat laterodorsal thalamic nucleus // *J Physiol.* – 1997. – T. 499 (Pt 1), № Pt 1. – C. 77-86.
134. Zhuravleva S. O., Kostyuk P. G., Shuba Y. M. Divalent cation selectivity of the subtypes of low voltage-activated Ca^{2+} channels in thalamic neurons // *Neuroreport.* – 1999. – T. 10, № 3. – C. 651-7.
135. Byerly L., Chase P. B., Stimers J. R. Permeation and interaction of divalent cations in calcium channels of snail neurons // *J Gen Physiol.* – 1985. – T. 85, № 4. – C. 491-518.
136. Lansman J. B., Hess P., Tsien R. W. Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore // *J Gen Physiol.* – 1986. – T. 88, № 3. – C. 321-347.
137. Carbone E., Clementi F., Formenti A., Pollo A., Sher E. Action of Ca^{2+} agonists/antagonists in mammalian peripheral neurons // *Cell Biol Int Rep.* – 1989. – T. 13, № 12. – C. 1155-64.

138. Glossmann H., Ferry D. R., Boschek C. B. Purification of the putative calcium channel from skeletal muscle with the aid of [3H]-nimodipine binding // *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* – 1983. – T. 323, № 1. – C. 1-11.
139. Borsotto M., Barhanin J., Norman R. I., Lazdunski M. Purification of the dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from skeletal muscle transverse tubules using (+) [3H]PN 200-110 // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1984. – T. 122, № 3. – C. 1357-1366.
140. Curtis B. M., Catterall W. A. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules // *Biochemistry.* – 1984. – T. 23, № 10. – C. 2113-8.
141. Campbell K. P., Leung A. T., Sharp A. H. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel // *Trends Neurosci.* – 1988. – T. 11, № 10. – C. 425-30.
142. Ahljanian M. K., Westenbroek R. E., Catterall W. A. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina // *Neuron.* – 1990. – T. 4, № 6. – C. 819-32.
143. Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle // *Nature.* – 1987. – T. 328, № 6128. – C. 313-8.
144. Bean B. P. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – T. 81, № 20. – C. 6388-92.
145. Sanguinetti M. C., Krafte D. S., Kass R. S. Voltage-dependent modulation of Ca channel current in heart cells by Bay K8644 // *J Gen Physiol.* – 1986. – T. 88, № 3. – C. 369-92.
146. Rane S. G., Holz G. G. t., Dunlap K. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release // *Pflugers Arch.* – 1987. – T. 409, № 4-5. – C. 361-6.

147. Cohen C. J., McCarthy R. T. Nimodipine block of calcium channels in rat anterior pituitary cells // *J Physiol.* – 1987. – T. 387. – C. 195-225.
148. Reuter H., Porzig H., Kokubun S., Prod'hom B. 1,4-Dihydropyridines as tools in the study of Ca^{2+} channels. // *Trends Neurosci.* – 1985. – T. 8. – C. 396-400.
149. Brown A. M., Kunze D. L., Yatani A. The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels // *Nature.* – 1984. – T. 311, № 5986. – C. 570-2.
150. Kokubun S., Prod'hom B., Becker C., Porzig H., Reuter H. Studies on Ca channels in intact cardiac cells: voltage-dependent effects and cooperative interactions of dihydropyridine enantiomers // *Mol Pharmacol.* – 1986. – T. 30, № 6. – C. 571-84.
151. Gray W. R., Luque A., Olivera B. M., Barrett J., Cruz L. J. Peptide toxins from *Conus geographus* venom // *J Biol Chem.* – 1981. – T. 256, № 10. – C. 4734-40.
152. Gray W. R., Olivera B. M., Cruz L. J. Peptide toxins from venomous *Conus* snails // *Annu Rev Biochem.* – 1988. – T. 57. – C. 665-700.
153. Cruz L. J., Olivera B. M. Calcium channel antagonists. Omega-conotoxin defines a new high affinity site // *J Biol Chem.* – 1986. – T. 261, № 14. – C. 6230-3.
154. Olivera B. M., Rivier J., Clark C., Ramilo C. A., Corpuz G. P., Abogadie F. C., Mena E. E., Woodward S. R., Hillyard D. R., Cruz L. J. Diversity of *Conus* neuropeptides // *Science.* – 1990. – T. 249, № 4966. – C. 257-63.
155. Kerr L. M., Yoshikami D. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action // *Nature.* – 1984. – T. 308, № 5956. – C. 282-4.
156. Olivera B. M., McIntosh J. M., Cruz L. J., Luque F. A., Gray W. R. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom // *Biochemistry.* – 1984. – T. 23, № 22. – C. 5087-90.
157. Saccomano N. A., Ahlijanian M. K. Calcium channel toxins: tools to study channel structure and function // *Drug Development Reseach.* – 1994. – T. 33. – C. 319-343.

