

УДК 612.816.3(075.8)
ББК 28.707я73
С34

Р е ц е н з е н т ы:
кафедра нормальной физиологии
Белорусского государственного медицинского университета
(заведующий кафедрой доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки Республики Беларусь *А. И. Кубарко*);
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент НАН Беларуси *В. В. Солтанов*

Сидоров, А. В.
С34 Физиология межклеточной коммуникации : учеб. пособие /
А. В. Сидоров. – Минск : БГУ, 2008. – 215 с.
ISBN 978-985-485-812-8.

В учебном пособии изложены современные представления о межклеточной передаче информации. Особое внимание уделяется вопросам физиологии синапсов и фармакологии синаптической передачи.

Предназначено для студентов биологических специальностей учреждений, обеспечивающих получение высшего образования. Представляет интерес для аспирантов, преподавателей, специалистов-нейрофизиологов и биофизиков.

УДК 612.816.3(075.8)
ББК 28.707я73

ISBN 978-985-485-812-8

© Сидоров А. В., 2008
© БГУ, 2008

ОТ АВТОРА

Основу настоящего издания составляют тексты лекций, читаемых автором в рамках курса «Физиология межклеточной коммуникации» студентам биологического факультета Белорусского государственного университета.

В учебном пособии кратко изложены современные представления о природе межклеточных контактов, способах обмена информацией между клетками. Особое внимание уделено физиологии нервных клеток и синапсов. Разделение учебного материала на отдельные главы проведено по тематическому принципу. В главах 1–6 описаны структуры и механизмы, обеспечивающие возникновение, передачу, восприятие и переработку сигнала. В главах 7–12 рассмотрены частные вопросы, касающиеся медиаторных систем центральной нервной системы. При этом главное внимание сосредоточено на молекулярных и клеточных основах их функционирования.

Каждая глава снабжена списком оригинальных статей по проблемам межклеточной коммуникации. Приведены также учебные пособия и монографии, которые могут быть использованы студентами для самостоятельной подготовки по предмету.

Автор выражает искреннюю благодарность коллективу кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета, рецензентам за высказанные советы и замечания, а также коллективу Управления редакционно-издательской работы университета за подготовку рукописи к изданию.

ВВЕДЕНИЕ

Принципы межклеточной коммуникации. Судьба любой клетки организма зависит от сигналов, поступающих к ней извне. Они регулируют процессы, определяющие выживание клеток, их способность к делению и дифференцировке, функциональную активность или гибель последних. Под влиянием внешних сигналов происходят различные биохимические превращения внутри клеток, изменяется уровень экспрессии генов, наблюдаются перестройки цитоскелета – клетка реагирует на раздражение.

Важнейшим этапом межклеточной коммуникации является передача сигнала от клетки к клетке. Для ее успешного осуществления необходимо, как минимум, два элемента: клетка, генерирующая сигнал, и клетка, способная к восприятию сигнала. В зависимости от наличия специализированных, способных к восприятию сигнала, структур на поверхности клетки – *рецепторов* – все многообразие действующих механизмов можно разделить на две большие группы:

1) сигнализация, протекающая *без участия рецепторов* – обеспечивается благодаря наличию особых контактов между клетками, встречается между клетками в пределах одной ткани;

2) сигнализация, для реализации которой *необходимы рецепторы* – протекает как между клетками в пределах одной ткани, так и между клетками разных тканей.

Ко второй группе механизмов передачи сигнала относятся различные типы связи, большинство из которых ассоциируется с выделением химического вещества во внеклеточную среду генерирующей сигнал клеткой (принцип *гуморальной регуляции*). В настоящее время выделяют:

- **эндокринную передачу сигнала:** химическое вещество – *гормон* – попадает в кровеносное русло и вместе с током крови переносится на значительные расстояния, оказывая влияние на клетки-мишени, расположенные в самых разных местах организма;

• **паракринную передачу сигнала:** химическое вещество – «тканевой» регулятор, или *парагормон*, выделяется во внеклеточную среду, где оно способно диффундировать на незначительное расстояние, вовлекая в ответную реакцию *совокупность* расположенных рядом клеток;

• **нейронную передачу сигнала:** действие химического вещества – *нейромедиатора* – ограничено узкой областью специального контакта двух взаимодействующих клеток – *синапсом*. Таким образом, в ответную реакцию вовлекается лишь *одна* клетка из множества возможных. В рассмотренном случае в качестве генерирующей сигнал структуры *всегда* выступает нервная клетка. Объектом ее влияния является другая нервная клетка, клетка мышечной ткани или железы.

Часто крайне сложно провести четкую границу между двумя последними типами межклеточной сигнализации. В ряде случаев диффузия нейромедиатора не ограничивается областью синапса, оказывая действие на рядом расположенные клетки. Справедливо и обратное – парагормоны, достигая области синапса, модулируют нейронную передачу сигнала.

Помимо взаимодействия, опосредованного выделением химического вещества в межклеточное пространство, возможна и коммуникация, основанная на *прямом контакте* между клетками. При этом генерирующая сигнал клетка, перемещаясь и вступая в контакт с клеткой-мишенью, сама является источником информации. Связывание клеток происходит при участии мембран-ассоциированных белков и играет важную роль в некоторых процессах клеточной дифференцировки.

Эволюция межклеточной коммуникации. Сравнительно-физиологические исследования показали, что признаков эволюционного усложнения элементарных механизмов, лежащих в основе электрической возбудимости нервной клетки, не существует. По мнению П. Г. Костюка (1979), они представляют собой чрезвычайно древнее приобретение живых организмов. Новыми же являются различные вспомогательные механизмы, способствующие более эффективному использованию уже имеющихся основных, например появление миелиновой оболочки и системы перехватов Ранвье, значительно увеличивающих скорость проведения нервного импульса.

Даже по отношению к организмам, обладающим самой простой, в сравнении с высокоорганизованными животными, нервной системой, несправедливо говорить о меньшей степени медиаторной специфичности

их нервных клеток. Использование в качестве сигнальных молекул *различных* веществ характерно даже для кишечнополостных.

Тем не менее в ходе эволюции происходит перекомбинация элементарных механизмов, обуславливающих процессы межклеточной коммуникации. В частности, у высших позвоночных и беспозвоночных животных уменьшается доля пептидергических нейронов и наблюдается экспансия нервных клеток, использующих различные низкомолекулярные соединения в качестве нейромедиатора. У представителей животного мира, находящихся на более высокой ступени эволюционной лестницы, происходит замена электрических и электрохимических синапсов на чисто химические.

ГЛАВА 1

СТРОЕНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ

ТИПЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ

Морфологические структуры, возникающие в местах соприкосновения клеток в тканях, носят название *межклеточных контактов*. Они могут быть классифицированы на основании выполняемой функции:

1. Функция герметизации отсеков межклеточного пространства между соседними клетками. В результате мелкие водорастворимые молекулы не способны легко и быстро перемещаться во внеклеточном матриксе.

В организме позвоночных этот тип соединений представлен *плотными контактами* (*tight junction*). Они сформированы посредством связанных друг с другом белков, закрепленных на рядом расположенных участках мембран соседних клеток (рис. 1, а). Играют ключевую роль в поддержании полярности клеток, особенно эпителиальных, обеспечивая различия в составе межклеточного пространства по разные стороны от слоя связанных таким образом клеток.

2. Функция скрепления клеток друг с другом. В результате ткани приобретают механическую прочность, а различные клеточные типы не смешиваются в пределах одного органа (ткани).

Основу контактов этого типа составляют трансмембранные белки – *кадгерины*. Молекула кадгерина плазматической мембраны одной клетки напрямую связывается с аналогичной молекулой кадгерина, расположенной на мембране соседствующей клетки, соединяя их в единое целое. Связывание происходит в присутствии ионов кальция.

Наиболее просто устроенными типами подобных соединений являются *рыхлые (простые) контакты*, в англоязычной литературе именуемые слипающимися контактами (*adherens junction*). В этом случае (рис. 1, б) между лишенными специализированных структур плазматическими мембранами соседних клеток имеется щель шириной 10–20 нм. При этом мо-

лекула кадгерина посредством связывающего белка соединяется с актиновыми волокнами внутри клетки. Таким образом реализуется соединение этого элемента цитоскелета в единую сеть. Благодаря сокращению актиновых волокон обеспечиваются координированные движения пластов клеток, что имеет особенно важное значение в ходе эмбрионального развития, например при формировании нервной трубки. Своеобразной разновидностью простых контактов являются *межклеточные «замки»* – когда мембраны соседних клеток изгибаются, образуя на поверхности клеток впячивания (см. рис. 1, б).

Десмосомы принципиально не отличаются от описанных выше структур. Этот тип контакта образован кадгеринами различных типов, соединенными в цитоплазме клетки с бляшкой, представленной связывающими белками, и скрепленными при ее посредстве с *промежуточными волокнами* (рис. 1, в). Эти элементы цитоскелета пересекают цитоплазму клетки во многих направлениях, укрепляют всю конструкцию, противодействуя механическим напряжениям, возникающим в ткани. Представлены тремя классами молекул: 1) *кератиновыми* волокнами (в клетках эпителиальной ткани); 2) *виментином* и *виментин-подобными* волокнами (в клетках соединительной и мышечной ткани, поддерживающих клетках нервной системы – *нейроглии*); 3) *нейрофиламентами* (в нервных клетках).

Полудесмосомы обеспечивают прикрепление пласта клеток к базальной мембране (характерны для эпителиальных клеток).

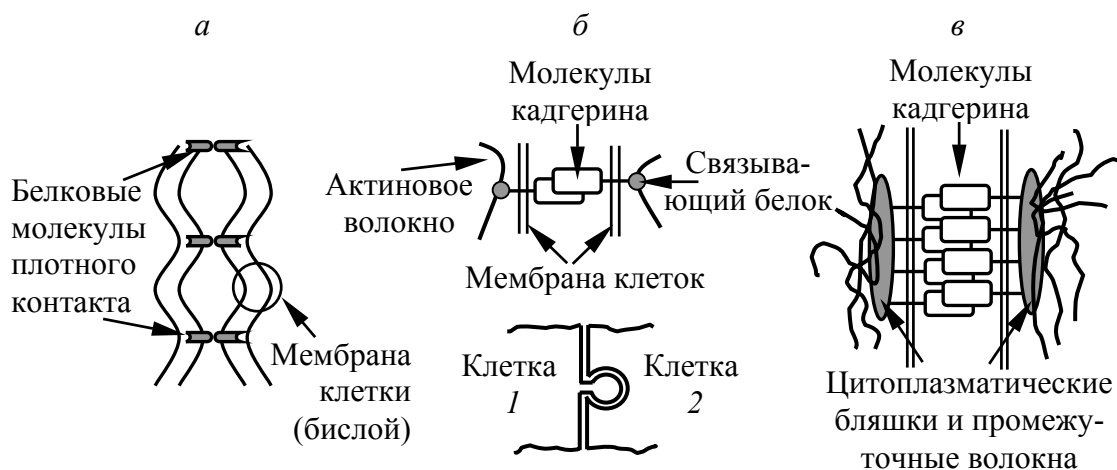


Рис. 1. Типы межклеточных контактов:
а – плотный контакт; б – рыхлый (простой) контакт
и взаимное расположение мембран соседствующих клеток
в межклеточном «замке»; в – десмосома

3. Функция коммуникации между клетками как в пределах одной ткани, так и между разными типами тканей. Благодаря этим соединениям осуществляется транспорт веществ и передача сигналов.

Представлены *щелевыми контактами* (*gap junction*) и *синапсами*. Подробные описания этих структур приводятся ниже.

Цитоплазма растительных клеток соединена посредством *плазмодесм* – специальных каналов, стенки которых образованы цитоплазматической мембраной, общей для контактирующих клеток. Таким образом, создается непрерывность цитоплазмы, что обеспечивает передачу раздражения и передвижение веществ от клетки к клетке, а скрепление клеток друг с другом происходит благодаря *срединной пластинке*, цементирующей клеточные стенки рядом расположенных клеток.

ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ

На сегодняшний день считается общепринятым тот факт, что клетки большинства тканей позвоночных и беспозвоночных животных способны контактировать со своими соседями посредством внутриклеточных структур, обладающих низким электрическим сопротивлением. У позвоночных только несколько типов клеток (красные клетки крови, сперматозоиды, скелетные мышцы) в высокодифференцированном (зрелом) состоянии не формируют щелевых контактов.

Благодаря электронномикроскопическим исследованиям были определены структуры, ответственные за прямую межклеточную передачу электрического сигнала. Последняя возможна только в случае наличия участков плотного прилегания мембран соседних клеток (размеры щели составляют 2–3 нм). Дальнейшие работы показали присутствие в этих местах специфических частиц – *коннексонов*, плотно упакованных в плазмалемме (расстояние между центрами соседних структур составляет 9–10 нм). Коннексон, входящий в состав щелевого контакта, образует цилиндр с центрально расположенной водяной порой. Стенки цилиндра сформированы шестью белковыми субъединицами, способными смещаться относительно друг друга, контролируя таким образом проницаемость канала.

Рентгеноструктурный анализ позволил с высоким разрешением (7 и 21 Å) установить строение канала щелевого контакта (рис. 2).

Щелевой контакт состоит из двух полуканалов, каждый из которых содержит 24 белковые α -спирали, соответствующие четырем трансмембранным доменам шести субъединиц. Наружный диаметр полуканала со стороны цитозоля составляет 70 Å, а с внеклеточной стороны – 50 Å. Диаметр поры колеблется от 40 Å (со стороны цитозоля) до 15 Å (в месте

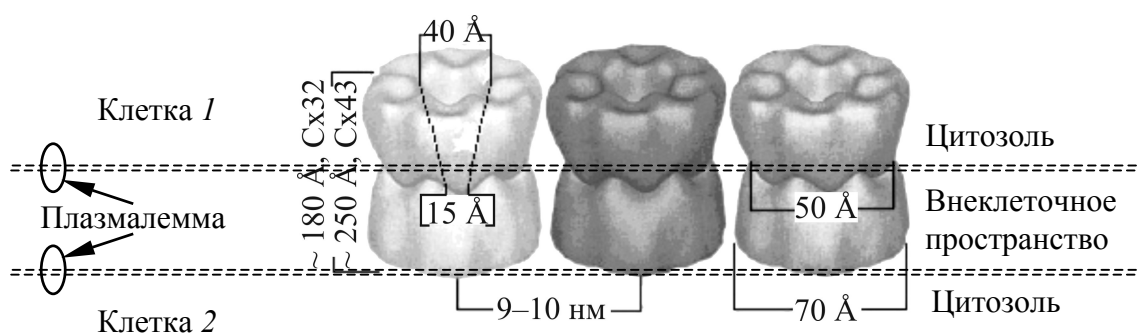


Рис. 2. Структура канала щелевого контакта по результатам рентгеноструктурного анализа (по G. A. Perkins et al., 1998)

соединения двух полуканалов во внеклеточном пространстве). Поверхности коннексонов образуют плотное соединение друг с другом за счет стыкующего домена, что препятствует утечке частиц, переносящих заряд (ионов) во внеклеточное пространство.

Белки, образующие каналы щелевого контакта, называются *коннексинами* (connexin, Cx). Их классификация основана на молекулярной массе (в кДа) и месте обнаружения (*h* – human (человек), *r* – rat (крыса) и т. п.): *hCx32*. К 2003 г. было известно о 20 генах, кодирующих образование коннексинов у человека. Они находятся во многих хромосомах, образуя скопление только в первой хромосоме. Множество генов, кодирующих коннексины, имеют сходную организацию. Предполагается, что в гаплоидном геноме они представлены лишь одной копией, а их возникновение является результатом дупликации генов.

СИНАПСЫ

Согласно классическому определению, синапсы представляют собой специализированные функциональные контакты между клетками возбудимых тканей. Термин «синапс» ввел Ч. Шеррингтон (C. Sherrington, 1897).

Характерная особенность данных образований – наличие относительно широкого (15–20 нм) пространства между контактирующими клетками. Следствием этого является невозможность прямой передачи электрического сигнала от клетки к клетке (благодаря шунтирующему действию обладающей низким электрическим сопротивлением внеклеточной жидкости). Указанное затруднение было разрешено за счет использования химических веществ в механизмах передачи сигнала. В результате сформировалась оригинальная морфологическая структура (рис. 3).

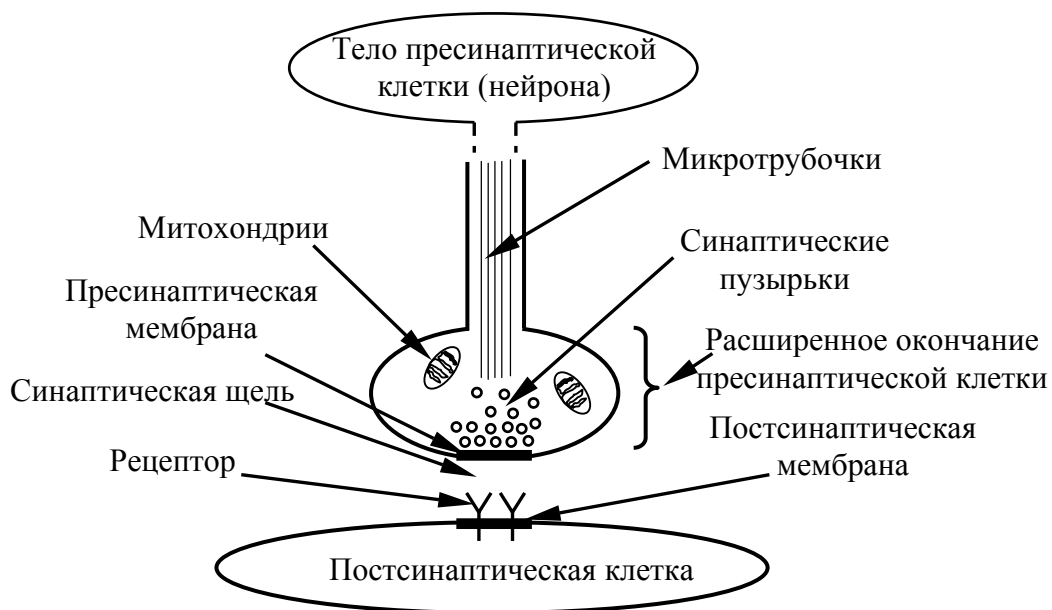


Рис. 3. Структура синапса (пропорции не соблюдены)

В синапсе различают несколько составных частей:

1) пресинаптическая часть: представляет собой расширенное окончание клетки (нейрона). Именно здесь располагаются многочисленные *синаптические пузырьки* (везикулы), окруженные мембраной структуры диаметром от 10 до 90 нм, содержащие химическое вещество (медиатор или нейромедиатор). Здесь также широко представлены митохондрии, многочисленные микротрубочки и микрофиламенты (нейрофиламенты). Пресинаптическая мембрана представляет собой участок плазмалеммы, непосредственно контактирующий с соседней клеткой;

2) синаптическая щель: участок межклеточного пространства, отделяющий пресинаптическую клетку от постсинаптической;

3) постсинаптическая часть: образована участком плазматической мембраны другой клетки, содержит встроенные белковые молекулы – *рецепторы*, способные обратимо связываться с нейромедиатором, вызывая впоследствии генерацию электрического импульса в постсинаптическом нейроне.

В зависимости от морфологии (рис. 4) контактирующих пре- и постсинаптических мембран выделяют синапсы двух типов: *асимметричные*, 1-го типа, и *симметричные*, 2-го типа. Они отличаются друг от друга по ряду признаков:

- синаптическая щель в синапсах 1-го типа шире (300 Å) синаптической щели синапсов 2-го типа (200 Å);
- постсинаптическая мембрана синапсов 1-го типа толще и плотнее;

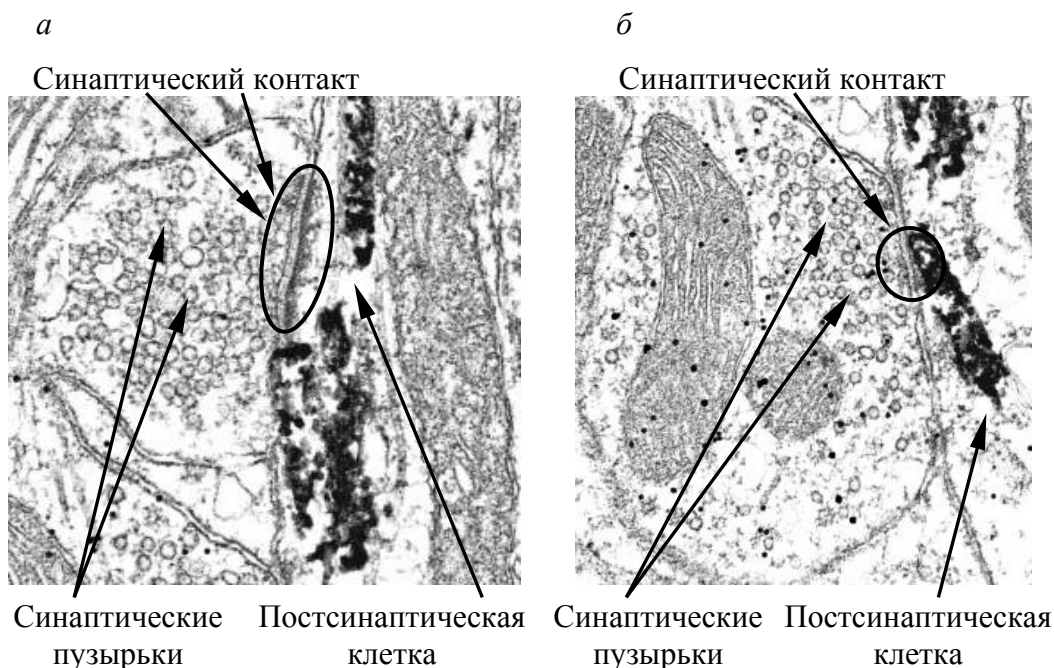


Рис. 4. Химические синапсы 1-го и 2-го типов (по R. A. Webster, 2001):

a – асимметричный синапс; *б* – симметричный синапс.

Темное электроноплотное вещество маркирует постсинаптическую клетку

- синапсы 1-го типа длиннее (размеры синаптических мембран составляют 1–2 мкм, и мембраны более выражены), а синапсы 2-го типа короче (1 мкм, и уплотнение их синаптических мембран не столь выражено);

- синаптические пузырьки многочисленны в синапсах 1-го типа, имеют округлую форму (30–60 нм в диаметре), а в синапсах 2-го типа они овальной или дисковидной формы, менее многочисленны, их размер составляет 10–30 нм;

- в синаптической щели синапсов 1-го типа (ближе к постсинаптической мембране) расположена бляшка из внеклеточного вещества.

Многочисленные отростки нервных клеток взаимодействуют между собой, образуя в пределах нервной системы разнообразные типы синапсов:

- аксо-дендритные;
- аксо-аксональные;
- аксо-соматические;
- дендро-дендритные;
- дендро-соматические;
- сома-соматические.

Нервно-мышечные и нервно-железистые соединения представляют собой контакты, принципиально не отличающиеся от аксо-дендритных (аксо-

соматических) синапсов в пределах центральной нервной системы (ЦНС). В обоих случаях длинный отросток нейрона (аксон) образует контакт с телом постсинаптической клетки (мышечной или железистой).

По функциональному значению синапсы могут быть *возбуждающими* или *тормозными* – в зависимости от того, стимулируют они или подавляют электрическую активность постсинаптической клетки.

Особую морфологическую группу составляют синапсы со смешанным (электрохимическим) механизмом передачи сигнала.

Наиболее характерным примером является чашевидный синапс цилиарного ганглия цыпленка, подробное описание строения которого было дано А. де Лоренцо (A. J. de Lorenzo, 1960). В этом случае (рис. 5) расширенная часть отростка пресинаптического нейрона более чем наполовину окружает тело ганглионарной клетки (постсинаптического нейрона). Снаружи этой системы находятся шванновские клетки, плотно изолирующие область синапса, прежде всего электрически.

Дендриты нейронов способны ветвиться и образовывать выросты – *шипики*, которые представляют собой выступы мембраны, содержащие *шипиковый аппарат* – систему плоских цистерн и мешочков, расположенных под постсинаптической мембраной (рис. 6, а). Шипиковый аппарат обнаружен только в шипиках пирамидных клеток новой коры и гиппокампа, что дает основание предполагать его участие в процессах памяти и обучения.

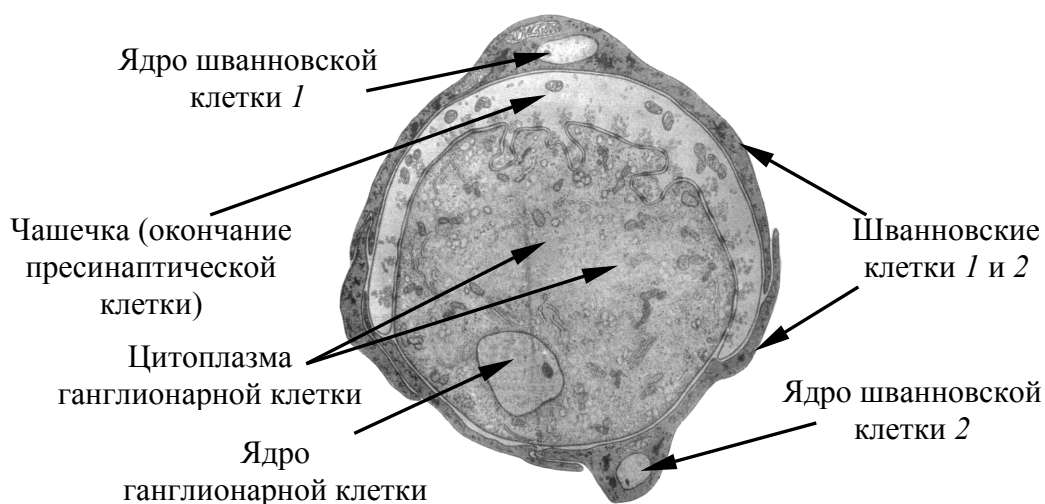


Рис. 5. Чашевидный синапс цилиарного ганглия цыпленка (по A. J. de Lorenzo, 1960)

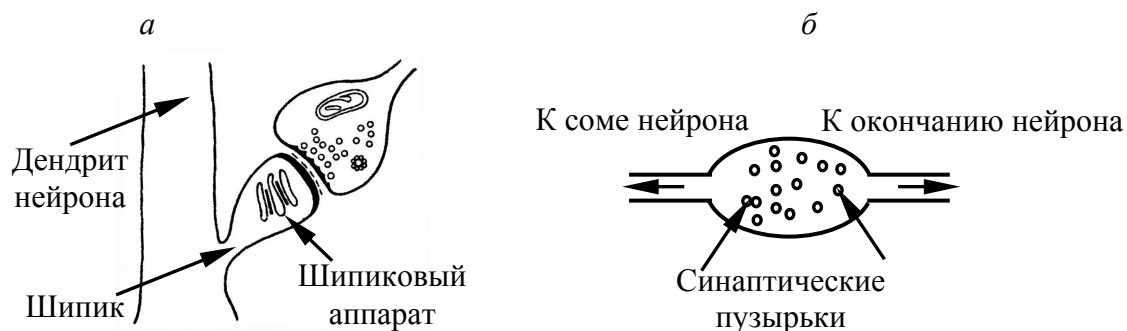


Рис. 6. Шипиковый аппарат (по L. Н. Hamlyn, 1962) – а
и аксоны *en passant* – б

В гладких мышцах норадренергические нервные волокна ветвятся среди и вдоль мышечных волокон. Выделение нейромедиатора происходит из расширенных участков нервного волокна (рис. 6, б). Подобные аминергические варикозные расширения волокон – аксоны *en passant* обнаружены и в ЦНС. При этом далеко не все они формируют в итоге структуру классического синапса, а действие нейромедиатора в данном случае носит паракринный характер.

Отмечены многочисленные попытки связать ультраструктуру того или иного синапса с его функцией, используемым нейромедиатором и т. п. Так, асимметричные синапсы (1-го типа), преимущественно аксо-дендритные, используют глутамат в качестве передатчика и являются возбуждающими синапсами. В то же время симметричные синапсы (2-го типа), как правило, аксо-соматические, нейромедиатором служит γ -аминомасляная кислота (ГАМК), и они являются тормозными. Количественное соотношение синапсов 1-го и 2-го типа составляет 4 : 1.

Везикулы холинергических синапсов (200–400 Å) прозрачны по сравнению с более электронноплотными синаптическими пузырьками (500–900 Å), содержащими моноамины (особенно норадреналин). Везикулы аксо-аксональных синапсов уплощены или имеют дискообразную форму и содержат преимущественно один из тормозных нейромедиаторов: ГАМК или глицин. Сферические везикулы, напротив, ассоциируются с возбуждающими аксо-соматическими синапсами, использующими глутамат в качестве медиатора. Везикулы асимметричных и симметричных синапсов содержат также моноамины, используемые в качестве ко-трансммиттеров глутамат- и ГАМК-ергической передачи.

Тем не менее следует отметить, что рассмотренные связи структуры и функции не являются абсолютными.

ГЛАВА 2

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ

Ключевой особенностью любой клеточной мембраны является способность избирательно осуществлять перенос веществ в клетку или из клетки. Благодаря барьерной функции мембраны по разные ее стороны создается неоднородное распределение ионов, низкомолекулярных органических веществ, белков и т. п. В зависимости от способности проникать через липидный бислой все многообразие молекул в организме можно разделить на три группы:

1) мелкие неполярные молекулы: например, молекулярный кислород (O_2 , 32 Да), диоксид углерода (CO_2 , 44 Да). По всей видимости, они способны легко растворяться в липидном бислое и, как следствие, легко диффундировать через него;

2) незаряженные полярные молекулы: они также достаточно легко диффундируют через бислой в том случае, когда их молекулярная масса невелика, например, вода (H_2O , 18 Да), этанол (C_2H_5OH , 46 Да). Повышение $M(r)$ снижает способность к диффузии (глицерол, 92 Да) вплоть до почти полной ее остановки (глюкоза, 180 Да).

В 1988 г. в мембране эритроцитов человека был обнаружен трансмембранный белок, отнесенный впоследствии к семейству *аквапоринов*. В плазмалемме он образует канал, предназначенный для транспортировки воды со скоростью в 10–100 раз превышающей скорость ее обычной диффузии через мембрану;

3) ионы и заряженные молекулы: липидный бислой для них практически непроницаем (вне зависимости от размера), поскольку электростатическое притяжение к ним молекул воды делает невозможным внедрение в углеводородную фазу бислоя (искусственные липидные мембраны в 1 млрд (!) раз более проницаемы для воды, чем для Na^+ или K^+).

Таким образом, для транспорта в клетку и из нее различных ионов, сахаров, аминокислот, нуклеотидов и других метаболитов необходимо наличие специальных молекул – *мембранных транспортных белков*. Они представляют собой лишь одну из групп ассоциированных с мембраной белков.

Считается, что 50 % массы плазматических мембран у животных составляют белки. При этом 25–30 % генома кодирует именно их синтез. В зависимости от выполняемой функции мембранные белки подразделяются на четыре большие группы: 1) транспортные белки; 2) линкеры – связывают макромолекулы, расположенные как внутри, так и снаружи клетки, с мембраной; 3) рецепторы – предназначены для распознавания и передачи сигнала из внеклеточной среды внутрь клетки; 4) ферменты, катализирующие специфические биохимические реакции. Рассмотренные молекулы могут по-разному связываться с липидным бислоем (рис. 7): ковалентно, нековалентно и просто располагаться в пределах плазмалеммы в виде одиночной α -спирали, множественных α -спиралей или замкнутой на себя системы из α -спиралей (β -бочка), как это характерно для транспортных трансмембранных белков.

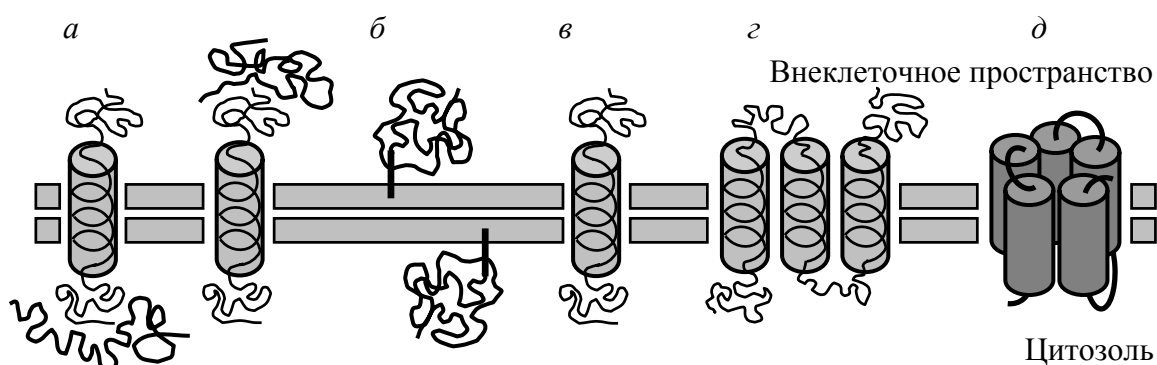


Рис. 7. Характер связывания и расположения мембранных белков:

a – нековалентное связывание; *б* – ковалентное связывание;
в – одиночная α -спираль; *г* – множественные α -спирали; *д* – β -бочка

Существуют два типа транспортных мембранных белков (рис. 8):

1) белки-переносчики: они связывают растворенное вещество на одной стороне плазмалеммы и переправляют его на противоположную сторону за счет собственных конформационных изменений;

2) каналные белки: формируют мелкие гидрофильные поры, сквозь которые посредством диффузии через мембрану проникают заряженные частицы.

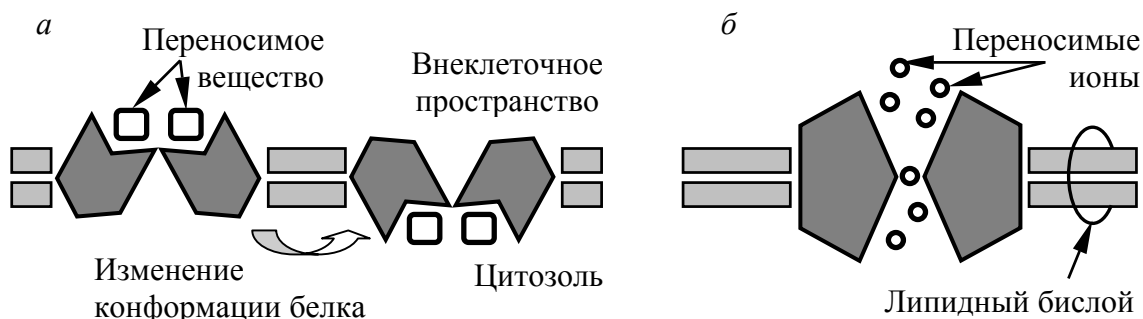


Рис. 8. Схема работы транспортных мембранных белков:

a – белки-переносчики; *б* – каналные белки

Большинство канальных белков обеспечивают транспорт неорганических ионов, поэтому их часто называют *ионными каналами*.

Клетки также способны перемещать крупные белковые комплексы через плазмалемму (экзо- и эндоцитоз), но для этого требуется специальный внутриклеточный аппарат.

РАЗЛИЧИЕ ИОННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПО РАЗНЫЕ СТОРОНЫ МЕМБРАНЫ

Между клеткой и внеклеточным пространством постоянно происходит обмен веществ. В результате концентрация ионов внутри клетки значительно отличается от таковой в окружающей среде (табл. 1).

Таблица 1

**Концентрация ионов вне и внутри «типичной» клетки млекопитающего
(Э. Кэндел, 1980; с дополнениями)**

Ион	Внутри клетки, ммоль	Вне клетки, ммоль
Na ⁺	5–15	145
K ⁺	140–160	4–5
Ca ²⁺	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵	1–2
Mg ²⁺	0,5	1–2
H ⁺	7 × 10 ⁻⁵ (pH 7,2)	4 × 10 ⁻⁵ (pH 7,4)
Cl ⁻	5–15	110–120
Анионы ⁻	155	0

При анализе этих данных следует обратить внимание на ряд фактов.

Прежде всего, это высокая концентрация K⁺ внутри клетки, а Na⁺ – вне клетки. Как показали работы А. Ходжкина и А. Хаксли (А. L. Hodgkin, A. F. Huxley, 1949–1952), именно неодинаковое распределение ионов калия по обе стороны мембраны нервной клетки дает потенциальную энергию для создания напряжения на мембране (см. гл. 4), а благодаря ионам натрия становится возможной активная реакция клетки – потенциал действия.

Во-вторых, различие в концентрации ионов кальция составляет 10 000 (!) раз. Это связано с тем, что Ca²⁺ является важнейшим внутриклеточным регулятором и даже небольшие его количества, поступающие извне, кардинально изменяют его внутриклеточную концентрацию, а также течение большинства клеточных реакций.

Приведенные в табл. 1 значения внутриклеточной концентрации для Ca²⁺ и Mg²⁺ отражают их содержание в цитозоле. На самом деле внутри клетки находится около 20 ммоль Mg²⁺ и 1–2 ммоль Ca²⁺, но большинство из них связаны с различными белками, хранятся внутри различных органелл (митохондрии, ЭПР) и не способны покидать клетку.

Высокая концентрация Na^+ вне клетки уравнивается преимущественно за счет отрицательно заряженных ионов хлора. Внутриклеточная концентрация K^+ сбалансирована благодаря целому спектру анионов: помимо Cl^- клетка содержит другие неорганические ионы (т. н. *фиксированные анионы*, неспособные покинуть клетку, переместившись через мембрану) – свободные бикарбонаты (HCO_3^-) и фосфаты (PO_4^{3-}), а также фосфатные и карбоксильные группы (COO^-) в составе нуклеиновых кислот и белков. В результате обеспечивается относительная электрическая нейтральность вне- и внутриклеточного содержимого.

Не существует принципиальных различий в распределении ионов по разные стороны от мембраны между клетками высших позвоночных и беспозвоночных (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация ионов в гигантском аксоне и крови кальмара, морской воде (Э. Кэндел, 1980)

Ион	Аксоплазма, ммоль	Кровь, ммоль	Морская вода, ммоль
Na^+	50	440	460
K^+	400	20	10
Ca^{2+}	0,4	10	10
Mg^{2+}	10	54	53
Cl^-	40–150	560	540

ВИДЫ ТРАНСПОРТА

В зависимости от способа перемещения вещества через мембрану выделяют два вида транспорта:

1) пассивный: в этом случае транспорт осуществляется просто по концентрационному градиенту за счет простой (непосредственно через липидный бислой) или облегченной (при помощи переносчиков) диффузии.

Для электрически нейтральных молекул направление пассивного транспорта определяется только концентрационным градиентом. Иначе обстоит ситуация с заряженными частицами. При их перемещении через мембрану создается неравномерное распределение положительных и отрицательных зарядов по разные ее стороны. Как следствие образуется *электрический потенциал* (напряжение) на мембране (в живой клетке внутренняя сторона заряжена отрицательно по отношению к наружной). В результате возникает электрохимический градиент, определяющий движение заряженных растворенных частиц через мембрану. Для некоторых ионов концентрационный и электрический градиенты действуют в одном направлении, усиливая друг друга (например, в отношении Na^+), для других (K^+), напротив, ослабляют друг друга.

Использование белковых переносчиков в случае пассивного транспорта весьма выгодно, поскольку обеспечивает движение крупных молекул через мембрану со скоростью во много раз (например, для глюкозы в 10 000 раз) превышающей скорость молекул при обычной диффузии через липидный бислой;

2) активный: для его осуществления требуются затраты энергии, запасенной ранее в форме АТФ, поскольку перенос веществ осуществляется против их концентрационного градиента.

ПЕРЕНОС ВЕЩЕСТВ ПОСРЕДСТВОМ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ

Теоретически возможными и реализующимися на практике являются три варианта переноса веществ посредством транспортных белков (рис. 9):

1) унипорт: транспортный белок переносит то или иное вещество через мембрану в направлении концентрационного градиента вещества. Так, структура транспортера для глюкозы характеризуется наличием двух конформаций, в которых участки для связывания глюкозы попеременно оказываются на внешней либо внутренней стороне мембраны, обеспечивая перенос сахара в клетку или из клетки;

2) симпорт: представляет собой вариант *сопряженного транспорта*, при котором два различных вещества движутся в одном направлении через мембрану;

3) антипорт: представляет собой вариант *сопряженного транспорта*, при котором два различных вещества движутся в противоположных направлениях через мембрану.

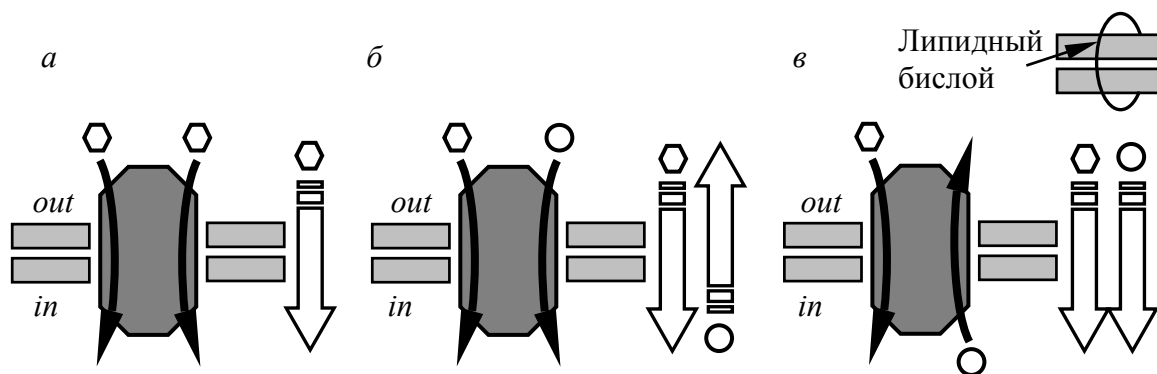


Рис. 9. Перенос веществ при помощи транспортных белков:

а – унипорт; б – симпорт; в – антипорт.

Объемными стрелками указано направление
концентрационного градиента вещества
(in – цитозоль, out – внеклеточное пространство)

В случае сопряженного транспорта перенос частиц через мембрану происходит либо за счет энергии гидролиза АТФ (антипорт), т. е. речь идет уже об активном транспорте, либо за счет потенциальной энергии созданных ранее трансмембранных градиентов ионов, прежде всего Na^+ , в случаях пассивного транспорта (симпорт и антипорт). При этом одно из переносимых веществ перемещается через мембрану против своего концентрационного градиента.

Важнейшими мембранными транспортерами клетки являются:

- **$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменник**: при переносе наружу одного иона кальция внутрь клетки перемещаются три иона натрия. Благодаря высокой плотности молекул переносчика в мембране клетки данная система $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена в 50 раз эффективнее устраняет избыточный кальций из клетки, нежели системы активного транспорта Ca^{2+} . Представляет собой высокомолекулярный белок (120 кДа, 970 а. к., для натрий-кальциевого обменника сердечной мышцы), состоящий из 11 трансмембранных сегментов и большой внутриклеточной петли между 5-м и 6-м сегментами. С-конец располагается внутри, а N-терминаль снаружи клетки.

В клетках с низким уровнем мембранного потенциала Na^+ -градиент не обеспечивает достаточной энергии для котранспорта Ca^{2+} . В мембране таких клеток (палочки сетчатки млекопитающих) натрий-кальциевый обменник носит несколько модифицированный характер (стехиометрия): на два перемещенных наружу иона Са приходится четыре внесенных внутрь иона Na и один удаленный из клетки ион К (по концентрационному градиенту). В результате внутриклеточная концентрация Ca^{2+} может быть понижена в сотни раз, нежели в случае использования «классического» натрий-кальциевого обменника, при тех же значениях мембранного потенциала;

- **$\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -обменник**: переносит (антипорт) ионы через мембрану в соотношении 1:1. Является одним из ключевых механизмов, участвующих в регуляции внутриклеточного рН (снижение внутриклеточной концентрации протонов приводит к защелачиванию цитозоля);

- **$\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ -обменник**: обеспечивает поддержание постоянства внутриклеточной концентрации ионов хлора, что чрезвычайно важно для развития процессов торможения. Стехиометрия процесса 1:1.

В ряде случаев (клетки почки и аксон кальмара) в котранспорте ионов хлора участвуют ионы калия. Стехиометрия этих переносов в соотношении $\text{Na} : \text{K} : \text{Cl}$ составляет 1 : 1 : 2 и 1 : 2 : 3 соответственно;

- **Na^+ -глюкозный котранспортер**: чрезвычайно активен в эпителиальных клетках тонкого кишечника, обеспечивает перенос глюкозы (1:1) из просвета кишки внутрь выстилающих ее клеток. Дальнейший перенос (во внеклеточное пространство) осуществляется при помощи обычного транспортера для глюкозы;

- **$K^+ - Cl^-$ -котранспортер**: вынос ионов хлора из клетки осуществляется за счет однонаправленного тока с ионами калия в соотношении 1 : 1. Представляет собой белок (120 кДа, 1100 а. к.), состоящий из 12 трансмембранных сегментов, С- и N-концевые участки расположены в цитоплазме;

- **$Cl^- - HCO_3^-$ -обменник**: встречается в большинстве клеток и наряду с $Na^+ - H^+$ -обменником участвует в поддержании внутриклеточного рН. Стехиометрия процесса 1 : 1. Структура сходна с таковой для калий-хлорного котранспортера.

|| В поддержании уровня внутриклеточного рН задействован еще целый ряд механизмов, включая и системы активного транспорта (см. далее).