158. Romanin C., Grosswagen P., Schindler H. Calpastatin and nucleotides stabilize cardiac calcium channel activity in excised patches // *Pflugers Arch.* – 1991. – T. 418, № 1-2. – C. 86-92.
159. Erdemli G., Xu Y. Z., Krnjevic K. Potassium conductance causing hyperpolarization of CA1 hippocampal neurons during hypoxia // *J Neurophysiol.* – 1998. – T. 80, № 5. – C. 2378-90.
160. Osterrieder W., Brum G., Hescheler J., Trautwein W., Flockerzi V., Hofmann F. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current // *Nature.* – 1982. – T. 298, № 5874. – C. 576-578.
161. Brum G., Flockerzi V., Hofmann F., Osterrieder W., Trautwein W. Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes // *Pflugers Arch.* – 1983. – T. 398, № 2. – C. 147-154.
162. Trautwein W., Cavalie A., Flockerzi V., Hofmann F., Pelzer D. Modulation of calcium channel function by phosphorylation in guinea pig ventricular cells and phospholipid bilayer membranes // *Circ Res.* – 1987. – T. 61, № 4 Pt 2. – C. 117-23.
163. Kostyuk P. G., Lukyanetz E. A., Doroshenko P. A. Effects of serotonin and cAMP on calcium currents in different neurones of *Helix pomatia* // *Pflugers Arch.* – 1992. – T. 420, № 1. – C. 9-15.
164. McCarron J. G., McGeown J. G., Reardon S., Ikebe M., Fay F. S., Walsh J. V., Jr. Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II // *Nature.* – 1992. – T. 357, № 6373. – C. 74-7.
165. Rane S. G., Dunlap K. Kinase C activator 1,2-oleoylacetyl-glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1986. – T. 83, № 1. – C. 184-8.
166. Harris K. M., Kongsamut S., Miller R. J. Protein kinase C mediated regulation of calcium channels in PC-12 pheochromocytoma cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1986. – T. 134, № 3. – C. 1298-305.

167. DeRiemer S. A., Strong J. A., Albert K. A., Greengard P., Kaczmarek L. K. Enhancement of calcium current in Aplysia neurones by phorbol ester and protein kinase C // *Nature*. – 1985. – T. 313, № 6000. – C. 313-6.
168. Fischmeister R., Hartzell H. C. Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle // *J Physiol*. – 1986. – T. 376. – C. 183-202.
169. Mironov S. L., Langohr K., Haller M., Richter D. W. Hypoxia activates ATP-dependent potassium channels in inspiratory neurones of neonatal mice // *J Physiol*. – 1998. – T. 509 (Pt 3). – C. 755-66.
170. Scott R. H., Dolphin A. C. The agonist effect of Bay K 8644 on neuronal calcium channel currents is promoted by G-protein activation // *Neurosci Lett*. – 1988. – T. 89, № 2. – C. 170-175.
171. Yatani A., Imoto Y., Codina J., Hamilton S. L., Brown A. M., Birnbaumer L. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s , also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist // *J Biol Chem*. – 1988. – T. 263, № 20. – C. 9887-9895.
172. Hamilton S. L., Codina J., Hawkes M. J., Yatani A., Sawada T., Strickland F. M., Froehner S. C., Spiegel A. M., Toro L., Stefani E., et al. Evidence for direct interaction of G_s alpha with the Ca^{2+} channel of skeletal muscle // *J Biol Chem*. – 1991. – T. 266, № 29. – C. 19528-35.
173. Kostyuk P. G., Martynyuk A. E., Pogorelaya N. Effects of intracellular administration of L-tyrosine and L-phenylalanine on voltage-operated calcium conductance in PC12 pheochromocytoma cells // *Brain Res*. – 1991. – T. 550, № 1. – C. 11-4.
174. Bosma M. M., Bernheim L., Leibowitz M. D., Pfaffinger P. J., Hille B. Modulation of M current in frog sympathetic ganglion cells // *Soc Gen Physiol Ser*. – 1990. – T. 45. – C. 43-59.