Существует также целая система транспортеров, обеспечивающая перенос нейромедиаторов в синаптические пузырьки и в клетку из области синаптической щели (обратный захват). Они будут рассмотрены при характеристике соответствующих механизмов химической передачи сигнала (см. гл. 9–10).

Таким образом, перенос веществ против электрохимического градиента может осуществляться и за счет пассивных механизмов транспорта. Тем не менее именно системы активного транспорта веществ создают ту исходную разницу в концентрациях вне и внутри клетки, которая обеспечивает работу котранспортеров и обменников.

СИСТЕМЫ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ВЕЩЕСТВ

Для успешного переброса ионов через мембрану против их электрохимического градиента необходимы затраты энергии. В клетках эукариот для этих целей используется энергия гидролиза АТФ, т. е. трансмембранные переносчики, по сути, представляют собой *АТФазы*.

|| В мембране архебактерий (*Halobacterium halobium*) содержится бактериородопсин, трансмембранный белок, использующий энергию света для перекачки H^+ на внешнюю сторону мембраны с целью создания градиента протонов для последующего синтеза АТФ.

Центральную роль в активном транспорте играет **$Na^+ - K^+$ -АТФаза** ($Na^+ - K^+$ -насос). Она присутствует в плазматической мембране почти всех клеток живых организмов, и ее содержание может превышать 10 % от общего количества белка клетки. На работу насоса затрачивается не менее трети от всей энергии, вырабатываемой клеткой, а в ряде случаев значение достигает 70 %. Фермент впервые был выделен из нерва краба в 1957 г. и исследован Дж. Скоу (J. Skou), удостоенным Нобелевской премии по химии в 1997 г. В ходе работы $Na^+ - K^+$ -АТФазы последовательно

протекает ряд реакций, конечным результатом которых является перенос трех ионов натрия из цитозоля во внеклеточное пространство в обмен на два иона калия.

Молекулярный механизм использования энергии АТФ и переноса ионов посредством Na^+/K^+ -АТФазы еще не установлен окончательно (2005 г.). Наибольшего внимания заслуживает гипотеза, высказанная автором открытия Дж. Скоу. Согласно ей, на первом этапе происходит связывание ионов натрия с ориентированным в цитозоль доменом Na^+/K^+ -насоса. Это в свою очередь стимулирует его АТФазную активность. В результате молекула АТФ расщепляется и высокоэнергетический фосфат присоединяется к Na^+/K^+ -АТФазе (фосфорилирование), вызывая ее конформационные изменения. Переход в новую конформацию приводит к высвобождению Na^+ на внешней стороне мембраны во внеклеточное пространство. Одновременно с этим наблюдается связывание ионов калия с соответствующими участками Na^+/K^+ -насоса, отличными от сайтов связывания натрия. Присоединение K^+ вызывает отсоединение фосфата (дефосфорилирование) и, как следствие, возвращает Na^+/K^+ -АТФазу в исходную конформацию. В результате ионы калия переносятся на внутреннюю сторону плазмалеммы, где незамедлительно высвобождаются и попадают в цитозоль. Весь цикл занимает около 10 мс и может повторяться многократно. При этом каждый последующий шаг цикла зависит от предыдущего и невозможность протекания хотя бы одной стадии приводит к остановке всего цикла, нарушая работу Na^+/K^+ -АТФазы (рис. 10).

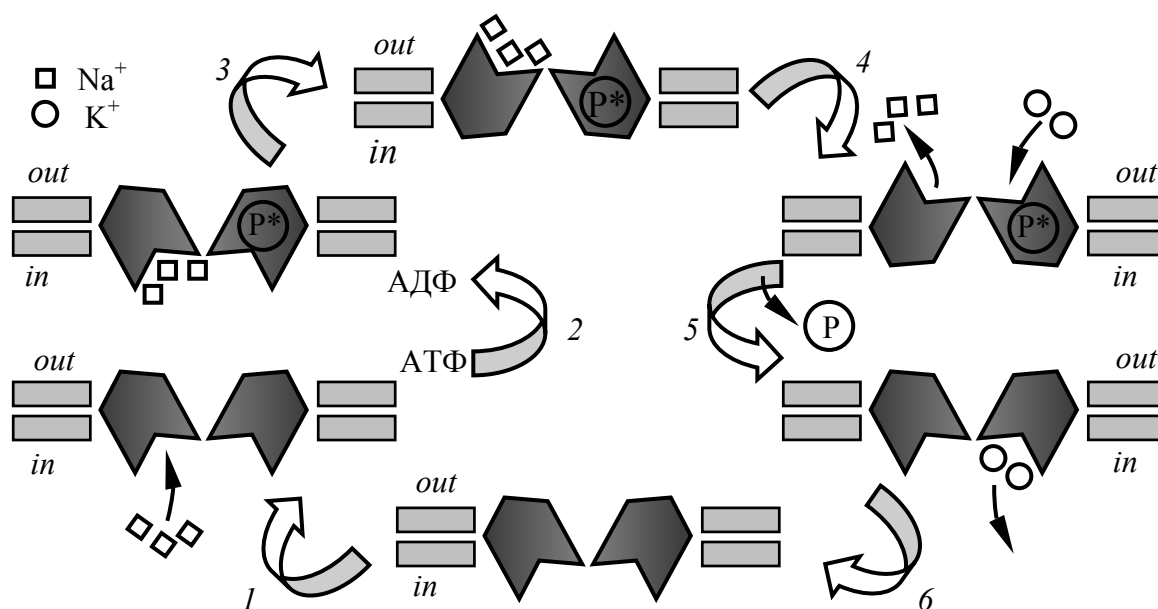


Рис. 10. Схема рабочего цикла Na^+/K^+ -АТФазы:
1–6 – последовательные стадии процесса

Работа данного фермента находится под контролем многих факторов, в том числе и общего характера (температура, pH). $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза активируется ионами натрия (только со стороны цитоплазмы) и калия (только с внеклеточной стороны). При этом ее специфичность по отношению к натрию гораздо выше.

Специфическим блокатором $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы является оубаин (строфантин G), снижающий ее активность на 50 % в концентрациях порядка 10^{-7} моль/л. Терапевтический эффект сердечных гликозидов (препараты наперстянки, содержащие строфантин и дигитонин) обусловлен именно его действием на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос мембраны кардиомиоцитов. Угнетение активности АТФазы приводит к накоплению внутри клеток Ca^{2+} за счет опосредованного снижением натриевого потенциала уменьшения работоспособности $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменника. В результате дополнительно накопленные запасы ионов кальция могут использоваться для активации сократительного аппарата миокарда.

В ходе каждого цикла работы $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы из клетки удаляется один положительный заряд: три иона натрия, перемещенных наружу, против двух ионов калия, перенесенных внутрь. Следовательно $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос является *электрогенным*, т. е. создает электрический ток через мембрану (одна молекула $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы переносит от 150 до 600 «лишних» ионов натрия в секунду), что суммарно увеличивает мембранный потенциал примерно на 10 мВ в электроотрицательную сторону.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза состоит из двух субъединиц. Более крупная α -субъединица (100–140 кДа) имеет от 8 до 12 трансмембранных сегментов (известно три изоформы), при этом оба терминальных участка (N и C) расположены в цитоплазме. Она отвечает за ферментативную активность, предоставляет участки для связывания с ней нуклеотидов с целью последующего фосфорилирования (между 4-м и 5-м сегментами). Меньшая β -субъединица (35–40 кДа) расположена преимущественно во внеклеточном пространстве (C-терминаль), и лишь один из ее сегментов пронизывает плазмалемму. Окончательно ее функция не установлена. Представлена β -субъединица тремя изоформами, две из которых (β_1 и β_2) обнаружены в нервной ткани.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза играет важную роль в поддержании осмотического давления в клетке. При снижении ее активности увеличивается внутриклеточная концентрация натрия, а затем и хлора, что вызывает приток воды и набухание клетки. Таким образом, организм животного способен регулировать поступление воды в ткани за счет перераспределения ионов по разные стороны от мембраны. У растений избыточному осмотическому давлению воды, способному повредить мембрану, препятствует твердая клеточная стенка, а простейшие используют специальную вакуоль, периодически удаляющую избыток жидкости из их организма.

Не менее значимая роль принадлежит кальциевым насосам (Ca^{2+} -АТФазам). Существует два пути переноса излишков ионов кальция из цитозоля и, как следствие, два типа Ca^{2+} -АТФаз:

1) АТФазы внутриклеточных органелл: предназначены для транспортировки ионов кальция во внутриклеточные депо (эндоплазматический ретикулум и митохондрии). Кальциевый цикл аналогичен циклу $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы, за исключением того, что возврат к исходной конформации, вследствие дефосфорилирования, происходит без предварительного связывания какого-либо иона. За время одного цикла в органеллы переносятся два иона кальция и гидролизуется одна молекула АТФ. Насос не является электрогенным, т. е. транспорт Ca^{2+} не сопровождается созданием разности потенциалов на мембране органелл за счет высокой ее проницаемости для других ионов. Молекула Ca^{2+} -АТФазы представляет собой полипептидную цепочку массой 100 кДа, структура которой схожа со строением α -субъединицы $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы;

2) АТФаза плазматической мембраны: принципиально не отличается от рассмотренной выше, за исключением того, что в ходе цикла осуществляется перенос одного иона кальция на внешнюю сторону.

В растительных клетках, грибах и бактериях вместо натриевого градиента на мембране создается градиент протонов. Он обеспечивается благодаря наличию H^+ -АТФаз в мембране (плазматической и вакуолярной) клеток указанных организмов. H^+ -АТФазы обнаружены и в животных клетках, где они используются для перекачки протонов против их электрохимического градиента в ряд органелл (лизосомы), что приводит к установлению нового уровня pH, оптимального для работы тех или иных, как правило протеолитических, ферментов.

Отдельно стоит отметить наличие $\text{K}^+ - \text{H}^+$ -АТФаз в мембране обкладочных клеток желудка, продуцирующих соляную кислоту, а также трансмембранный перенос H^+ в ходе электронного транспорта при окислительно-восстановительных реакциях в митохондриях и хлоропластах.

ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Ионный канал представляет собой наиболее простое решение проблемы транспорта заряженных частиц через клеточную мембрану. Через гидрофильную пору, им образованную, за секунду проходит более 100 000 ионов, что на много порядков превышает скорость пассивной (облегченной) диффузии и активного транспорта. Любой ионный канал, в отличие от обычной водной поры, характеризуют два важнейших свойства:

1. Избирательность (селективность): ионы способны беспрепятственно проникать только через каналы, специально приспособленные для

транспортировки того или иного иона через мембрану. Это стало возможным вследствие различий самих ионов (табл. 3). Так, ионы неодинаковы по величине (атомному радиусу), трехмерной конфигурации, величине и знаку заряда, а также количеству водных оболочек (гидратационному числу). Последнее различие наиболее существенно и зачастую определяет характер взаимодействия иона с белками канала.

Таблица 3

Атомные радиусы и гидратационное число ряда физиологически важных ионов

Ион	Радиус иона в кристалле, нм	Гидратационное число, шт.
Na ⁺	0,095	4,5
K ⁺	0,133	2,9
Ca ²⁺	0,099	7,0
Mg ²⁺	0,066	10,0
Cl ⁻	0,181	2,9

Отделение водных оболочек (что является необходимым требованием для прохождения иона через канал) происходит с затратой энергии и является лимитирующим фактором, ограничивающим пропускную способность канала. Пространственные и связанные с электростатическим отталкиванием ограничения проводимости через канал также имеют место.

Проницаемость мембраны для иона определяется по формуле $P_{ion} = \frac{u \cdot \beta \cdot R \cdot T}{\alpha \cdot F}$, где u – подвижность иона, β – коэффициент распределения между мембраной и раствором, α – толщина мембраны, F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура. Часто между понятиями «проницаемость» и «проводимость» ставят знак равенства, хотя последняя зависит не только от проницаемости, но также от количества и распределения ионов по обе стороны мембраны.

2. Управляемость: ионные каналы не находятся постоянно в открытом состоянии (в противном случае не приходилось бы говорить о важности их работы, направленной на поддержание ионных концентраций внутри и вне клетки). Базовый переход из открытого состояния в закрытое определяется конформационными изменениями белка канала и регулируется (управляется) факторами (сигналами), поступающими снаружи или изнутри клетки. Нахождение канала в открытом или закрытом состоянии определяется случайными флуктуациями конформации белка. Сигналы, повышающие (понижающие) проницаемость канала, увеличи-

вают (уменьшают) *вероятность* нахождения структурного белка в той или иной конформации.

В настоящее время известно более чем 100 ионных каналов. Все это разнообразие структур можно классифицировать лишь на основании двух присущих им фундаментальных свойств.

В зависимости *от условий*, определяющих открытие (закрытие) ионного канала, выделяют:

- **активируемые натяжением** (*stress-activated, stretch-activated*) **каналы**: их открытие (закрытие) контролируется механическими силами, приложенными к белковым молекулам, образующим эти каналы. Стериоцили волосковых клеток кортиевого органа внутреннего уха соединены друг с другом при помощи тонких филаментов (нитей). Колебания базальной и покровных мембран кортиевого органа вызывают отклонения стериоцилей и, как следствие, натяжение филаментов. В результате они тянут на себя прикрепленные участки белка, вызывая открытие канала и последующее поступление внутрь клетки положительно заряженных ионов, что является первым этапом формирования нервного импульса. Филаменты сокращаются всего на $0,4 \text{ \AA}$, и для этого необходимо усилие в $2 \times 10^{-13} \text{ Н}$, что свидетельствует о чрезвычайной чувствительности всей системы.

Активируемые натяжением каналы обнаружены и в секреторных клетках, а также в пресинаптических терминалях нервно-мышечного соединения. Все они обладают достаточно низкой селективностью;

- **управляемые напряжением** (*voltage-gated*) **каналы**: играют ключевую роль в распространении электрических сигналов. Их общим свойством является наличие заряженных областей (*сенсоров напряжения*), особенно чувствительных к уровню мембранного потенциала. В результате образуется своеобразная петля контроля: проводимость ионных каналов определяет мембранный потенциал, а последний, в свою очередь, регулирует работу ионных каналов. Данный тип каналов широко распространен как в животном мире, так и среди растительных организмов и простейших;

- **лиганд-управляемые** (*ligand-gated*) **каналы**: для их активации необходимо связывание белка канала с молекулой или молекулами какого-либо вещества (лигандом). Лиганд может присоединяться к белку канала как с внешней стороны (нейромедиаторы), так и со стороны цитозоля (циклические нуклеотиды). Указанный тип каналов формирует особую

структуру, взаимодействие с которой химических молекул вызывает ответную реакцию клетки – *ионотропный рецептор*. При этом в качестве лигандов выступают нейромедиаторы – ацетилхолин, ГАМК, глицин и т. п. Активация лиганд-управляемых каналов приводит к изменению проницаемости мембраны для целого спектра ионов, прежде всего Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^- . Подробное описание структуры лиганд-управляемых каналов приводится в главах 9–11.

ОСНОВНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН

Второй принцип, положенный в основу классификации ионных каналов, – селективность по отношению к тому или иному иону. Четыре иона вносят решающий вклад в процессы межклеточной коммуникации – Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^- . Ниже приводится краткая характеристика ионных каналов, предназначенных для их трансмембранного переноса.

1. **Na^+ -каналы:** базово подразделяются на *потенциал-зависимые* (управляемые напряжением) и *потенциал-независимые* (лиганд-управляемые) группы.

Управляемые напряжением Na^+ -каналы (рис. 11) состоят из одной крупной α -субъединицы (260 кДа) и расположенных по бокам двух осевых β -субъединиц (36 кДа для β_1 и 33 кДа для β_2).

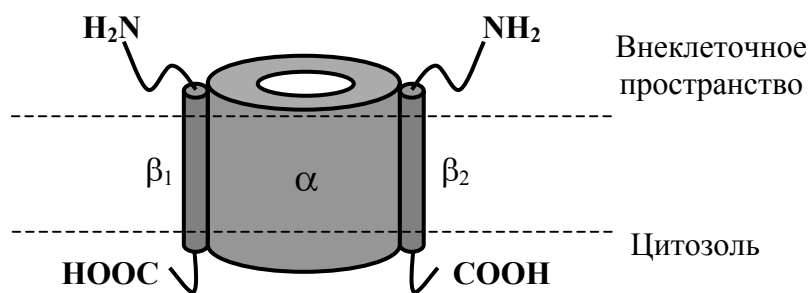


Рис. 11. Субъединичное строение Na^+ -канала
(по E. Marban et al., 1998)

Именно α -субъединица образует трансмембранную пору и ее наличия достаточно для функционирования канала, а β -субъединица выполняет модулирующую роль. Крупная α -субъединица (рис. 12) состоит из четырех гомологичных доменов (I–IV), каждый из которых представлен шестью трансмембранными сегментами (S1–S6).

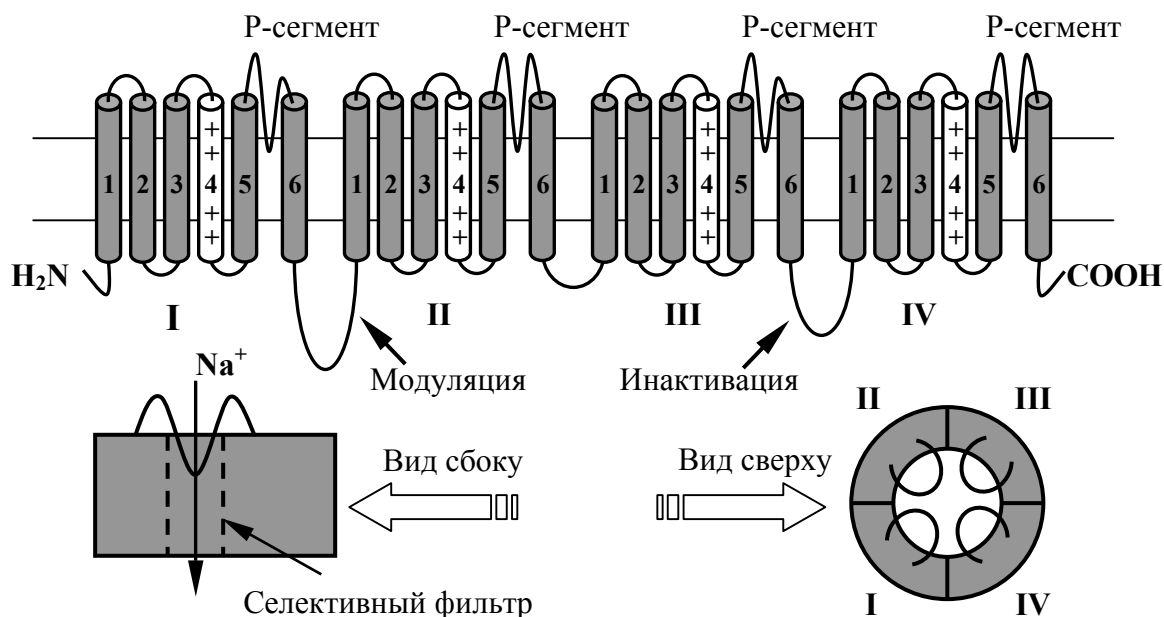


Рис. 12. Структура α -субъединицы потенциал-зависимого Na^+ -канала (по E. Marban et al., 1998)

Между сегментами S5 и S6 расположен окружающий пору сегмент (*P-segment*). В каждом домене сегмент S4 содержит положительно заряженные аминокислоты, обеспечивая работу воротного механизма при сдвигах мембранного потенциала, т. е. выступает в качестве сенсора напряжения. Так, в ходе деполяризации внутренняя сторона мембраны на короткий момент времени становится положительно заряженной, что вызывает смещение сегментов S4 (одноименные заряды отталкиваются друг от друга) в направлении внеклеточной среды, увеличивая вероятность пребывания канала в открытом состоянии (рис. 13).

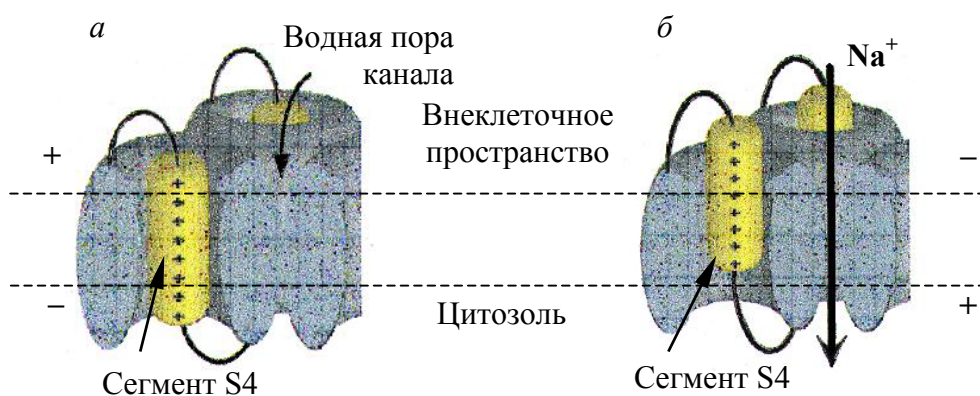


Рис. 13. Сенсор напряжения потенциал-зависимого Na^+ -канала (по E. Marban et al., 1998):

a – гиперполяризация (канал закрыт); *б* – деполяризация (канал открыт)

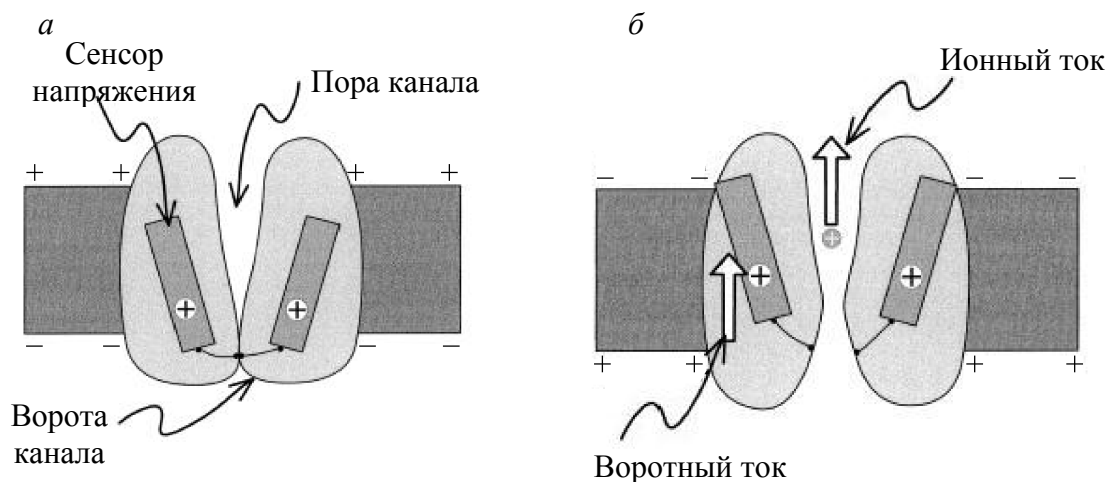


Рис. 14. Работа сенсора напряжения потенциал-зависимого канала (по F. Bezanilla, 2000):
а – канал закрыт; б – канал открыт

Короткая внутриклеточная петля, соединяющая III и IV домены, складываясь, блокирует пору канала и обеспечивает его инактивацию при длительной деполяризации мембраны. Такая модель «шара на цепочке» (см. ниже рис. 16) была предложена К. Армстронгом и Ф. Безанилла (С. М. Armstrong, F. Bezanilla, 1973), которые первыми зарегистрировали вызываемый смещением этого сегмента *воротный ток* (рис. 14).