175. Chad J. E., Eckert R. An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed *Helix* neurones // J Physiol. – 1986. – T. 378. – C. 31-51.
176. Kostyuk P. G., Lukyanetz E. A. Mechanisms of antagonistic action of internal Ca^{2+} on serotonin-induced potentiation of Ca^{2+} currents in *Helix* neurones // Pflugers Arch. – 1993. – T. 424, № 1. – C. 73-83.
177. The Cerebellum as a Neuronal Machine. / Eccles J. C., Ito M., Szentagothai J. – Heidelberg: Springer, 1967. (Not in File)
178. Гиппокамп. Физиология и морфология. / Гамбарян Л. С., Коваль И. Н., 1973. (Not in File)
179. Disorders of the Cerebellum. / Gilman S., Bloedel J. R., Lechtenberg R. – Philadelphia: F A Davis Co, 1981. (Not in File)
180. Panchenko V. A., Krishtal O. A., Tegtmeier F., Tsyndrenko A. Y. R56865 as $\text{Ca}(2+)$ -channel blocker in Purkinje neurons of rat: comparison with flunarizine and nimodipine // Neuroscience. – 1993. – T. 54, № 3. – C. 587-594.
181. Vorobjev V. S. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue // J Neurosci Methods. – 1991. – T. 38, № 2-3. – C. 145-50.
182. Kostyuk P. G., Veselovsky N. S., Fedulova S. A. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents // Neuroscience. – 1981. – T. 6, № 12. – C. 2431-7.
183. Kostyuk P. G., Veselovsky N. S., Fedulova S. A., Tsyndrenko A. Y. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III. Potassium currents // Neuroscience. – 1981. – T. 6, № 12. – C. 2439-44.
184. Neher E., Sakmann B. The patch clamp technique // Sci Am. – 1992. – T. 266, № 3. – C. 44-51.
185. Robertson S. P., Johnson J. D., Potter J. D. The time-course of Ca^{2+} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+} // Biophys J. – 1981. – T. 34, № 3. – C. 559-69.
186. Kanemasa T., Asakura K., Ninomiya M. kappa-opioid agonist U50488 inhibits P-type Ca^{2+} channels by two mechanisms // Brain Res. – 1995. – T. 702, № 1-2. – C. 207-12.

187. Minami M., Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions // *Neurosci Res.* – 1995. – T. 23, № 2. – C. 121-45.
188. Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G. I., Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors // *Mol Pharmacol.* – 1994. – T. 45, № 2. – C. 330-4.
189. Liu J. G., Anand K. J. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence // *Brain Res Brain Res Rev.* – 2001. – T. 38, № 1-2. – C. 1-19.
190. Wang D., Sadee W., Quillan J. M. Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors // *J Biol Chem.* – 1999. – T. 274, № 31. – C. 22081-8.
191. Lee A., Wong S. T., Gallagher D., Li B., Storm D. R., Scheuer T., Catterall W. A. Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels // *Nature.* – 1999. – T. 399, № 6732. – C. 155-9.
192. Fisyunov A. I., Lozovaya N. A., Tsyntsadze T. S., Yatsenko N. M., Chatterjee S., Krishtal O. A. Modulating action of hyperforin on the P-type calcium channels in the membranes of rat cerebellar Purkinje neurons // *Neurophysiology.* – 2001. – T. 33, № 1. – C. 5-10.
193. Tamse C. T., Xu Y., Song H., Nie L., Yamoah E. N. Protein kinase A mediates voltage-dependent facilitation of Ca^{2+} current in presynaptic hair cells in *Hermissenda crassicornis* // *J Neurophysiol.* – 2003. – T. 89, № 3. – C. 1718-26.
194. Fournier F., Charnet P., Bourinet E., Vilbert C., Matifat F., Charpentier G., Navarre P., Brule G., Marlot D. Regulation by protein kinase-C of putative P-type Ca channels expressed in *Xenopus* oocytes from cerebellar mRNA // *FEBS Lett.* – 1993. – T. 317, № 1-2. – C. 118-24.
195. Corbett A. D., Henderson G., McKnight A. T., Paterson S. J. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail // *Br J Pharmacol.* – 2006. – T. 147 Suppl 1. – C. S153-62.