Таким образом, существует три состояния, в которых может находиться Na^+ -канал: закрытое, открытое и инактивированное. При этом ионы натрия способны проходить через канал, только когда он открыт (на начальном этапе развития потенциала действия в фазе деполяризации), и не способны пересекать мембрану при закрытом (в состоянии покоя мембраны) и инактивированном (на конечном этапе развития потенциала действия в фазе реполяризации) его состояниях.

Все потенциал-управляемые Na^+ -каналы относятся к одному семейству, кодируемому генами, расположенными преимущественно во 2, 3, а также 17-й хромосоме. К 2003 г. на основании локализации в тканях и фармакологических свойств (способности блокироваться тем или иным веществом) было выделено девять изоформ потенциал-управляемых Na^+ -каналов.

2. Среди **K^+ -каналов** выделяют несколько групп, обладающих рядом общих свойств. Так, для любого K^+ -канала характерно наличие заполненной водой поры, предназначенной для прохождения ионов калия; селективного фильтра, пропускающего через канал только ионы калия, и воротного механизма, благодаря которому возможен переход из открытого состояния в закрытое и наоборот.

Молекулярное строение K^+ - и Na^+ -каналов сходно. Основу трансмембранной поры образуют четыре α -субъединицы, а по бокам от нее в цитозоле расположены осевые β -субъединицы, выполняющие модуляторную роль.

Если пора образована α -субъединицами одной изоформы, то такие каналы называются *гомомерными* (гомотетрамерными), если разными изоформами – *гетеромерными* (гетеротетрамерными). В зависимости от количества трансмембранных сегментов в α -субъединице K^+ -каналы подразделяются на три группы:

1) Каналы, содержащие шесть трансмембранных сегментов (S1–S6). Окружающий пору сегмент (*P-segment*) располагается между S5 и S6, а положительно заряженный сегмент S4 служит сенсором напряжения (рис. 15).

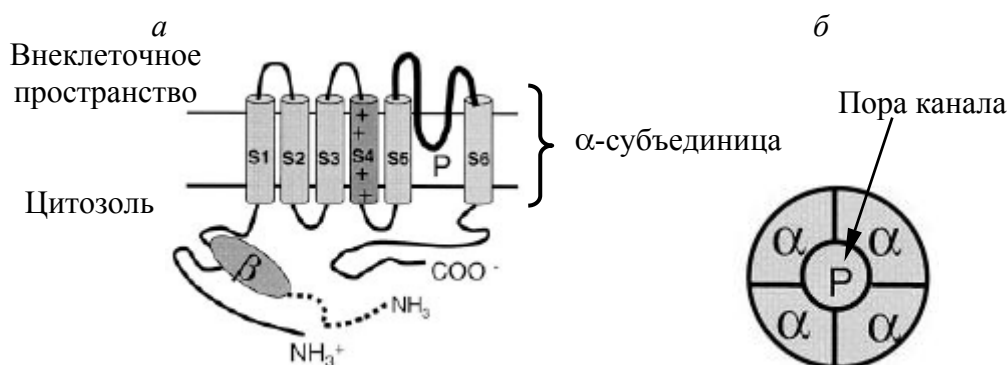


Рис. 15. Схема строения α -субъединицы K^+ -канала (а) и взаимное расположение α -субъединиц K^+ -канала (б), содержащего шесть сегментов (по С.-С. Shieh, 2000)

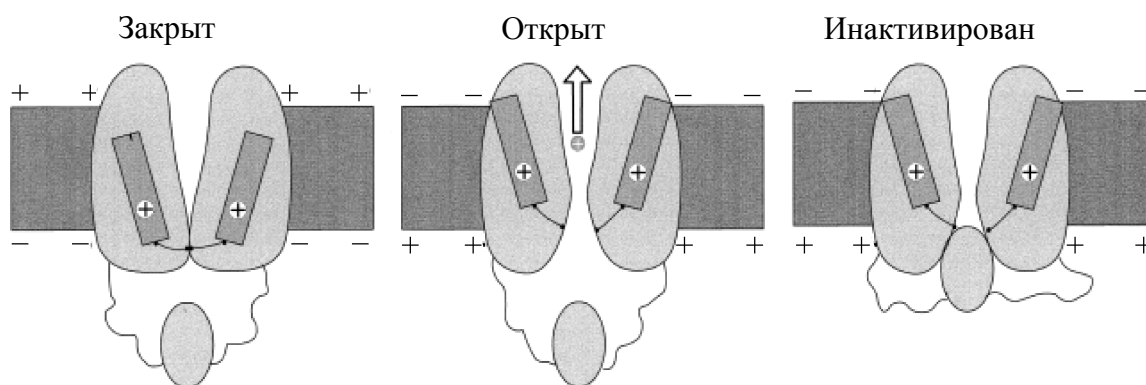


Рис. 16. Схематическое изображение трех возможных состояний K^+ -канала и модель «шара на цепочке» (по F. Bezanilla, 2000)

Эти каналы могут находиться в трех состояниях: открытом, закрытом, инактивированном (рис. 16). В зависимости от того, какой участок белковой молекулы участвует в инактивации, выделяют N-(N-терминаль), C-(C-терминаль) или P-(P-сегмент) инактивацию. К указанной группе относятся многие потенциал-зависимые каналы, в том числе каналы типа *Shaker* (впервые был обнаружен у мутантов дрозофилы, которые начинали трепетать при эфирной анестезии); калиевые каналы *затянутого выпрямления* (K^+ -каналы, активирующиеся на конечном этапе развития потенциала действия, обеспечивая фазу реполяризации); *быстро инактивирующиеся калиевые каналы* (А-каналы, играющие важную роль в генерации ритмической активности); *медленно активирующиеся калиевые каналы* (K_s) и Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (важны для развития следовой гиперполяризации).

2) Каналы, содержащие два трансмембранных сегмента с P-сегментом между ними. Важной структурной особенностью является отсутствие сенсора напряжения в структуре этих каналов (рис. 17, а).

Первая их группа представлена *АТФ-зависимыми K^+ -каналами*, нечувствительными к изменению мембранного потенциала. В норме они находятся в закрытом состоянии, однако при снижении внутриклеточной концентрации АТФ переходят в открытое состояние.

Вторая группа представлена *калиевыми каналами внутреннего выпрямления (K_{ir})*. Они обеспечивают движение калия внутрь клетки в случаях, когда мембранный потенциал становится отрицательным по отношению к равновесному потенциалу для калия. Со стороны цитозоля их проводимость регулируется Mg^{2+} и полиаминами (спермин, спермидин).

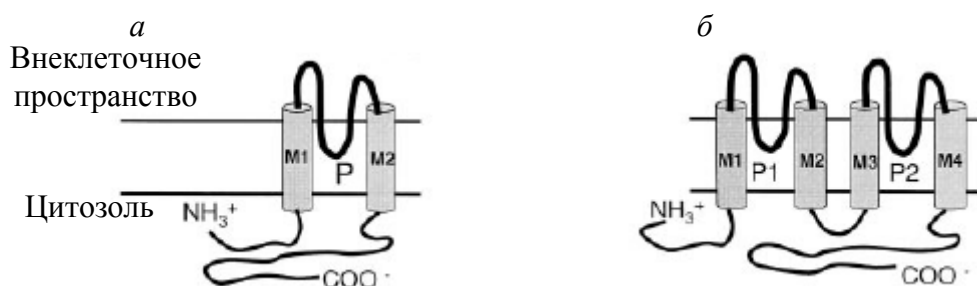


Рис. 17. Схема строения K^+ -каналов, содержащих два (а) и четыре (б) трансмембранных сегмента (по С.-С. Shieh, 2000)

3) Каналы, содержащие четыре трансмембранных сегмента с двумя Р-петлями. Также не содержат сенсора напряжения. Функционально схожи с предыдущей группой, обладая менее выраженными свойствами внутреннего выпрямления (рис. 17, б).

Особую в функциональном отношении группу представляют калиевые S-каналы, слабо чувствительные к напряжению на мембране. Они обнаружены в нейронах *Aplysia* будучи открытыми в состоянии покоя и закрываясь при действии на клетку серотонина.

В настоящее время известно свыше 200 генов (более 50 у человека), кодирующих белки калиевых каналов, расположенных в различных хромосомах.

3. Достаточно большим количеством различных типов представлены **Ca²⁺-каналы**. Для них также характерно первичное подразделение на потенциал- и лиганд-управляемые. Существует три уровня (принципа) классификации управляемых напряжением Ca²⁺-каналов.

В зависимости от величины сдвига мембранного потенциала, необходимого для активации канала, различают *низко-*(HVA, high voltage-activated) и *высоко-*(LVA, low voltage-activated)*пороговые* Ca²⁺-каналы. Кроме этого каналы могут различаться по своим одиночным характеристикам, кинетике активации и инактивации.

Поиск фармакологических препаратов, способных избирательно блокировать поток кальция через указанные каналы, привел к дальнейшему выделению их подтипов:

1) Ca²⁺-каналы L-типа – HVA-каналы, чувствительные к действию дигидропиридинов;

2) Ca²⁺-каналы N-типа – HVA-каналы, нечувствительные к действию дигидропиридинов;

3) Ca²⁺-каналы P, Q и P/Q-типа были выделены в ходе исследования фармакологических свойств HVA-каналов клеток Пуркинье мозжечка;

4) LVA-каналы были отнесены к **Ca²⁺-каналам T-типа** (от *transient* – временный);

5) Ca²⁺-каналы R-типа (от *residual* – остаточный) по степени активации занимают промежуточное положение между низко- и высокопороговыми Ca²⁺-каналами. Они блокируются никелем в низких концентрациях.

Потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы образованы пятью разными субъединицами: α_1 , α_2 , β , γ (найдена только в Ca²⁺-каналах скелетных мышц) и δ (рис. 18).

Установлено, что α_2 - и δ -субъединицы при помощи S–S-связей соединены в единый комплекс ($\alpha_2\delta$). В нервной системе млекопитающих комплекс из α_1 , $\alpha_2\delta$ и β образует Ca²⁺-канал.

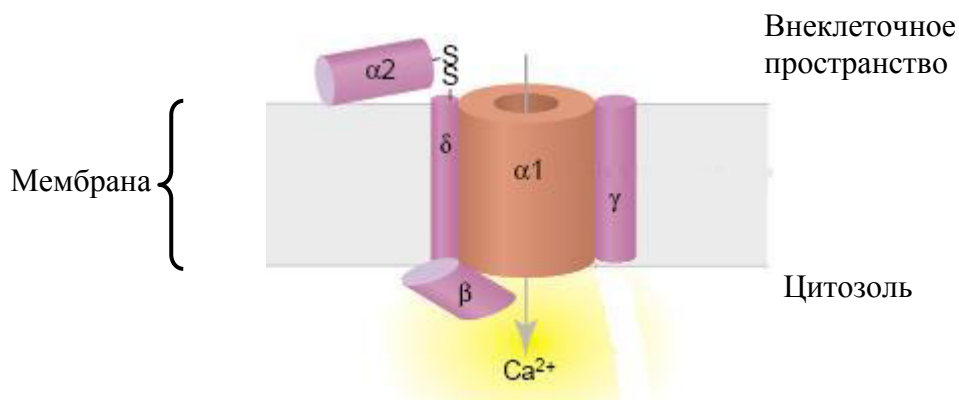


Рис. 18. Субъединичное строение потенциал-управляемого Ca^{2+} -канала (по J. D. Spafford, G. W. Zamponi, 2003)

При этом трансмембранная пора образована α_1 -субъединицей (190–250 кДа), сходной по своему строению с α -субъединицей Na^+ -канала: четыре домена с шестью трансмембранными сегментами в каждом, Р-петля между сегментами S5 и S6, а сегмент S4 в качестве сенсора напряжения (рис. 19).

За инактивацию Ca^{2+} -канала отвечает β -субъединица. К 2003 г. было известно по крайней мере десять генов, кодирующих α_1 -субъединицу, и четыре гена для β -субъединицы.

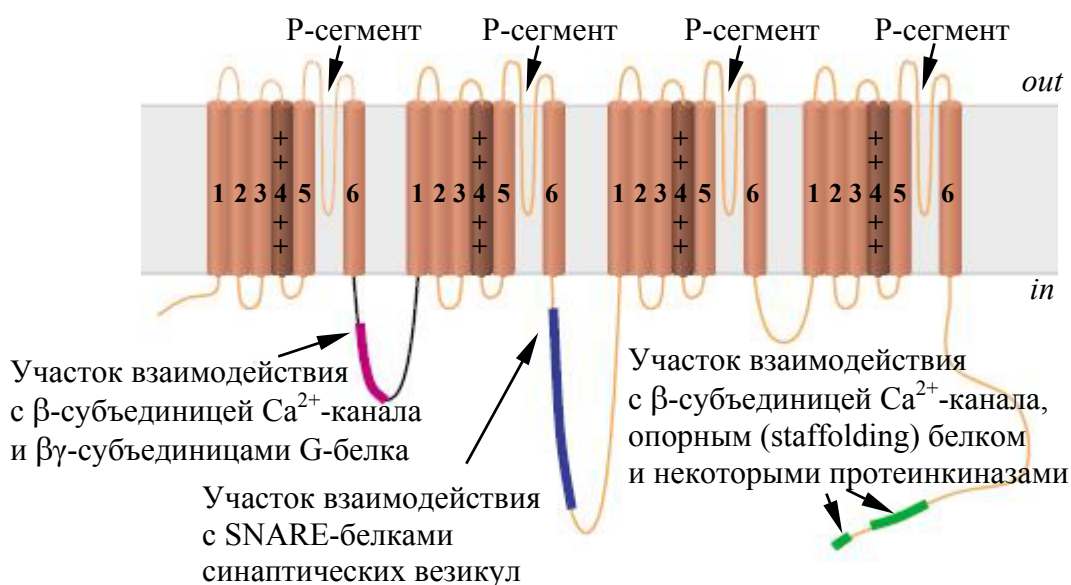


Рис. 19. Строение α -субъединицы потенциал-управляемого Ca^{2+} -канала (по J. D. Spafford, G. W. Zamponi, 2003)

На основании гомологии выделяют три семейства Ca^{2+} -каналов:

- каналы L-типа;
- каналы P/Q, N и R-типов;
- каналы T-типа.

В пределах семейства гомология составляет 70 % , а между семействами – 40 % .

4. Наиболее функционально значимые **СГ-каналы** относятся к лиганд-управляемым каналам, представляя собой ионотропные рецепторы для таких нейромедиаторов, как ГАМК и глицин. Потенциал-управляемые каналы встречаются реже и изучены значительно хуже. Впервые они были выявлены в электрическом органе ската (*Torpedo*). Вероятность их открытия возрастает при деполяризации и закислении среды. Канал состоит из 13 гидрофобных доменов, 11 из которых расположены внутри мембраны. В плазмалемме канал для ионов хлора функционирует в форме димера, при этом каждая субъединица формирует собственный независимый канал.

|| Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы демонстрируют слабую потенциал-зависимость. Они вовлечены в регуляцию объема клетки.

5. **Неселективные ионные каналы** были обнаружены в нервной ткани беспозвоночных и низших позвоночных. Обладают сильной потенциал-зависимостью, будучи хорошо проницаемыми для катионов (в том числе и двухвалентных, т. е. для Ca^{2+}) и анионов. В ряде случаев их активность регулируется ионами кальция. Физиологическая роль не ясна.

|| Предполагается, что благодаря им происходит обновление внутриклеточного ионного состава. Это в свою очередь усиливает открытие других ионных каналов и позволяет нервным окончаниям оставаться деполяризованными при залповой активности нейрона.

Ионные каналы закладывают физическую основу не только электрической возбудимости мембраны, но также определяют протекание пре- и постсинаптических процессов.

ГЛАВА 3 ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ КЛЕТОК

ТИПЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ

Нервные клетки способны генерировать электрические сигналы в результате изменения ионных токов, протекающих через плазмалемму. В основе наблюдаемого явления лежит способность клетки поддерживать разность электрических потенциалов между обеими сторонами ее мем-

браны – **мембранный потенциал**, или **потенциал покоя**. Этот потенциал остается относительно постоянным в течение длительного времени в случае отсутствия какой-либо внешней активации нейрона. При этом внутреннее содержимое клетки заряжено отрицательно по отношению к окружающей среде (рис. 20).

Впервые прямое измерение потенциала покоя независимо осуществили А. Ходжкин и А. Хаксли (A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, 1939), а также Х. Кёртис и К. Коул (H. J. Curtis, K. S. Cole, 1942) для гигантского аксона кальмара (диаметром 1 мм). При этом заполненная солевым раствором (чтобы обеспечить электропроводность) стеклянная микропипетка (*микроэлектрод*) была введена в него с торца (второй микроэлектрод остался снаружи).

В 1946 г. Дж. Грэхем и Р. Джерард (J. Graham, R. Gerard, 1946) разработали способ изготовления стеклянных микропипеток с диаметром кончика меньше 1 мкм. Исследователи получили возможность регистрировать электрическую активность практически любых клеток, не причиняя им серьезных повреждений, вводя в них микроэлектрод напрямую. Заполненная раствором электролита микропипетка при помощи неполяризующихся металлических электродов (Ag/AgCl) соединяется с регистрирующим (вольтметр, амперметр) или стимулирующим (генератор) устройством.

Величина мембранного потенциала в среднем составляет -60 мВ и различна для клеток разных типов тканей. Так, для нейронов разброс значений может составлять от -40 до -70 мВ, для клеток поперечно-полосатой мускулатуры -90 , а для гладкомышечных клеток -30 мВ.

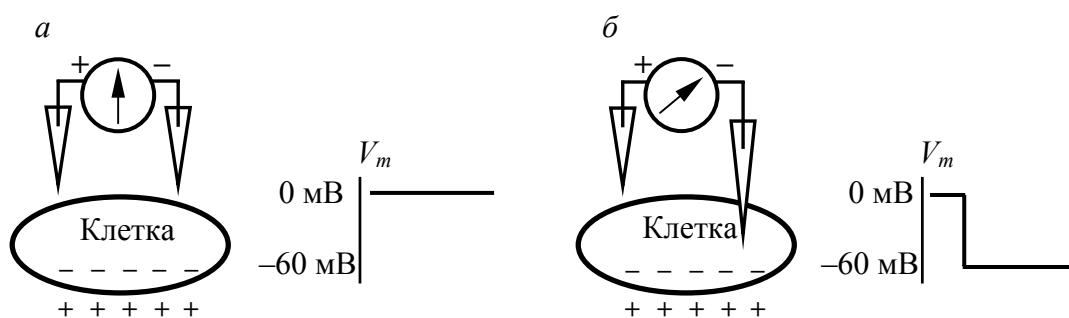


Рис. 20. Внутриклеточная регистрация мембранного потенциала:
 а – микроэлектроды вне клетки (мембранный потенциал равен нулю);
 б – один микроэлектрод оказывается внутри клетки
 (мембранный потенциал равен -60 мВ)

Внутри клетки одновременно можно поместить два и более микроэлектродов, что позволяет изучать реакции мембраны клеток в условиях прямого эксперимента. Если на внутриклеточный электрод подать положительный потенциал, а на внеклеточный отрицательный, то через мембрану наружу будет выходить ток.

За направление электрического тока условно принято считать движение положительно заряженных частиц, т. е. ток протекает от положительного полюса (электрода) к отрицательному.

Поляризация мембраны при этом заметно снизится, поскольку внутренность клетки станет менее электроотрицательной по отношению к наружной среде – произойдет *деполяризация*. Напротив, искусственное увеличение отрицательного потенциала на внутриклеточном и положительного потенциала на внеклеточном электродах заставляет ток входить внутрь клетки. Это увеличивает поляризацию мембраны, так как внутренность клетки становится более электроотрицательной по отношению к окружающей среде – происходит *гиперполяризация* (рис. 21).

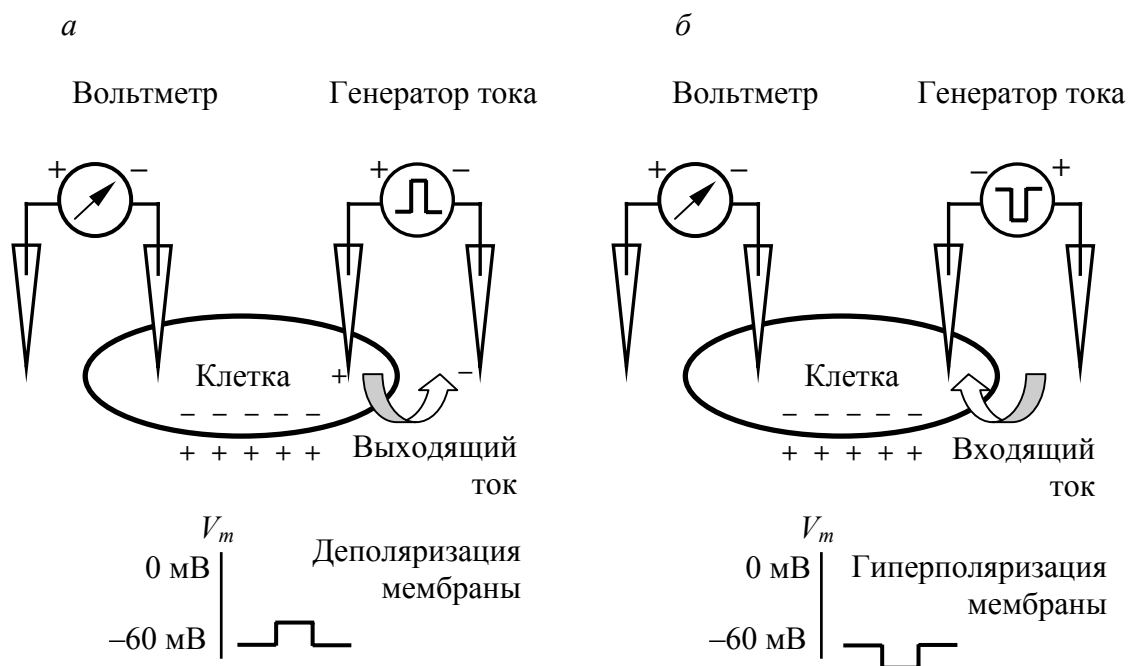


Рис. 21. Внутриклеточная стимуляция:

а – деполяризация клетки; *б* – гиперполяризация клетки.
Пара регистрирующих электродов соединена с вольтметром (регистрирует любые изменения мембранного потенциала), а пара стимулирующих электродов соединена с генератором тока (используется для пропускания тока через мембрану клетки)

Слабый толчок (прямоугольный импульс) входящего (гиперполяризующего) или выходящего (деполяризующего) тока вызывает небольшую гипер-(де-)поляризацию клетки, которая плавно уменьшается со временем и расстоянием. Эти малые, вызываемые импульсом тока, сдвиги мембранного потенциала называются **электротонном** (*электротоническим потенциалом*). Они распространяются *пассивно*, т. е. амплитуда исходного сигнала постепенно уменьшается по мере его распространения вдоль тела клетки. Повышение (снижение) амплитуды начального импульса тока приводит к пропорциональному увеличению (уменьшению) электротонического потенциала.

В случаях, когда потенциал на мембране снижается до некоторой критической величины, например, при увеличении выходящего тока, наблюдается кратковременная (1–10 мс) активная реакция клетки – **потенциал действия** (*спайк*), представляющий собой сдвиг мембранного потенциала в положительном направлении (рис. 22). Мембранный потенциал, при котором возникает потенциал действия, носит название **порогового**. В ходе развития потенциала действия потенциал на мембране не только падает до нуля, но и на короткий момент времени, на пике своего развития, становится положительным (+55 мВ). Реверсия (обращение) потенциала от 0 до +55 мВ называется «овершутом» (*overshoot*). Как правило, возвращение к исходному состоянию покоя сопровождается незначительным (5–10 мВ) и непродолжительным увеличением поляризации клетки (гиперполяризационный **следовой потенциал** – *undershoot*).

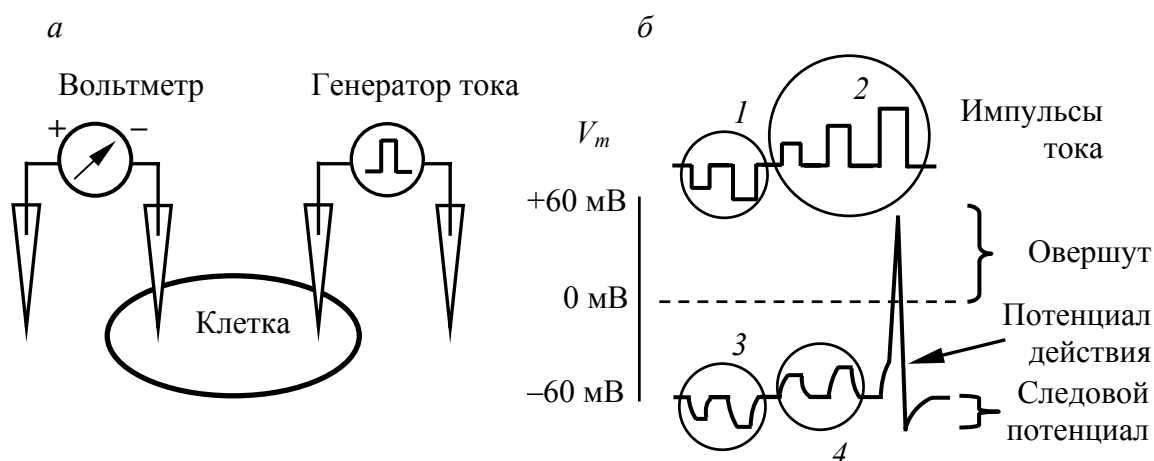


Рис. 22. Электротонические потенциалы и потенциал действия:

a – схема эксперимента; *б* – изменения мембранного потенциала:

1 – входящий ток; 2 – выходящий ток;

3 – гиперполяризация мембраны; 4 – деполяризация мембраны

Потенциал действия генерируется по принципу «все или ничего» – увеличение силы электрического стимула сверх пороговой не увеличивает амплитуду потенциала действия и не изменяет его формы. Потенциал действия распространяется *активно* – без потери амплитуды, вплоть до конечного участка выроста нервной клетки (аксона или дендрита), где под его влиянием инициируется *синаптическая передача* (подробнее о ее механизме см. гл. 5).

В постсинаптической клетке под влиянием пресинаптического нейрона возникают *синаптические потенциалы* двух типов: **возбуждающий и тормозный постсинаптические потенциалы** (ВПСП и ТПСП соответственно). ВПСП приводит к появлению направленного наружу, через несинаптическую мембрану, деполяризующего тока, приближающего исходный мембранный потенциал к пороговому уровню и, следовательно, к генерации потенциала действия. ТПСП, напротив, вызывает появление трансмембранного, входящего внутрь через несинаптическую мембрану, гиперполяризующего тока. При этом мембранный потенциал клетки отдалается от порогового (рис. 23).

Постсинаптические потенциалы распространяются внутри клетки электротонически. Реакция постсинаптических структур во многом определяется характером взаимодействия возбуждающих и тормозных постсинаптических потенциалов.

Амплитуда одиночного В(Т)ПСП в большинстве синапсов ЦНС часто менее 1 мВ, что на порядок меньше величины, на которую надо деполяризовать клетку для достижения порогового потенциала. Поэтому одиночный постсинаптический потенциал не в состоянии кардинально изменить мембранный потенциал постсинаптической клетки, а следовательно, и ее возбудимость.

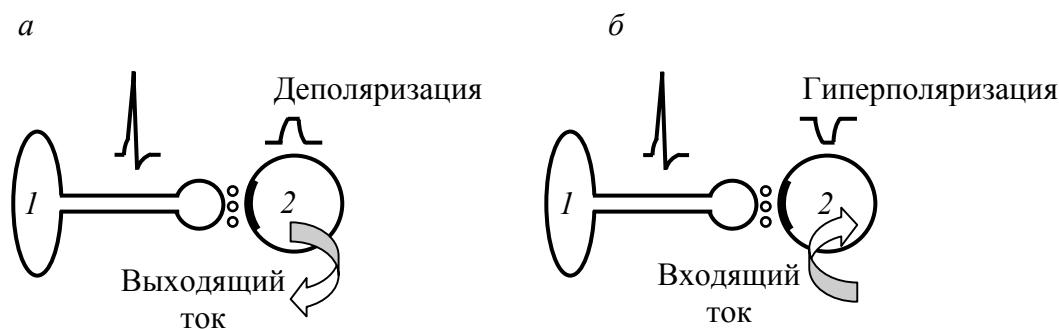


Рис. 23. Возбуждающий (а) и тормозный (б) постсинаптический потенциал:
1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН НЕЙРОНОВ

Пассивные (*кабельные*) свойства клетки обуславливают распространение электрических сигналов в пределах нейрона. Наиболее широко распространенной физической аналогией нейрона как электрической системы, позволяющей описать поведение любой из его частей в подпороговом диапазоне, является подводный кабель.

Указанная модель состоит из четырех пассивных электрических элементов:

- **малое сопротивление** сердцевины кабеля (цитоплазмы нейрона);
- **малое сопротивление** океанской воды (внеклеточной жидкости);
- **большое сопротивление** изолирующей оболочки (мембраны);
- **ёмкость** изолирующей оболочки (мембраны).

Сопротивление и ёмкость мембраны включены в электрическую цепь параллельно друг другу. Пассивные электрические свойства нейрона легко оценить, пропуская при помощи микроэлектродов через мембрану клетки де-(гипер-)поляризующие токи.

Электрические элементы называются пассивными, т. к. они не изменяют своих свойств при изменении подаваемого на них напряжения. Активные реакции, напротив, обусловлены изменением сопротивления мембраны.

Сопротивление (R). Представляет собой отношение изменения мембранного потенциала (ΔV_m) к току (I), протекающему через мембрану, выражается в омах (Ом) и характеризует ее способность препятствовать протеканию тока. Величина, обратная сопротивлению, наоборот, характеризует способность мембраны пропускать ток – *проводимость* (G). Понятно, что уменьшение сопротивления мембраны эквивалентно увеличению ее проводимости. Поскольку исходная схема опыта предусматривает протекание тока не только через мембрану, но и через цитоплазму нейрона, прежде чем он достигнет микроэлектрода, то логичнее говорить о суммарном *входном сопротивлении* (R_{input}), величина которого определяется законом Ома:

$$R_{input} = \frac{\Delta V_m}{I}.$$

В зависимости от геометрии и размеров клетки сопротивление мембраны колеблется в пределах от 10^5 до 10^8 Ом (чем меньше клетка, тем выше ее входное сопротивление). Входное сопротивление, по сути, обусловлено сопротивлением току со стороны мембраны, поскольку *удельным сопротивлением цитоплазмы* (R_i), равным ~ 50 Ом·см, можно пренебречь, равно как и *внеклеточным сопротивлением* (r_o). Мембранное

сопротивление (R_m) соответствует поперечному сопротивлению 1 см^2 мембраны и позволяет сравнивать свойства мембран у клеток различной формы, поскольку при измерении входного сопротивления геометрия и размеры нейрона не учитываются. Мембранное сопротивление нейронов моллюска равно $100\,000 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$, маутнеровских нейронов миноги – $16\,000 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$, перехватов Ранвье аксона лягушки – $20 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$.

Таким образом, сопротивление мембраны клетки определяется:

- **мембранным сопротивлением (R_m)**, определяющим ее проницаемость для переносчиков электрического заряда (ионов);
- **суммарной площадью поверхности мембраны** – чем больше поверхность, тем ниже сопротивление, поскольку увеличивается количество параллельных путей для протекания тока через мембрану.

Ёмкость (C). Представляет количественную меру, характеризующую способность мембраны удерживать электрический заряд. Поэтому емкость – это элемент электрической цепи, оказывающий сопротивление любым изменениям потенциала. Ток течет в емкость или из емкости только при изменении напряжения на ней и до тех пор, пока она не зарядится до потенциала, равного подаваемому на нее. Толчки тока, подаваемые на мембрану, можно заставить нарастать и спадать очень быстро, но мембранный потенциал (за счет емкости) будет изменяться медленно (см. рис. 22). Емкость не препятствует изменению потенциала на мембране, а лишь замедляет его повышение или снижение.

Емкость состоит из двух проводников (цитоплазмы и внеклеточной жидкости), разделенных изолятором (белково-липидной мембраной). Благодаря емкостным свойствам, клетки могут накапливать заряды. Изменение мембранного потенциала вызывает возникновение на внутренней и внешней сторонах мембраны заряда, пропорционального ΔV_m . Таким образом, *входная емкость мембраны (C_{input})* определяется как отношение заряда (в кулонах), возникшего на каждой стороне мембраны, к изменению мембранного потенциала, измеряется в фарадах ($1 \text{ Ф} = 1 \text{ кулон} \times 1 \text{ вольт}$).

$$C_{input} = \frac{q}{\Delta V_m}.$$

Емкость прямо пропорциональна площади поверхности и обратно пропорциональна толщине мембраны. Первое утверждение объясняется тем, что увеличение площади наружного и внутреннего проводников (внеклеточной жидкости и аксоплазмы соответственно) позволяет мембране удерживать больший заряд. В свою очередь, большая толщина мембраны уменьшает взаимодействие зарядов, удерживаемых на ее внешней и внутренней поверхностях. Поскольку толщина клеточной мембраны при-

мерно одинакова для всех клеток (7,5 нм), то *мембранная емкость* (C_m) зависит прежде всего от площади поверхности и рассчитывается на 1 см² поверхности мембраны.

Вольт-амперная характеристика. Позволяет выяснить, является ли входное сопротивление клетки полностью пассивным или оно все же зависит от мембранного потенциала, т. е. демонстрирует активные свойства. На практике это можно установить, пропуская постепенно нарастающие толчки де- или гиперполяризующего тока через мембрану. У некоторых нейронов и большинства невозбудимых клеток отношение $\Delta V_m / \Delta I$ постоянно, т. е. R_{input} (определяемое по наклону вольт-амперной характеристики) постоянно в подпороговой области и не зависит от мембранного потенциала – это и есть *линейная* вольт-амперная характеристика.

У большинства нервных клеток входное сопротивление ведет себя нелинейно, что означает меньшее сопротивление мембраны току, текущему в определенном направлении (рис. 24).

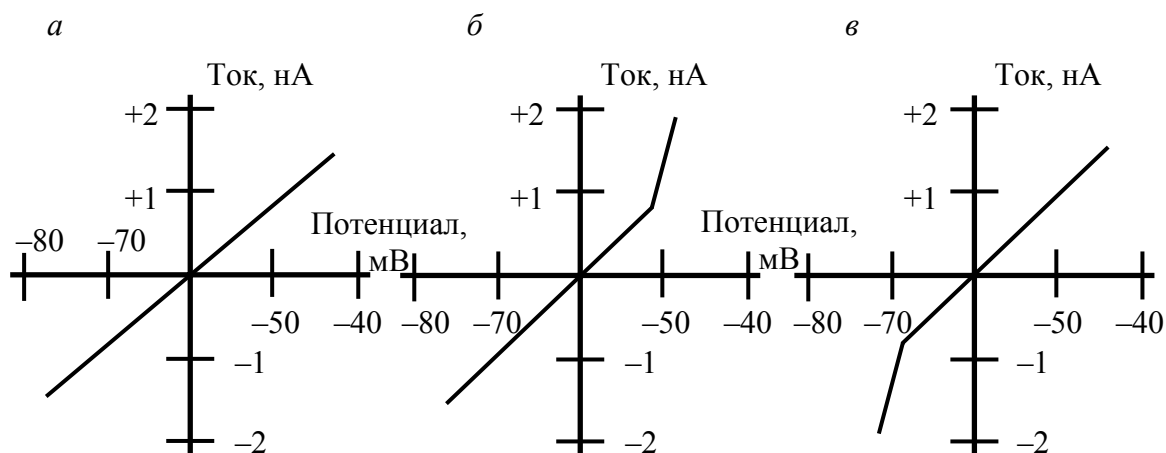


Рис. 24. Вольт-амперные характеристики мембраны:
а – линейная характеристика; б – задержанное выпрямление;
в – аномальное выпрямление

Асимметрия мембранного сопротивления (*выпрямление*) бывает двух видов:

1) задержанное выпрямление – наблюдается при деполяризации мембраны, когда после первоначального скачка в результате отстающего по времени снижения сопротивления мембранный потенциал уменьшается. При этом мембрана оказывает меньшее сопротивление выходящему (деполяризующему) току. Естественно, что для большинства нервных клеток эффект задержанного выпрямления наблюдается вблизи и выше порога потенциала действия, поскольку способствует развитию последнего;

2) аномальное выпрямление – наблюдается при гиперполяризации мембраны, выражаясь в меньшем сопротивлении входящему (гиперполяризирующему) току. Встречается реже, чем задержанное, способствуя торможению работы нейронов.

Когда на мембрану подается толчок тока, он сначала протекает по мембранной емкости, изменяя заряд на ней, – это *емкостной ток* (I_C). Затем, по мере зарядки емкости, ток начинает течь через сопротивление мембраны – это *ток сопротивления*, или *ионный ток* (I_R).

Общий ток, протекающий через мембрану ($I_m = I_R + I_C$), определяется уравнением

$$I_m = \frac{\Delta V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt},$$

где ток сопротивления $I_R = \Delta V_m / R_m$, а емкостной ток равен скорости изменения заряда, т. е. $I_C = dq / dt$, и поскольку $q = C_m \cdot V_m$, то величина емкостного тока определяется величиной мембранной емкости (C_m) и скоростью изменения напряжения (dV_m / dt), т. е. $I_C = C_m \frac{dV_m}{dt}$.

У большинства нервных клеток мембрана сомы и дендритов либо не способна генерировать потенциал действия, либо имеет очень высокий порог, а участки постсинаптических мембран и вовсе электрически невозбудимы. При этом область синапса может быть удалена на значительное (несколько миллиметров) расстояние от *аксонного холмика* (зоны повышенной возбудимости нейрона и места генерации потенциала действия). Именно пассивными свойствами мембраны определяется возможность синаптических потенциалов достигать зоны генерации и вызывать возникновение потенциала действия. Временной ход и пространственное распределение В(Т)ПСП в пределах нейрона определяют *постоянные времени и длины*.

Постоянная времени мембраны (τ_m). Характеризует скорость, с которой мембранный потенциал меняется при переходе от одного значения к другому (рис. 25). В самом начале скорость нарастания электротонического потенциала определяется только емкостью мембраны, а его конечная амплитуда пропорциональна сопротивлению мембраны. Потенциал при этом меняется экспоненциально. Постоянная времени – это время, необходимое для того, чтобы импульс постоянного тока зарядил емкость мембраны на 63 %, точнее, довел заряд до $1 - 1/e$ от его конечного значения (или время, за которое амплитуда исходного импульса падает до

37 % , т. е. $1/e$). Для клетки сферической формы ее значение определяется уравнением

$$\tau_m = R_m \cdot C_m.$$

Величина τ_m в разных клетках составляет от 1 до 100 мс. С увеличением расстояния (в клетках вытянутой формы) наблюдается снижение скорости нарастания (спада) изменений мембранного потенциала.

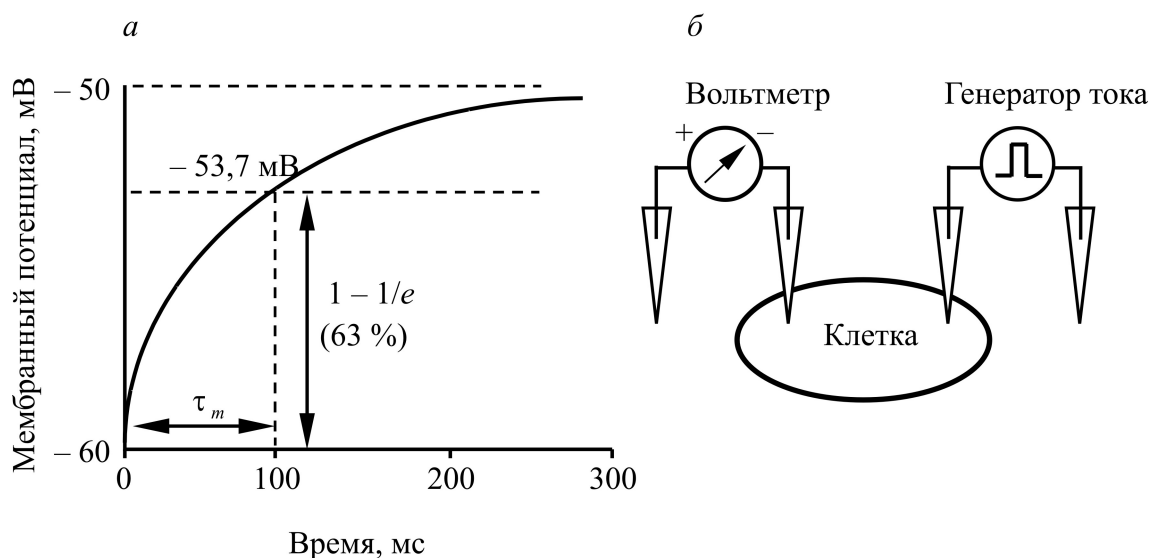


Рис. 25. Постоянная времени:

a – изменение мембранного потенциала в зависимости от времени, прошедшего после импульса постоянного тока; *б* – схема эксперимента

Чем дальше от места пропускания тока находится участок аксона, тем больше пройдет времени, прежде чем в этом месте появится ток, и тем медленнее будет там изменяться мембранный потенциал. Это является следствием того, что для зарядки мембранной емкости необходимо время. Сначала емкость заряжается в участке около источника тока (внутриклеточного микроэлектрода), а только потом ток проходит дальше внутрь клетки, содержимое которой имеет значительное удельное сопротивление, к более удаленным участкам мембраны. В результате меньший ток должен заряжать большие по площади, отдаленные области мембраны. Следствием этого будет снижение скорости зарядки, поэтому скорость изменения мембранного потенциала уменьшится.

Постоянная длины мембраны (λ_m). Характеризует скорость, с которой мембранный потенциал при переходе от одного значения к другому изменяется с расстоянием (рис. 26). Постоянная длины – это расстояние вдоль отростка клетки, на котором напряжение, приложенное к исходной точке на теле клетки (импульс тока), потеряет 63 % , точнее, $1 - 1/e$ своей

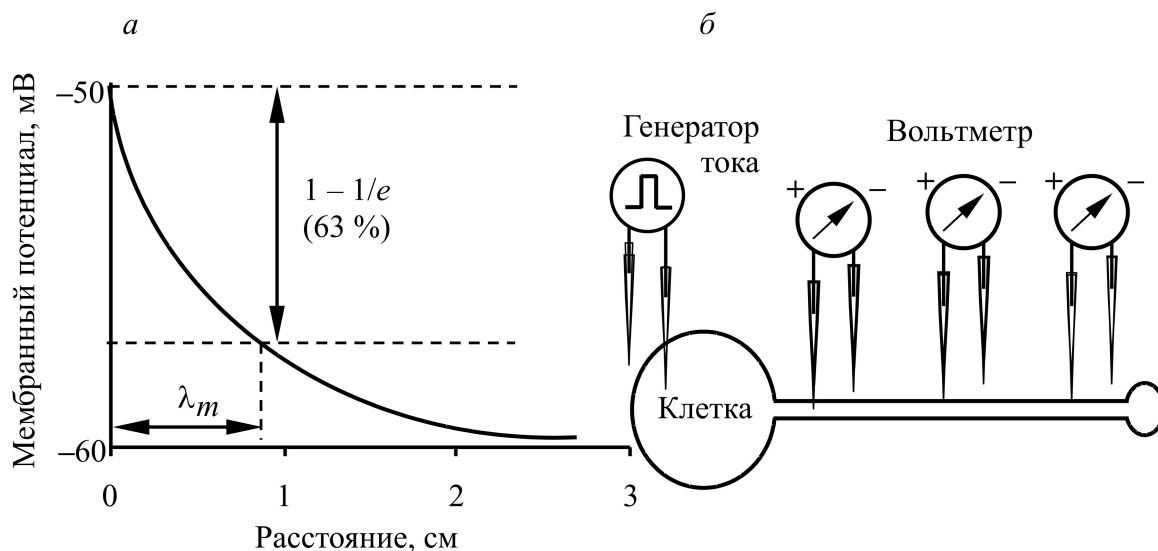


Рис. 26. Постоянная длины:
 а – изменение мембранного потенциала в зависимости от расстояния;
 б – схема эксперимента

первоначальной величины (или расстояние, на котором амплитуда исходного импульса падает до 37 %, т. е. $1/e$).

Величина λ является мерой расстояния, на которое электротонически распространяются подпороговые сигналы. Она колеблется от 0,1 до 5,0 мм, достигая для гигантских аксонов кальмара нескольких сантиметров. На расстоянии 4λ амплитуда сигнала составляет лишь 2 % от его исходной величины. Значение постоянной длины определяется уравнением

$$\lambda = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{D \cdot R_m}{R_i}},$$

где D – диаметр отростка.

Затухание сигнала происходит вследствие увеличения удельного сопротивления аксоплазмы с расстоянием, а также за счет того, что часть тока выходит через мембрану по всей длине аксона во внеклеточную среду, обладающую низким сопротивлением (т. е. мембрана не абсолютно электрически изолирует внутриклеточное содержимое).