196. Rothermel J. D., Parker Botelho L. H. A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the diastereoisomers of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase // *Biochem J.* – 1988. – T. 251, № 3. – C. 757-62.
197. Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C // *Biochemistry.* – 1984. – T. 23, № 21. – C. 5036-41.
198. Lochner A., Moolman J. A. The many faces of H89: a review // *Cardiovasc Drug Rev.* – 2006. – T. 24, № 3-4. – C. 261-74.
199. Mintz I. M., Bean B. P. GABAB receptor inhibition of P-type Ca^{2+} channels in central neurons // *Neuron.* – 1993. – T. 10, № 5. – C. 889-98.
200. Herlitze S., Garcia D. E., Mackie K., Hille B., Scheuer T., Catterall W. A. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein beta gamma subunits // *Nature.* – 1996. – T. 380, № 6571. – C. 258-62.
201. Kaneko S., Akaike A., Satoh M. Receptor-mediated modulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels via heterotrimeric G-proteins in neurons // *Jpn J Pharmacol.* – 1999. – T. 81, № 4. – C. 324-31.
202. Dolphin A. C. Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins // *J Physiol.* – 1998. – T. 506 (Pt 1). – C. 3-11.
203. Waldhoer M., Bartlett S. E., Whistler J. L. Opioid receptors // *Annu Rev Biochem.* – 2004. – T. 73. – C. 953-90.
204. Tsien R. W., Tsien R. Y. Calcium channels, stores, and oscillations // *Annu Rev Cell Biol.* – 1990. – T. 6. – C. 715-60.
205. Bito H., Deisseroth K., Tsien R. W. Ca^{2+} -dependent regulation in neuronal gene expression // *Curr Opin Neurobiol.* – 1997. – T. 7, № 3. – C. 419-29.
206. Higashida H., Hoshi N., Knijnik R., Zadina J. E., Kastin A. J. Endomorphins inhibit high-threshold Ca^{2+} channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing mu-opioid receptors // *J Physiol.* – 1998. – T. 507 (Pt 1). – C. 71-5.

207. Gbahou F., Rouleau A., Morisset S., Parmentier R., Crochet S., Lin J. S., Ligneau X., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C. R., Schwartz J. C., Arrang J. M. Protean agonism at histamine H₃ receptors in vitro and in vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – T. 100, № 19. – C. 11086-91.
208. Wang D., Raehal K. M., Bilsky E. J., Sadee W. Inverse agonists and neutral antagonists at mu opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence // *J Neurochem.* – 2001. – T. 77, № 6. – C. 1590-600.
209. Fukuda K., Kato S., Shoda T., Morikawa H., Mima H., Mori K. Partial agonistic activity of naloxone on the opioid receptors expressed from complementary deoxyribonucleic acids in Chinese hamster ovary cells // *Anesth Analg.* – 1998. – T. 87, № 2. – C. 450-5.
210. Guirimand F., Strimbu-Gozariu M., Willer J. C., Le Bars D. Effects of mu, delta and kappa opioid antagonists on the depression of a C-fiber reflex by intrathecal morphine and DAGO in the rat // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1994. – T. 269, № 3. – C. 1007-20.
211. Bourinet E., Soong T. W., Stea A., Snutch T. P. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – T. 93, № 4. – C. 1486-91.
212. Currie K. P., Fox A. P. Voltage-dependent, pertussis toxin insensitive inhibition of calcium currents by histamine in bovine adrenal chromaffin cells // *J Neurophysiol.* – 2000. – T. 83, № 3. – C. 1435-42.
213. Furukawa T., Miura R., Mori Y., Strobeck M., Suzuki K., Ogihara Y., Asano T., Morishita R., Hashii M., Higashida H., Yoshii M., Nukada T. Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca²⁺ channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. II. Evidence for direct binding // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 28. – C. 17595-603.
214. Furukawa T., Nukada T., Mori Y., Wakamori M., Fujita Y., Ishida H., Fukuda K., Kato S., Yoshii M. Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca²⁺ channels with G-protein alpha and beta