Электротоническое распространение тока, наравне с собственно амплитудой исходного импульса, определяет скорость проведения сигнала по нервному волокну. Ввиду того, что R_m и C_m примерно одинаковы в большинстве возбудимых тканей, именно *диаметр* нервного волокна определяет характер электротона. При увеличении диаметра волокна продольное (удельное) сопротивление аксоплазмы, пропорциональное квадрату радиуса, снижается относительно сопротивления мембраны, уменьшение которого пропорционально лишь удвоенному радиусу (диаметру).

В результате увеличивается λ_m , электротонические токи распространяются на большие расстояния и скорость проведения возрастает.

С увеличением диаметра волокна увеличивается площадь мембраны и, как следствие, возрастает (пропорционально удвоенному радиусу) ее емкость, что уменьшает скорость проведения. Однако эффект снижения продольного (удельного) сопротивления все же преобладает.

В покрытых миелином нервных волокнах, в которых только очень короткие участки (перехваты Ранвье) лишены миелина, складывается следующая ситуация. Миелин значительно увеличивает сопротивление мембраны, а также снижает ее емкость на единицу длины. В результате электротонические потенциалы распространяются через межперехватные участки практически без потери амплитуды (возрастает λ_m) и почти мгновенно. Возбуждение «перескакивает» от одного перехвата Ранвье к другому (*сальтаторное проведение*).

Проблема угасания электротонического импульса при его проведении на значительные внутриклеточные расстояния решена за счет использования другого типа сигнала – потенциала действия (активное распространение). Исходный электротонический потенциал, достигая порогового уровня, вызывает развитие в соседнем участке мембраны потенциала действия, который, в свою очередь, становится источником нового электротонического потенциала и т. д. (рис. 27). Таким образом, потенциал действия распространяется не за счет энергии первоначального стимула (как это свойственно электротоническому потенциалу), а благодаря энергии, высвобождаемой по всей длине аксона или в области перехватов Ранвье, применительно к миелинизированным волокнам.

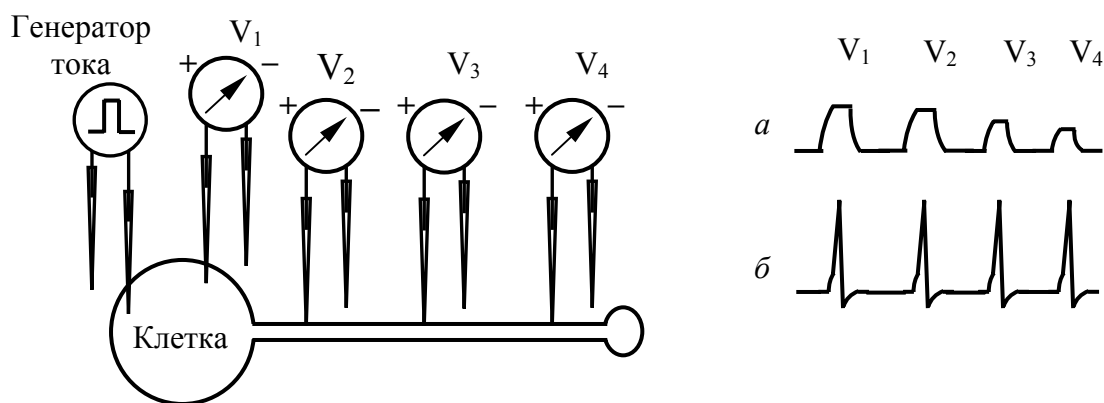


Рис. 27. Пассивное (*a*) и активное (*б*) распространение электрического сигнала. Приведена схема опыта и характер изменения мембранного потенциала с расстоянием при пропускании через клетку подпорогового (*a*) или надпорогового (*б*) импульсов тока, вызывающих генерацию электрона или потенциал действия

Развитие потенциала действия требует временных затрат, снижая скорость проведения. В миелинизированных волокнах количество предназначенных для генерации потенциала действия участков (перехваты Ранвье) на единицу длины волокна меньше, чем в немиелинизированных (здесь любой участок мембраны может стать источником развития потенциала действия). В сочетании с почти мгновенной передачей сигнала через межперехватные участки это приводит к тому, что скорость проведения возбуждения в миелинизированном волокне намного выше, чем в немиелинизированном того же диаметра.

|| В электротехнике проблема затухания сигнала решена за счет вставки в кабель через определенные интервалы специальных усилителей.

Активное распространение имеет перед пассивным ряд преимуществ при передаче сигналов на большие расстояния:

- **благоприятное соотношение сигнал/шум.** Случайные низкоамплитудные шумы мембраны искажают слабые сигналы (электротонические импульсы) больше, чем сильные (высокоамплитудный потенциал действия);
- **гарантированная большая амплитуда сигнала.** В большинстве случаев для высвобождения нейромедиатора из пресинаптического окончания его нужно деполяризовать примерно на 25 мВ, что достигается при использовании потенциала действия, гарантированно приводящего к развитию электротонического потенциала нужной (свыше 25 мВ) амплитуды в пресинаптической области;
- **минимальные искажения высокочастотных компонент сигнала,** обусловленных потерями в емкости.

НЕЙРОННАЯ ИНТЕГРАЦИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНАПСОВ

Нервная клетка суммирует различные подпороговые сигналы, возникающие на ее мембране. Этот процесс подчиняется законам электротонического распространения потенциалов и определяется пассивными свойствами мембраны нейрона. В результате «принимается решение» – генерировать или нет потенциал действия, т. е. будут развиваться в данной клетке процессы возбуждения или торможения? Аксоны пресинаптических окончаний конвергируют на постсинаптической клетке. В зависимости от характера их взаимодействия различают *временную* и *пространственную* суммацию.

Временная суммация. Длительность синаптического тока крайне мала по сравнению с постоянной времени постсинаптической клетки. За счет емкостных свойств ее мембраны, замедляющих изменение потенциала, синаптические потенциалы возрастают (падают) медленнее, чем си-

наптический ток. Как следствие, второй импульс в пресинаптическом нейроне, возникающий непосредственно за первым, вызывает новый синаптический ток еще до завершения разрядки мембранной емкости постсинаптической клетки от предыдущего синаптического потенциала. В результате новая де-(гипер-)поляризация суммируется с остаточной, т. е. складываются последовательные синаптические воздействия, производимые в одном месте, – это и есть временная суммация (рис. 28, *а*). Таким образом, она напрямую зависит от постоянной времени мембраны, а нейроны с большей τ_m обладают большей способностью к временной суммации.

Пространственная суммация. Величина одиночного постсинаптического потенциала электротонически снижается при удалении от области синапса и не достаточна для возбуждения потенциала действия в зоне генерации. Для этого требуется одновременное совместное действие нескольких синаптических входов. В результате эффекты нескольких пространственно разделенных синапсов складываются – это и есть пространственная суммация (рис. 28, *б*). Она в первую очередь зависит от постоянной длины мембраны, чем больше λ_m , тем более отдаленные от аксонного холмика постсинаптические зоны могут принять участие в результирующей генерации потенциала действия.

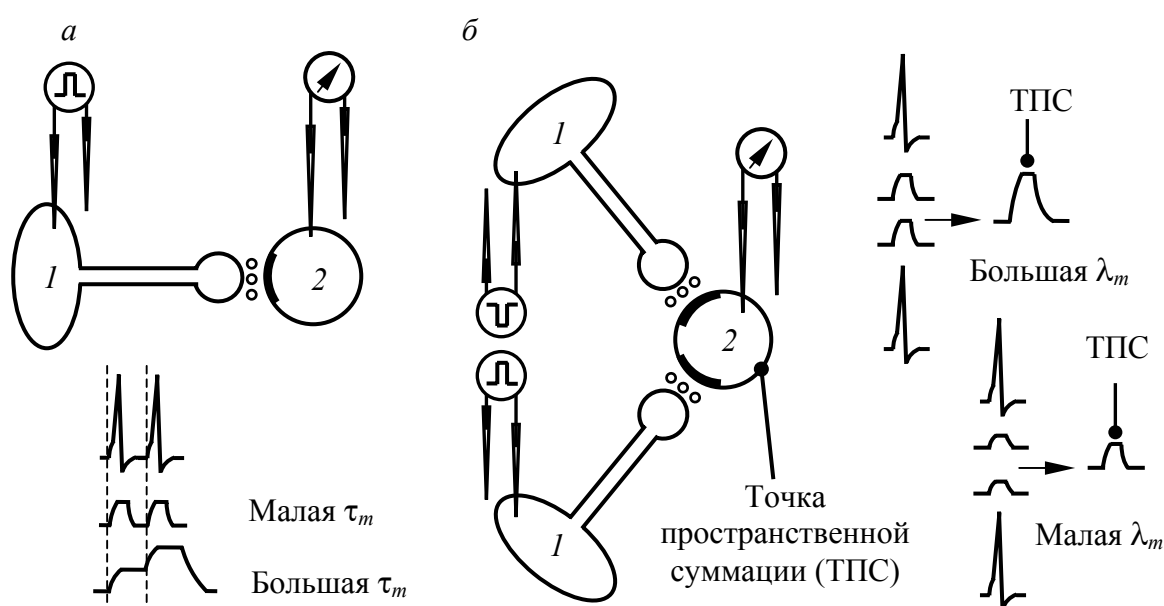


Рис. 28. Временная (*а*) и пространственная (*б*) суммация.

Приведена схема опыта и характер изменения мембранного потенциала постсинаптической клетки в ответ на последовательное (*а*) или одновременное (*б*) возникновение потенциала действия в пресинаптической клетке (клетках):

1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

Многие нейроны, особенно у беспозвоночных, имеют по несколько зон генерации. В этом случае каждая из них суммирует действия, производимые ближайшими синапсами, а разряд такой локальной зоны ведет к разряду общей зоны генерации в начальном сегменте аксона (аксонном холмике).

Возбуждающие и тормозные синапсы располагаются на теле клетки неравномерно. Первые преимущественно сконцентрированы на дендритах, тогда как вторые особенно многочисленны на соме нейрона в районе аксонного холмика, т. е. способны оказать более сильное влияние на процессы нейронной интеграции.

ГЛАВА 4

ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА И ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

В покое плазматическая мембрана относительно легко проницаема для ионов калия. В результате переноса K^+ на наружной стороне мембраны будет накапливаться положительный заряд. Соответственно внутренняя сторона становится более электроотрицательной. Это возможно вследствие того, что органические анионы, в норме уравнивающие ионы калия для сохранения общей электронейтральности внутри клетки, неспособны свободно перемещаться через мембрану. Таким образом, неравномерное распределение (разделение) зарядов по разные стороны от мембраны ведет к появлению разности потенциалов (рис. 29). Чем больше ионов калия покинет клетку под действием концентрационного градиента, тем более выраженным станет разделение зарядов и тем больше будет разность потенциалов.

Создающийся на внутренней стороне мембраны отрицательный заряд препятствует (разноименные заряды притягиваются друг к другу) дальнейшему выходу K^+ из клетки по градиенту концентрации, т. е. действие электрических сил уравнивает действие химических сил. В результате устанавливается состояние равновесия, при котором количество ионов калия, покидающих клетку по концентрационному градиенту, равно их количеству, поступающему в клетку за счет сил электростатического притяжения.

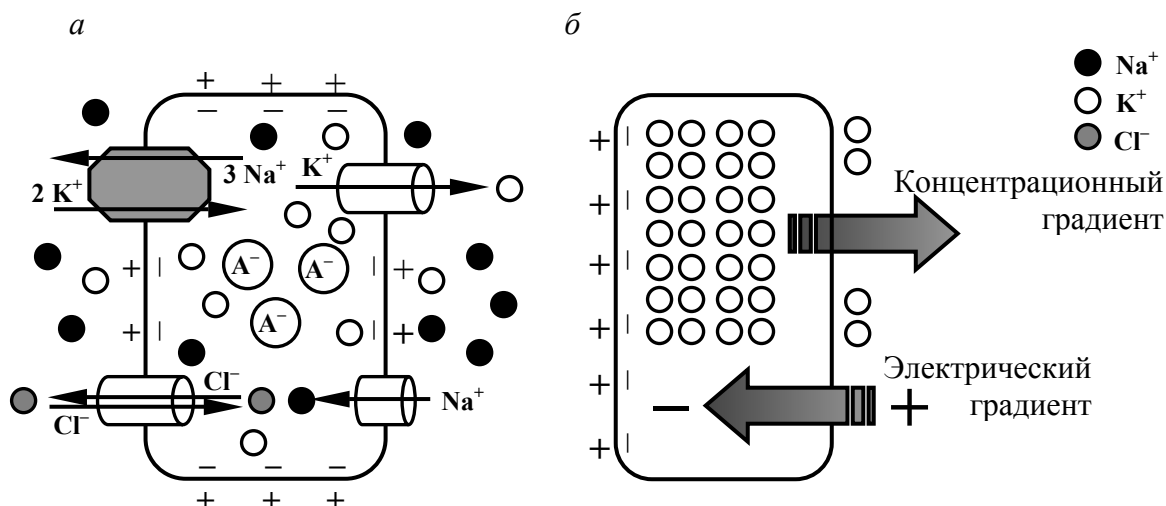


Рис. 29. Распределение ионов по разные стороны плазмалеммы с указанием направления путей их переноса через мембрану (а) и градиенты, опосредующие потоки ионов калия (б)

Количественной характеристикой состояния равновесия является **потенциал равновесия**, определяемый согласно *уравнению Нернста* как

$$E_{ion} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[ion]_o}{[ion]_i},$$

где F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, $[ion]_o$ и $[ion]_i$ вне- и внутриклеточная концентрация иона соответственно.

Применительно к гигантскому аксону кальмара (см. табл. 2) значение калиевого равновесного потенциала составляет:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = 2,3 \frac{RT}{F} \log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = 58 \log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = 58 \log \frac{20}{400} = -75 mV$$

при условии, что $\ln = 2,3 \cdot \log$, а при 18 °C (291 K) отношение $RT/F = 25$.

Наблюдаемое значение мембранного потенциала в гигантском волокне составляет –60 мВ, что достаточно близко к теоретически рассчитанному. Различия обусловлены некоторой проницаемостью клеточной мембраны и для других (помимо K⁺) ионов, прежде всего Na⁺. В результате поступления небольших количеств положительно заряженных ионов натрия внутрь клетки часть отрицательного заряда на внутренней стороне мембраны уничтожается и величина мембранного потенциала снижается.

Указанные отклонения учтены в *уравнении Гольдмана*, основанном на допущении, что внутри мембраны градиент потенциала и напряженность электрического поля постоянны:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}.$$

В уравнении учтены концентрации трех главных ионов малого радиуса и относительные проницаемости (P) для них.

А. Ходжкин и Б. Катц (A. L. Hodgkin, B. Katz, 1949) установили, что $P_K : P_{Na} : P_{Cl}$ соотносятся как 1 : 0,04 : 0,45.

Таким образом, мембранный потенциал в первом приближении определяется градиентом концентрации ионов калия. Согласно уравнению Нернста, мембранный потенциал изменяется обратно пропорционально внеклеточной концентрации калия – с ее увеличением клетка претерпевает сильную деполяризацию (рис. 30). Увеличение $[K^+]_o$ наблюдается при усиленной электрической активности нейронов и способно вызывать значительные изменения возбудимости клеток, окружающих очаг активности.

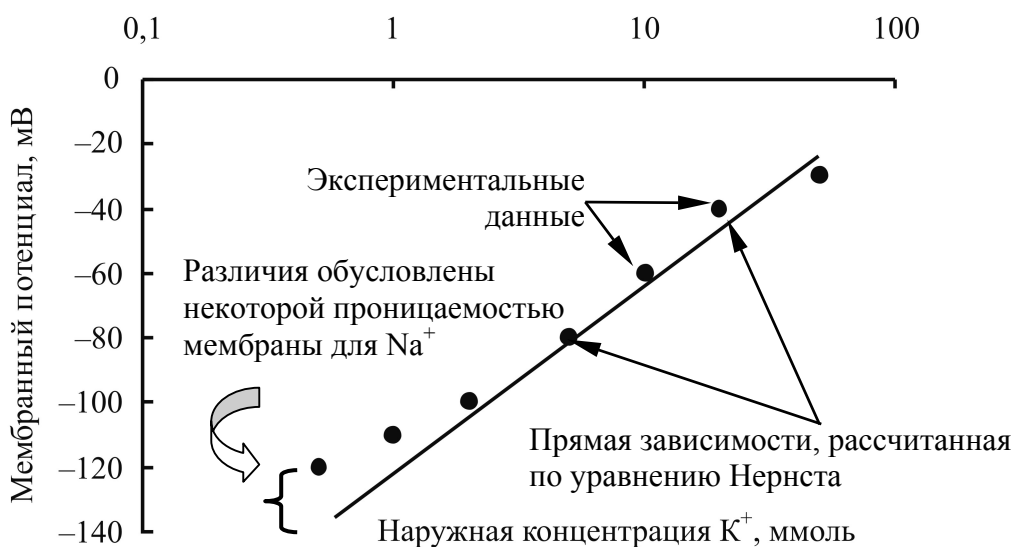


Рис. 30. Зависимость мембранного потенциала от внеклеточной концентрации K^+

Оценки проницаемостей показали, что ионы хлора также способны легко пересекать плазмалемму. Тем не менее они не вносят существенного вклада в мембранный потенциал. Вне- и внутриклеточные концентрации калия и хлора соотносятся противоположным образом: $[Cl^-]_i/[Cl^-]_o = 1/16$,

а $[K^+]_i/[K^+]_o = 20$. Рассчитанный равновесный потенциал для хлора (E_{Cl}) составляет около -75 мВ, т. е. соответствует E_K . В результате создается взаимно противоположное распределение K^+ и Cl^- по разные стороны мембраны. Однако на распределение ионов хлора не накладывается никаких пространственных ограничений. Они легко перемещаются в клетку или из клетки и распределяются в соответствии с мембранным потенциалом, заданным K^+ . Последний препятствует проникновению внутрь клетки отрицательно заряженных ионов хлора, стремящихся в клетку по направлению концентрационного градиента.

Фиксированные анионы внутри клетки не могут пересечь плазмалемму вслед за уравнивающими их ионами калия. В результате концентрация K^+ поддерживается относительно постоянной внутри клетки.

Таким образом, градиент концентрации ионов хлора подстраивается под градиент ионов калия и является обратным последнему.

Создание потенциала на мембране клетки не является имманентным свойством только живых организмов. Разности потенциалов можно достичь, разделив растворы соли разной концентрации мембраной, имеющей неодинаковую проницаемость для аниона и катиона, на которые диссоциирует соль. Возникающее при этом *доннановское равновесие* характеризует неравномерное распределение диффундирующих ионов и наличие результирующего заряда. Не стоит забывать, что исходная разница вне- и внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ в «живой» клетке создается, в итоге, исключительно благодаря постоянной работе Na^+-K^+ -АТФазы.

ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ

Смещение мембранного потенциала на величину около 15 мВ, т. е. до уровня $-50 \div -45$ мВ, в сторону положительных значений, приводит к развитию потенциала действия в возбудимых тканях (нервной, мышечной и железистой). К. Коул и Х. Кёртис (К. Cole, Н. Curtis, 1939) впервые показали, что его генерация связана с резким увеличением ионной проницаемости мембраны. При этом сопротивление мембраны уменьшается в 40 раз, а емкость изменяется всего лишь на 2% .

Как установили А. Ходжкин и Б. Катц (А. L. Hodgkin, В. Katz, 1949), в ходе потенциала действия на короткий момент времени внутренняя поверхность мембраны становится положительно заряженной по отношению к наружной среде (*инверсия потенциала*). На пике развития потенциала действия значение мембранного потенциала достигает уровня в $+50$ мВ и выше. Единственный ион, равновесный потенциал которого имеет более высокое положительное значение, – это натрий. Для гигантского аксона кальмара E_{Na} равен $+55$ мВ при $18^\circ C$.

Первоначальное увеличение проницаемости мембраны для ионов натрия приводит к поступлению внутрь клетки небольших их количеств и деполяризации мембраны, которая в свою очередь еще больше повышает натриевую проницаемость. В результате изменение потенциала носит *регенеративный характер*. Инверсия мембранного потенциала кратковременна. Нарастающая деполяризация рано или поздно «выключает» повышенную проницаемость для ионов натрия (*инактивация натрия*). Параллельно с этим, правда с некоторым запаздыванием, деполяризация вызывает увеличение проницаемости для калия (*задержанное выпрямление*). Именно оно определяет нелинейность вольт-амперной характеристики мембраны при деполяризации (см. рис. 24). В результате мембранный потенциал возвращается к исходному уровню.

Развитие потенциала действия *не требует выработки энергии*. Расчеты показывают, что при каждом импульсе через 1 см^2 мембраны гигантского аксона проходит по $3\text{--}4 \cdot 10^{-12}$ моль Na^+ и K^+ . Это эквивалентно тому, что клетку покидает лишь один из 10 млн внутриклеточных K^+ . Указанная структура способна генерировать до полумиллиона импульсов без перезарядки своей трансмембранной батареи (несколько часов работы).

Клетка запасает потенциальную энергию в виде мембранного потенциала благодаря работе $\text{Na}^+\text{--K}^+$ -АТФазы. Ее активность обеспечивает постоянную зарядку мембранной батареи. На коротких интервалах времени мембранный потенциал и потенциал действия не зависят от работы $\text{Na}^+\text{--K}^+$ -насоса. Однако при блокировании $\text{Na}^+\text{--K}^+$ -АТФазы утечка ионов приводит к тому, что клетка, даже в состоянии покоя, постепенно теряет K^+ и накапливает Na^+ . Как следствие, мембранный потенциал постепенно снижается до нуля.

ИОННЫЕ ТОКИ ПРИ РАЗВИТИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Важную роль в регистрации мембранных токов сыграла предложенная К. Коулом (K. S. Cole, 1939) методика фиксации потенциала. Ее суть состоит в том, что она позволяет быстро сдвигать мембранный потенциал до любого желаемого уровня и удерживать (фиксировать) его на этом уровне сколь угодно долго.

При фиксации потенциала стало возможным измерить трансмембранный ток с хорошим временным разрешением, а также отдельно измерить ток, идущий через сопротивление. За счет быстрой и полной зарядки мембранной емкости мембранный ток становится просто функцией мембранной проводимости и напряжения: $I_m = G_m \cdot \Delta V_m$ и позволяет оценить

изменения общей ионной проводимости, а следовательно, и специфических ионных проводимостей при изменении мембранного потенциала. Помимо этого, при фиксации напряжения предотвращаются вторичные изменения мембранного потенциала (задержанное выпрямление).