- gamma subunits. I. Molecular determination // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 28. – C. 17585-94.
215. Meza U., Adams B. G-Protein-dependent facilitation of neuronal $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, and $\alpha 1E$ Ca channels // *J Neurosci.* – 1998. – T. 18, № 14. – C. 5240-52.
216. Kammermeier P. J., Ruiz-Velasco V., Ikeda S. R. A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both $G_{\alpha q/11}$ and $G_{\beta \gamma}$ // *J Neurosci.* – 2000. – T. 20, № 15. – C. 5623-5629.
217. Meir A., Bell D. C., Stephens G. J., Page K. M., Dolphin A. C. Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of $\alpha 1 B$ by $G_{\beta \gamma}$ // *Biophys J.* – 2000. – T. 79, № 2. – C. 731-46.
218. Brzostowski J. A., Kimmel A. R. Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors // *Trends Biochem Sci.* – 2001. – T. 26, № 5. – C. 291-7.
219. Hall R. A., Lefkowitz R. J. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins // *Circ Res.* – 2002. – T. 91, № 8. – C. 672-80.
220. Azzi M., Charest P. G., Angers S., Rousseau G., Kohout T., Bouvier M., Pineyro G. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – T. 100, № 20. – C. 11406-11.
221. Huang P., Steplock D., Weinman E. J., Hall R. A., Ding Z., Li J., Wang Y., Liu-Chen L. Y. κ Opioid receptor interacts with Na(+)/H(+)-exchanger regulatory factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to stimulate Na(+)/H(+) exchange independent of G(i)/G(o) proteins // *J Biol Chem.* – 2004. – T. 279, № 24. – C. 25002-9.
222. Kitano J., Nishida M., Itsukaichi Y., Minami I., Ogawa M., Hirano T., Mori Y., Nakanishi S. Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1 Ca²⁺ channel // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 27. – C. 25101-8.

223. Al-Hasani R., Bruchas M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior // *Anesthesiology*. – 2011. – T. 115, № 6. – C. 1363-81.
224. Johnson J. D. A calmodulin-like receptor in the calcium channel. // *Biophys J*. – 1984. – T. 45. – C. 134-136.
225. Yuan T., Walsh M. P., Sutherland C., Fabian H., Vogel H. J. Calcium-dependent and -independent interactions of the calmodulin-binding domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase with calmodulin // *Biochemistry*. – 1999. – T. 38, № 5. – C. 1446-55.
226. Sanchez-Blazquez P., Rodriguez-Munoz M., Garzon J. Mu-opioid receptors transiently activate the Akt-nNOS pathway to produce sustained potentiation of PKC-mediated NMDAR-CaMKII signaling // *PLoS One*. – 2010. – T. 5, № 6. – C. e11278.
227. Sunagawa M., Yokoshiki H., Seki T., Nakamura M., Laber P., Sperelakis N. Direct block of Ca²⁺ channels by calmidazolium in cultured vascular smooth muscle cells // *J Cardiovasc Pharmacol*. – 1999. – T. 34, № 4. – C. 488-96.
228. Doyle D. A., Lee A., Lewis J., Kim E., Sheng M., MacKinnon R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ // *Cell*. – 1996. – T. 85, № 7. – C. 1067-76.