Ступенчатый сдвиг мембранного потенциала от исходного уровня до +60 мВ приводит к появлению трансмембранного комплексного тока. За кратковременным емкостным током следует двухфазный ионный ток, сначала входящий, а затем по прошествии 2 мс – выходящий. Чем больше исходная ступенька деполяризующего тока, т. е. чем сильнее напряжение на мембране «уводится» от уровня потенциала покоя, тем ниже амплитуда раннего входящего тока и тем выше амплитуда задержанного выходящего тока. При сдвигах мембранного потенциала до уровня +50–60 мВ ранний входящий ток становится равным нулю, при еще больших сдвигах – меняет направление своего движения на противоположное, т. е. становится выходящим. Задержанный выходящий ток уменьшается только в случае гиперполяризационного сдвига мембранного потенциала и при его уровне –80 мВ (потенциал инверсии) меняет свое направление. Характер и динамика данных токов представлены на рис. 31.

Результаты экспериментов были объяснены следующим образом. Входящий ток наблюдается вследствие увеличения натриевой проницаемости при деполяризации и обусловлен движением Na^+ внутрь клетки. Очевидно, что в этом случае его потенциал инверсии должен совпадать с равновесным потенциалом для натрия (+55 мВ), что и наблюдалось. Аналогичные рассуждения, применимые к задержанному выходящему току, позволили ассоциировать его с движением K^+ .

Существует несколько способов разделения описанных выше токов. Так, замена натрия в наружном растворе на холин (катион, не способный проникать внутрь гигантского аксона кальмара) приводит к исчезновению входящего тока при деполяризации, оставляя только выходящий ток, обусловленный ионами калия. Вычитая значение оставшегося выходящего тока из общего значения трансмембранного тока, можно определить натриевую компоненту тока.

Однако наилучшие результаты достигаются при использовании специфических блокаторов ионных каналов (рис. 32).

Тетродотоксин (ТТХ) способен избирательно блокировать потенциал-чувствительные Na^+ -каналы, позволяя выявить временной ход калиевых токов. Напротив, *тетраэтиламмоний* (ТЭА) избирательно блокирует K^+ -каналы задержанного выпрямления и его использование позволяет проследить за ходом натриевых токов при развитии потенциала действия.

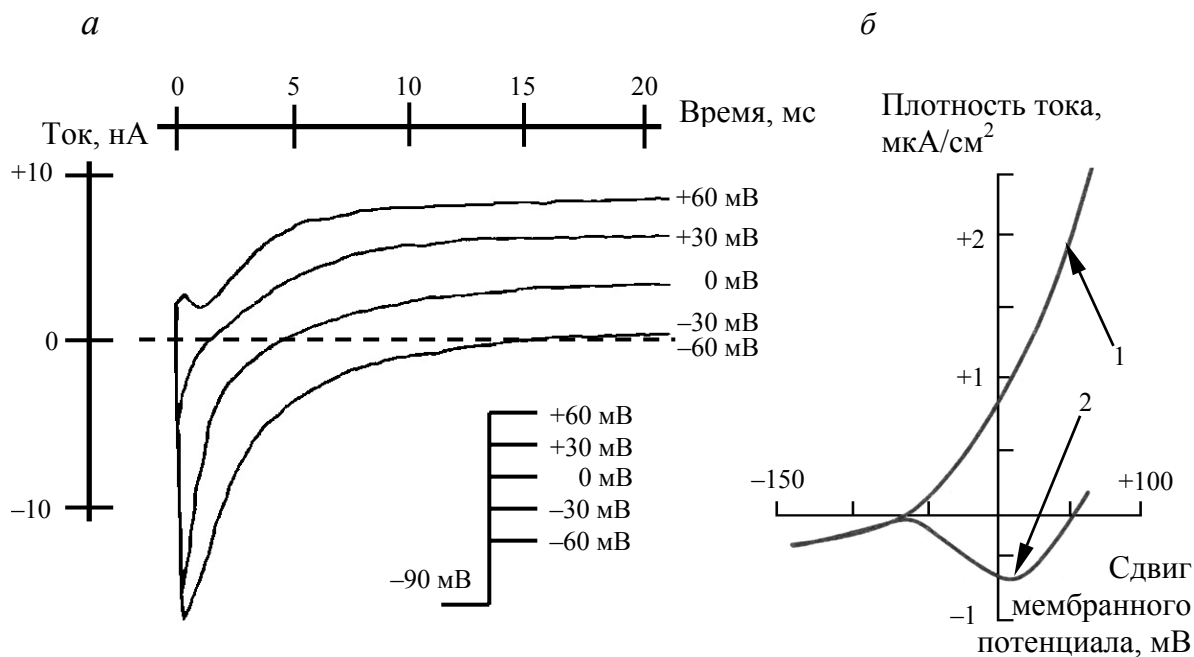


Рис. 31. Мембранные токи, наблюдаемые при ступенчатых сдвигах потенциала с -90 мВ до -60, -30, 0, +30 и +60 мВ (а), и соотношение между мембранным током и мембранным потенциалом (б):
 1 – установившийся задержанный выходящий ток (обусловлен K⁺);
 2 – пиковое значение входящего тока (обусловлен Na⁺).
 Ноль абсциссы (б) соответствует потенциалу покоя

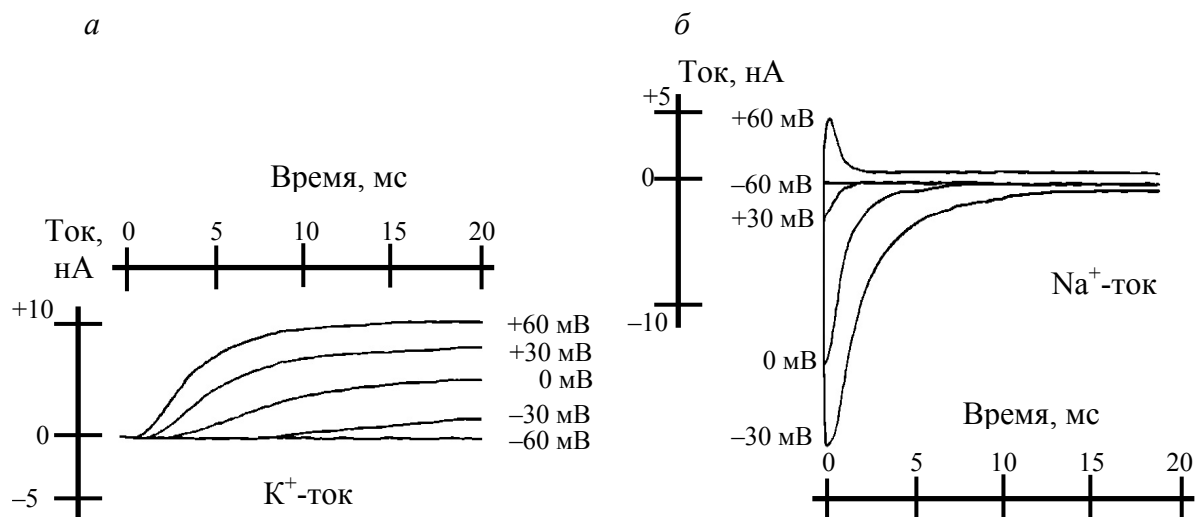


Рис. 32. Фармакологическое разделение мембранных токов:
 а – при действии ТТХ (K⁺-ток); б – при действии ТЭА (Na⁺-ток)

Калиевые токи возникают с задержкой порядка 0,5 мс и возрастают пропорционально величине деполяризации. В течение 5 мс после деполяризационного сдвига они достигают плато, удерживаясь на нем в течение всего периода деполяризации (см. рис. 32, а).

Натриевые токи возникают без видимой задержки и после каждого деполяризующего сдвига потенциала быстро достигают максимума, а если деполяризация продолжает поддерживаться – обращаются в нуль (см. рис. 32, б). Инактивация Na^+ -тока ускоряется с увеличением деполяризации (при +30 мВ она хорошо выражена уже через 1 мс).

А. Ходжкин и А. Хаксли (A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, 1952) смогли количественно описать, как изменяются натриевая и калиевая проводимости при изменении мембранного потенциала и по ходу развития потенциала действия. Поскольку токи в ионных каналах соответствуют закону Ома, то для тока, переносимого данным ионом, справедливо равенство $I_{\text{ion}} = G \cdot E$. А так как источником ЭДС (E) для ионного тока служит разность между мембранным потенциалом (V_m) и потенциалом равновесия (E_{ion}) для данного иона, то $I_{\text{ion}} = g_{\text{ion}} \cdot (V_m - E_{\text{ion}})$.

Использование при анализе ионных токов малых скачков потенциала и временных отрезков дало возможность воспроизвести временной ход потенциала действия по известным значениям амплитуд и временного хода натриевой и калиевой проводимостей (рис. 33).

Основываясь на ряде эмпирически выведенных уравнений, описывающих изменение ионных проводимостей в зависимости от мембранного потенциала и времени, а также на уравнениях, описывающих пассивные свойства мембран, А. Ходжкин и А. Хаксли (A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, 1952) теоретически рассчитали форму распространяющегося потенциала действия и оценили скорость его распространения. Вычисленная скорость составила 18,8 м/с, экспериментальная – 21,2 м/с.

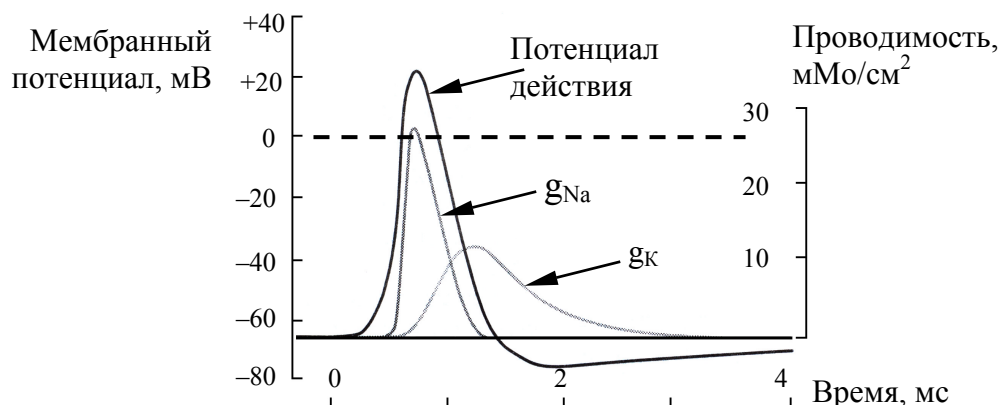


Рис. 33. Изменения g_{Na} и g_{K} при развитии потенциала действия

Таким образом, при развитии потенциала действия наблюдается быстрое нарастание натриевой проводимости, а также задержанное нарастание неинактивирующейся калиевой проводимости, которая прекращается только при реполяризации мембраны, и инактивация натриевой проводимости. Инактивация натриевых каналов не означает восстановления состояния покоя – мембрану невозможно деполяризовать даже после кратковременной реполяризации, хотя последующая гиперполяризация значительно повышает вероятность активации натриевых каналов.

Длительная деполяризация весьма успешно предотвращает возбуждение, как правило, даже эффективнее, нежели равная ей по величине гиперполяризация. Так, клетки, мембранный потенциал которых ниже -50 мВ, утрачивают возбудимость.

Ионная теория позволила объяснить такие явления, как пороговый потенциал (при нем входящий натриевый ток превышает выходящий ток) и рефрактерный период (который является следствием инактивации натриевых каналов).

В ряде случаев, например в кардиомиоцитах, фаза деполяризации может обеспечиваться входящим током Ca^{2+} , проникающих в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ИОННОЙ ГИПОТЕЗЫ

Решающие эксперименты, которые окончательно утвердили ионную гипотезу, были проведены П. Бейкером, А. Ходжкиным и Т. Шоу (P. F. Baker, A. L. Hodgkin, T. I. Shaw, 1962). При помощи покрытого резиной валика им удалось выдавить аксоплазму из гигантского нервного волокна кальмара не повредив мембрану и заменить ее на искусственные растворы различного ионного состава. Оказалось, что у аксона, помещенного в морскую воду и содержащего 600 мМ KCl, величина мембранного потенциала составляет -60 мВ, а полная замена внутриклеточного калия на натрий превращает мембранный потенциал в нуль. Последующее увеличение внеклеточной концентрации калия до 600 мМ приводит к возникновению на мембране аксона потенциала в $+60$ мВ (нормальный потенциал претерпевает полную инверсию). Увеличение внутриклеточной (снижение внеклеточной) концентрации натрия приводит к уменьшению амплитуды потенциалов действия, прежде всего овершута, и в конце концов к полному прекращению их генерации. Все наблюдаемые изменения

находились в полном соответствии с теоретическими предсказаниями уравнения Гольдмана.

В 1963 г. за исследование функций нервных клеток А. Ходжкин и А. Хаксли были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.

ИОННЫЕ ТОКИ, ПРОХОДЯЩИЕ ЧЕРЕЗ ОДИНОЧНЫЕ КАНАЛЫ

В 1978 г. немецкими биофизиками Е. Неером и Б. Сакманом (E. Neher, B. Sakmann, 1978) для измерения ионных токов через одиночные каналы был предложен метод локальной фиксации потенциала – *patch clamp*. Суть метода заключается в следующем. Стеклопипетка, диаметр кончика которой около 1 мкм, подводится к мембране клетки и благодаря легкому присасыванию (через пипетку подается отрицательное давление) образует плотный контакт с участком мембраны, надежно электрически изолируя его (сопротивление контакта часто превышает 1 ГОм). В результате становится возможным зарегистрировать токи, проходящие через этот участок мембраны, содержащий всего несколько ионных каналов.

Выделяют четыре конфигурации данного метода:

- **cell attached** (прикрепленная к клетке) – базовая конфигурация, описанная выше;
- **inside out** (внутренней стороной наружу) – после образования гигаомного контакта пипетка отводится от клеточной поверхности, вырывая участок мембраны. При этом ее внутренняя сторона омывается перфузионной жидкостью. Позволяет регистрировать активность изолированных от клетки одиночных каналов;
- **outside out** (наружной стороной наружу) – увеличивая присасывающую силу, можно добиться глубокой инвагинации мембраны внутрь пипетки и ее разрыва, а последующее ее отведение от поверхности клетки приводит к замыканию концов вновь вырванного участка мембраны на себя. В результате внутренняя поверхность контактирует с раствором внутри пипетки, а на наружную поверхность могут воздействовать растворы различного состава, что позволяет тестировать реакции каналов на аппликацию различных фармакологических препаратов;
- **whole cell** (целая клетка) – после образования гигаомного контакта под действием повышенной всасывающей силы происходит разрыв участка клеточной мембраны, находящейся внутри пипетки. Как следствие, внутриклеточное содержимое может быть заменено на искусственный раствор, подаваемый через пипетку. Разновидностью данной конфигурации является *perforated patch* (продырявленный пэтч), когда в пипеточном растворе присутствует вещество (нистагмин), способное формировать мембранные поры, что препятствует вымыванию внутриклеточного содержимого, но сохраняет электрический контакт с клеткой.

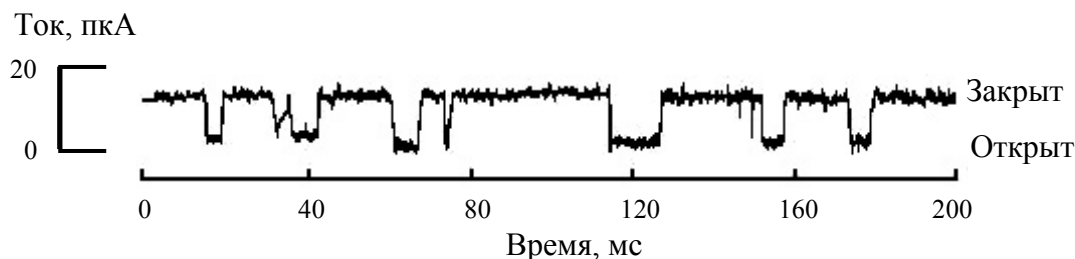


Рис. 34. Токи одиночных ионных каналов, зарегистрированных при помощи метода локальной фиксации потенциала

Методика локальной фиксации потенциала позволила не только количественно оценить ионные токи через одиночные каналы, но также способствовала пониманию функционирования ионных каналов клетки. Токи одиночных каналов регистрируются в виде прямоугольных сигналов, которые появляются нерегулярно, с различной продолжительностью и постоянной амплитудой (рис. 34).

Анализ кинетики каналов, т. е. времени нахождения их в открытом (закрытом) состоянии, позволяет судить о механизмах, управляющих этими процессами.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Потенциал действия, как правило, возникает в районе аксонного холмика, участка мембраны нейрона, расположенного в месте отхождения аксона от тела клетки.

Ионы натрия, входящие внутрь клетки в возбужденном участке мембраны, служат источником электротонического деполяризационного потенциала, распространяющегося во всех направлениях (рис. 35).

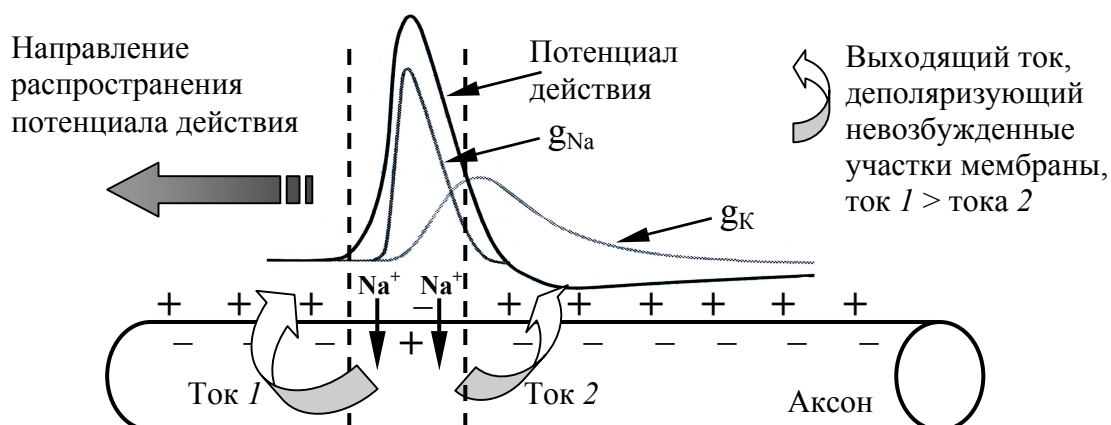


Рис. 35. Распространение потенциала действия.

Приведены временной ход потенциала действия и направления мембранных токов

Однако мембрана сомы обладает меньшей электрической возбудимостью (высоким порогом) по сравнению с аксональной мембраной. В результате электротоническая деполяризация достигает порога и вызывает возникновение потенциала действия в соседнем с аксонным холмиком участке мембраны нервного волокна. Далее ситуация повторяется.

Электротонические натриевые деполяризационные токи вызывают смещение мембранного потенциала и последующую генерацию потенциала действия только спереди от фронта распространяющейся волны возбуждения. Позади фронта немедленная генерация потенциала действия невозможна как вследствие повышенной ионной проницаемости мембраны для ионов калия (следовая гиперполяризация), увеличивающей порог, так и за счет сохраняющейся инактивации натриевых каналов, без перехода которых в открытое состояние клетка остается в абсолютном рефрактерном периоде.

Если искусственно (электрическим током) вызвать возникновение потенциала действия посередине нервного волокна, то он начнет распространяться по обе стороны от места генерации. В этом случае не существует предпочтительного направления его распространения, поскольку мембрана по разные стороны от точки его возникновения одинаково восприимчива к действию электротонически распространяющихся деполяризационных натриевых токов.

ГЛАВА 5 ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ

Потенциал действия, достигнув окончания нервной клетки, вызывает целый каскад превращений, заканчивающихся выделением нейромедиатора в синаптическую щель. Прежде всего, в нервном окончании происходят изменения ионной проводимости, аналогичные таковым в средней части аксона при прохождении потенциала действия.

Работы Б. Катца и Р. Миледи (B. Katz, R. Miledi, 1967), проведенные на гигантском синапсе кальмара, позволили установить связь между уровнем мембранного потенциала нервного окончания и эффективностью синаптической передачи. Оказалось, что в условиях действия ТТХ, т. е. при блокировании проводимости потенциал-чувствительных Na^+ -каналов, происходит параллельное уменьшение амплитуд вы-

званных пресинаптических потенциалов действия и постсинаптических потенциалов (рис. 36).

Зависимость носит прямой характер и является логарифмической – увеличение амплитуды пресинаптического импульса на 10 мВ вызывает увеличение амплитуды постсинаптического потенциала (ПСП) в 10 раз (рис. 37).

Впоследствии оказалось, что даже искусственная электротоническая деполяризация пресинаптического окончания, протекающая без регенеративного увеличения натриевой проницаемости, приводит к появлению постсинаптических потенциалов.

В этом случае возникновение потенциала действия в пресинаптическом волокне блокировалось высокими дозами тетродотоксина.

При этом характер зависимости сохранялся – увеличение амплитуды электротонического потенциала в пресинаптическом волокне приводит к прогрессивному нарастанию амплитуды постсинаптических потенциалов (рис. 38).



Рис. 36. Синаптическая передача в гигантском синапсе кальмара:
а – схема эксперимента; б – изменение эффективности синаптической передачи:
1 – пресинаптическая; 2 – постсинаптическая клетка

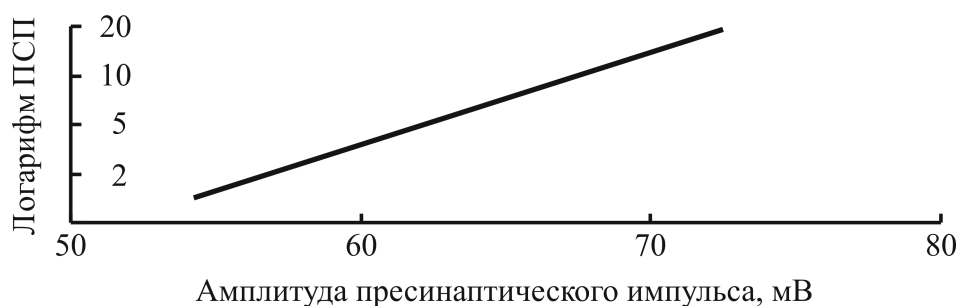


Рис. 37. Зависимость амплитуды постсинаптических потенциалов от амплитуды потенциала действия

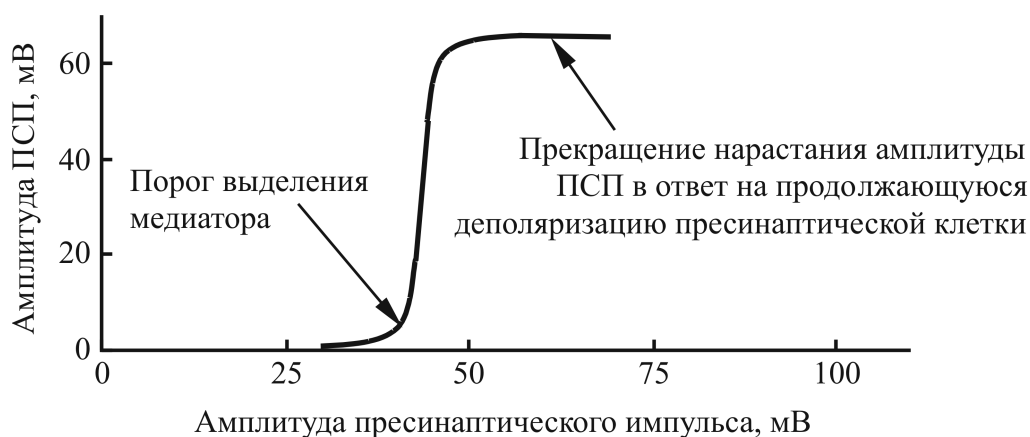


Рис. 38. Зависимость амплитуды постсинаптических потенциалов от степени деполяризации пресинаптического волокна в гигантском синапсе кальмара

Кривая зависимости носит S-образный вид, что характеризует наличие четкого порога возникновения постсинаптических потенциалов — они появляются только в случае деполяризации пресинаптического волокна на 25 мВ и более. Затем происходит резкое нарастание амплитуды постсинаптических потенциалов в ответ на пресинаптическую деполяризацию, но по достижении уровня деполяризации в 60–65 мВ дальнейшего нарастания амплитуды постсинаптических потенциалов не происходит. Введение внутрь пресинаптического волокна ТЭА не вызывает изменений характеристик рассмотренной кривой.

Таким образом, регенеративный натриевый ток не является необходимым условием для выделения нейромедиатора, а изменения проницаемостей мембраны для Na^+ и K^+ , т. е. открытие соответствующих ионных каналов, сами по себе не ответственны за освобождение медиатора.

РОЛЬ Ca^{2+} ПРИ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ

На нервно-мышечных синапсах лягушки впервые было показано (B. Katz, R. Miledi, 1967), что вход кальция в клетку является важнейшим звеном, связывающим деполяризацию пресинаптического окончания и выброс нейромедиатора в синаптическую щель.

Оказалось, что в отсутствие Ca^{2+} химическая передача сигнала прекращается, несмотря на то, что нервный импульс по-прежнему доходит до пресинаптической терминали.

Впервые физиологическая роль Ca^{2+} была продемонстрирована С. Рингером (S. Ringer, 1882), показавшим необходимость этого иона для сокращения сердца крысы. Им же был разработан один из первых внеклеточных растворов для перфузии тканей, носящий его имя.

Напротив, увеличение наружной концентрации Ca^{2+} облегчает синаптическую передачу даже в присутствии ТТХ. Б. Катц и Р. Миледи (B. Katz, R. Miledi, 1969) обнаружили, что при деполяризации пресинаптического окончания наблюдается регенеративный входящий кальциевый ток, опосредованный потенциал-чувствительными Ca^{2+} -каналами, в норме маскирующийся более выраженными натриевым и калиевым токами. Использование хелаторов, способных связывать свободные ионы кальция (BAPTA, EGTA), показало, что вход Ca^{2+} в клетку ограничен областью пресинаптического окончания, включающей места высвобождения нейромедиатора. Первое прямое доказательство перехода кальция внутрь клетки при деполяризации было получено в экспериментах с экворином – белком, флуоресцирующим при связывании с Ca^{2+} (R. Llinas, C. Nicholson, 1975).

Ионы кальция должны присутствовать в окружающей среде уже во время деполяризации пресинаптического волокна (рис 39).

Лишь в этом случае синаптическая передача имеет место. Если искусственно (ионофоретически) обеспечить подачу Ca^{2+} во внеклеточную среду непосредственно после деполяризующего импульса в пресинаптическом волокне, то постсинаптических потенциалов не будет. Прямое введение ионов кальция в пресинаптическую терминаль значительно усиливает выделение медиатора в синаптическую щель.

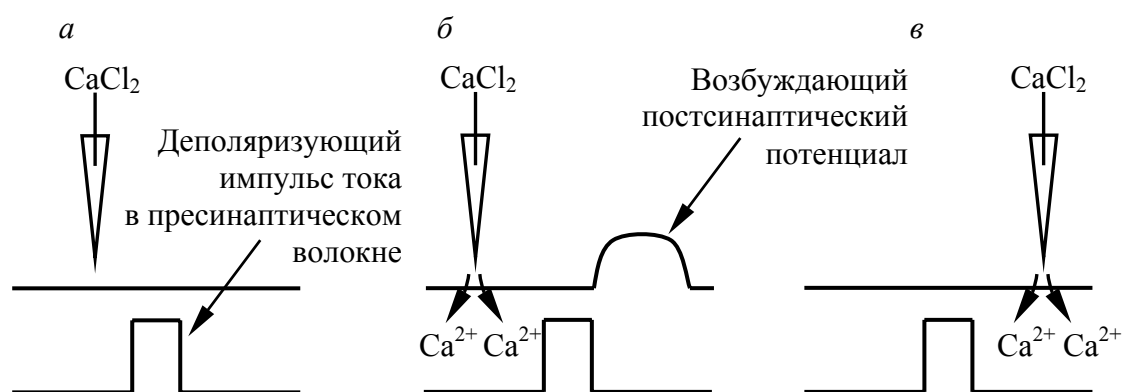


Рис. 39. Постсинаптические потенциалы в нервно-мышечном синапсе:
 а – деполяризация пресинаптического волокна в отсутствие Ca^{2+} (ПСП отсутствуют);
 б – ионофоретическая аппликация Ca^{2+} предшествует деполяризации пресинаптического волокна (ПСП возникают); в – ионофоретическая аппликация Ca^{2+} происходит после деполяризации пресинаптического волокна (ПСП отсутствуют)

КВАНТОВЫЙ ХАРАКТЕР ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МЕДИАТОРА

Эксперименты П. Фэтта и Б. Катца (P. Fatt, B. Katz, 1951, 1952), проведенные на нервно-мышечном препарате лягушки, позволили сформулировать *квантовую гипотезу*, согласно которой высвобождение медиатора из пресинаптического волокна происходит дискретными порциями. При этом итоговый постсинаптический потенциал складывается из небольших, фиксированных по величине (амплитуде) элементарных событий (квантов).

В отсутствие пресинаптической стимуляции нерва, при отведении электрической активности от иннервируемой им мышцы, наблюдаются спонтанно возникающие постсинаптические потенциалы (рис. 40) с амплитудой 0,5–1 мВ – *миниатюрные потенциалы концевой пластинки* (мПКП).

Их временной ход, т. е. форма, и реакция на фармакологические препараты совпадают с ПКП, возникающими при стимуляции нерва. При этом частота появления мПКП возрастает при деполяризации пресинаптического окончания. Они также исчезают при денервации мышцы и вновь появляются после ее реинервации.

Медиатором в нервно-мышечном синапсе лягушки является ацетилхолин; мПКП увеличиваются и удлиняются при действии ингибиторов ацетилхолинэстеразы (фермента, расщепляющего излишки и не связавшиеся с рецептором молекулы ацетилхолина), например простигмина, и исчезают при обработке препарата *d*-тубокурарином (блокатором рецепторов ацетилхолина).

Совокупность экспериментальных данных позволила заключить, что мПКП вызываются случайным высвобождением дискретных количеств медиатора (ацетилхолина) из нервного окончания.

Фиксированная величина спонтанных ПКП может быть обусловлена квантованием реакций рецепторов на отдельные молекулы медиатора. Однако Дж. дель Кастильо и Б. Катц (J. del Castillo, B. Katz, 1957) не



Рис. 40. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки

обнаружили квантованных реакций рецепторов, сходных с мПКП, при электрофоретической аппликации ацетилхолина, порции которого зависели от тока, подаваемого на электрод. Сдвиг постсинаптического потенциала под действием небольшого количества молекул ацетилхолина оказался намного меньше сдвига, соответствующего одному мПКП (0,5 мВ).

Элементарным событием, изменяющим ионную проводимость постсинаптической мембраны, является взаимодействие двух молекул ацетилхолина с одиночным рецептором к данному медиатору. Б. Катц и Р. Миледи (B. Katz, R. Miledi, 1971, 1972) оценили величину потенциала, возникающего при открытии одного ионного канала, управляемого ацетилхолином в 0,3 мкВ. Следовательно, мПКП представляет суммарный результат не менее 1000 таких элементарных деполяризаций.

Использование методики локальной фиксации потенциала показало, что количество тока, протекающего через одиночный рецептор к ацетилхолину, должно вызвать деполяризацию постсинаптического волокна на 1 мкВ.

Ввиду того, что далеко не все высвобождающиеся молекулы медиатора взаимодействуют с рецепторами, поскольку часть теряется в синаптической щели в результате диффузии за ее пределы и гидролиза, общее количество молекул ацетилхолина, вызывающих один мПКП должно быть не менее 10 000.

В начале 70-х гг. XX в. предполагали, что мПКП вызываются мультимолекулярными пакетами, содержащими до $5 \cdot 10^4$ молекул ацетилхолина. Впоследствии оценка числа молекул в кванте несколько снизилась и составила около 7000 (в нервно-мышечном синапсе змей). Это количество (*размер кванта*) является постоянной величиной, отклоняясь от среднего значения не более чем на 10 %. мПКП является результатом открытия 1300 каналов, что требует как минимум 2600 молекул ацетилхолина.

Для того чтобы выяснить, происходит ли выделение ацетилхолина при нормальной синаптической передаче квантами или порциями, градуально изменяющимися по величине, Дж. дель Кастильо и Б. Катц (J. del Castillo, B. Katz, 1954) использовали препараты, перфузируемые раствором с низким содержанием Ca^{2+} или повышенным содержанием Mg^{2+} . В этих условиях амплитуда ПКП, в ответ на стимуляцию пресинаптического волокна одиночными импульсами, колебалась от 0,5 до 2,5 мВ. Минимальная отличная от нуля реакция (*единичный синаптический потенциал*) полностью соответствовала спонтанному мПКП, а потенциалы большей амплитуды были кратны единичному потенциалу.

Распределение амплитуд ПКП, вызванных одиночной стимуляцией пресинаптического волокна, показало наличие нескольких пиков, что изображено на рис. 41.

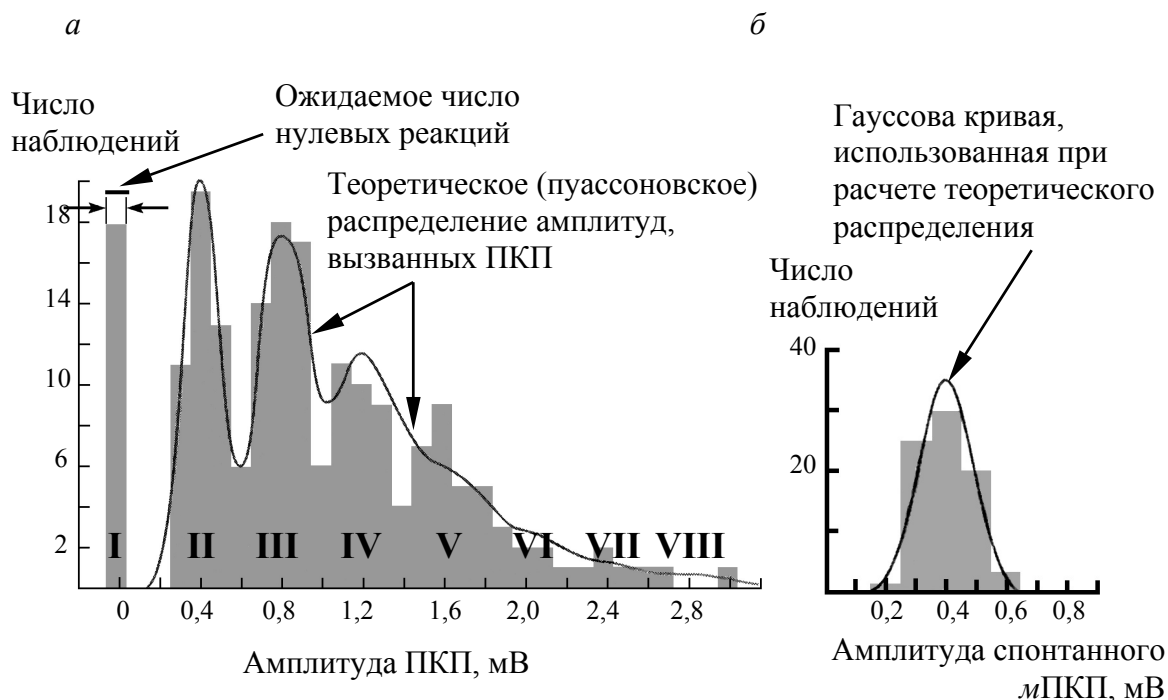


Рис. 41. Квантовый характер синаптической передачи:
 а – распределение амплитуд, вызванных ПКП в нервно-мышечном синапсе млекопитающих; б – распределение амплитуд спонтанных мПКП

Первый пик соответствует числу ПКП с амплитудой 0 мВ, т. е. реакция на стимул отсутствует, второй – числу ПКП с амплитудой, равной величине мПКП (0,5 мВ), третий – количеству ПКП с амплитудой, вдвое больше амплитуды мПКП, четвертый – количеству ПКП с амплитудой, втрое больше амплитуды мПКП, и т. д.

Наличие резко выраженных ступенчатых вариаций амплитуды ПКП, а также тот факт, что средняя амплитуда единичного потенциала равна величине мПКП, позволили предположить, что нормальные ПКП (40–50 мВ) обусловлены выделением не менее 300 квантов медиатора. При этом число освобождаемых квантов меняется от стимула к стимулу, а амплитуда ПКП, возникающих в ответ на стимуляцию, колеблется из-за случайных флуктуаций числа высвобождающихся квантов. Последнее соответствует *биномиальному распределению*.

В этом случае среднее число квантов m (*квантовый выход*), которое высвобождается последовательными стимулами и определяет ПКП, рассчитывается по формуле

$$m = n \cdot p,$$

где n – запас, из которого берутся высвобождаемые кванты, p – вероятность высвобождения для отдельных квантов ($q = 1 - p$, вероятность того, что квант не освободится).

При $n = 5$ и $p = 0,1$ ($q = 0,9$) для серии из 100 стимулов получим, что вероятность отсутствия реакции, высвобождение одного, двух, трех, четырех и пяти квантов определяются по формуле биномиального распределения: $100 \cdot (q + p)^5 = 100 \cdot (q^5 + 5q^4p + 10q^3p^2 + 10q^2p^3 + 5qp^4 + p^5) = 59$ (нет ответа) + 33 (один квант) + 7 (два кванта) + 1 (три кванта) + 0 (четыре кванта) + 0 (пять квантов).

Итоговая формула, позволяющая предсказать вероятность той или иной реакции в случае одиночного стимула, а также ожидаемое число каждой из реакций в случае серии стимулов таково:

$$P = \binom{n}{x} p^x q^{n-x} = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x q^{n-x},$$

где $\binom{n}{x}$ означает число возможных выборов квантов x из совокупности в n квантов. При этом число стимулов, которые высвобождают x квантов, определяется как $N_x = N \cdot P_x$, где N – общее число стимулов.

Квантовый выход представляет собой меру количества высвобождаемого медиатора, отражая такие особенности пресинаптических окончаний, как их величина, число концевых веточек одного пресинаптического волокна, различия в высвобождении квантов при изменении эффективности синаптической передачи.

К сожалению, биномиальное распределение – двухпараметрическое, т. е. для успешного предсказания реакции системы необходимо знать как минимум два из трех (m , n , p) параметров. При этом наиболее надежно путем экспериментальных измерений можно определить лишь значение квантового выхода (m). Однако в ряде случаев p очень мало, по сравнению с n , в частности при низких концентрациях Ca^{2+}_{out} . В результате биномиальное распределение можно заменить однопараметрическим *распределением Пуассона* и, зная m , описать его целиком.

Так, в случае нулевой реакции ($x = 0$) получим $P_0 = q^n$, а при очень больших значениях n имеем $P_0 = e^{-m}$, принимая во внимание, что $q = 1 - p$, а $p = m/n$.

Общая формула для расчета вероятности реакций из любого числа x единичных постсинаптических потенциалов при этом таково:

$$P_x = \frac{m^x e^{-m}}{x!}.$$

Существует несколько независимых способов оценки m :

- прямая оценка (m_1) может быть получена делением средней амплитуды постсинаптических потенциалов серии на среднюю амплитуду спонтанных мПКП (единичного синаптического потенциала);

- в случаях, когда m мало, а высвобождение распределено по времени, прямое значение квантового выхода получают, подсчитывая число квантов, высвобождаемых всеми стимулами серии, и делят его на число стимулов;

- используя распределение Пуассона и принимая $x = 0$, а также то, что $P_0 = N_0/N$, т. е. числу стимулов, когда реакция отсутствовала, деленному на общее число стимулов, m_0 может быть определено из отношения числа пресинаптических стимулов, не вызвавших реакции, к общему числу стимулов по формуле

$$m_0 = \ln \frac{N}{N_0};$$

- рассчитывая коэффициент вариации (КВ) квантового выхода по коэффициенту вариации амплитуды постсинаптических потенциалов для некоторой серии импульсов, можно оценить m :

$$\text{КВ} = \frac{\sqrt{m}}{m} = \frac{1}{\sqrt{m}},$$

откуда

$$m_{\text{КВ}} = \frac{1}{(\text{КВ})^2}.$$

Дисперсия (т. е. распределение вероятностей случайной величины) распределения Пуассона равна среднему значению, т. е. m , а коэффициент вариации представляет собой отношение стандартного отклонения (корень квадратный из дисперсии или \sqrt{m}) к среднему значению.

Дж. дель Кастильо и Б. Катц получили схожие значения m при использовании разных методик его расчета, что послужило серьезным доказательством в пользу квантовой гипотезы.

Значения m могут колебаться в достаточно больших пределах, от 100–300, применительно к нервно-мышечным синапсам позвоночных, гигантскому синапсу кальмара, центральным синапсам моллюсков, до 2–20 в вегетативных ганглиях и до 1–3 в синапсах спинного мозга позвоночных. Величина p оценивается как 0,15–0,5. Число n может также достаточно сильно варьироваться – от 1000 в нервно-мышечном соединении позвоночных до 3 в одиночных окончаниях рака.

Квантовая гипотеза позволяет оценить эффективность изменения синаптической передачи и относительный вклад пре- и постсинаптических факторов. Средняя амплитуда синаптических потенциалов (*эффективность синапса*) определяется как

$$\bar{E} = m \cdot \bar{q},$$

где \bar{q} – средняя амплитуда единичных синаптических потенциалов, m – средний квантовый выход.

При этом величина m отражает вклад пресинаптических механизмов, а \bar{q} характеризует реакцию постсинаптической мембраны на один квант медиатора и во многом зависит от свойств постсинаптической клетки.

Помимо квантового высвобождения, значительное (в 100 раз большее) количество ацетилхолина просачивается во внеклеточное пространство в не-квантовой форме. В нормальных условиях утечка медиатора не вызывает заметного постсинаптического эффекта вследствие его инактивации (гидролиза) в синаптической щели посредством ацетилхолинэстеразы. В противоположность этому, благодаря субстратному ингибированию, 7000 молекул ацетилхолина (квант) способны преодолеть активность ацетилхолинэстеразы и обеспечить связывание с достаточным для развития постсинаптического потенциала количеством рецепторов к ацетилхолину.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ КВАНТОВОГО ВЫХОДА МЕДИАТОРА

При помощи электронной микроскопии было показано, что пресинаптические нервные терминалы содержат большое количество мелких органелл – *синаптических пузырьков* (везикул). Биохимически было установлено, что большая часть внутриклеточного ацетилхолина и адреналина оказывается связанной с фракцией пузырьков при субклеточном фракционировании.

Была сформулирована *везикулярная гипотеза* высвобождения медиатора, согласно которой квант медиатора соответствует содержимому одного синаптического пузырька, а высвобождение везикул происходит путем экзоцитоза. В результате слияния мембраны синаптического пузырька с плазмалеммой его содержимое (медиатор) попадает в синаптическую щель.

Полагают, что число мест высвобождения синаптических пузырьков на плазмалемме пресинаптического волокна постоянно, однако доля «заряженных» везикулами участков мембраны может изменяться. Процесс «зарядки» мембраны синаптическими пузырьками называют *мобилиза-*

цией, а процесс освобождения содержимого везикулы – разрядкой (высвобождением).

Вероятность высвобождения медиатора (p) состоит из вероятности перехода синаптического пузырька в место высвобождения и вероятности того, что потенциал действия высвободит квант из активного участка.

Дж. Хаузер и Т. Риз в 70–80-х гг. XX в. (J. M. Heuser, T. S. Reese, 1973, 1979) обнаружили сильную корреляцию между количеством опорожнений везикул и временным ходом квантового высвобождения медиатора. Развитие методов флуоресцентной микроскопии позволило прямо наблюдать движение везикул внутри клетки, их скопление и последующее слияние с мембраной пресинаптического волокна, сопровождаемое переходом флуоресцируемого содержимого в синаптическую щель.

В синапсах сетчатки высвобождение медиатора происходит посредством транспортных белков мембраны пресинаптической клетки, т. е. не носит квантового характера.

Уменьшение количества синаптических пузырьков при электрической стимуляции нервного волокна (рис. 42) происходит параллельно с увеличением площади поверхности аксона.

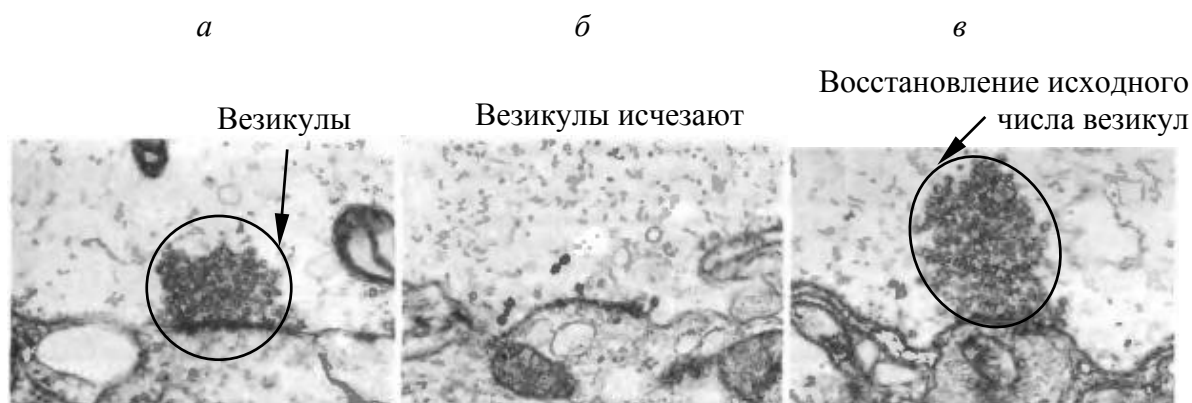


Рис. 42. Квантовый характер синаптической передачи:

а – контрольные условия; б – через 15 минут после стимуляции волокна с частотой 20 Гц; в – через 1 час после прекращения стимуляции (по Дж. Г. Николс и др., 2003)

Это послужило основанием для предположения о включении мембраны везикулы в состав плазмалеммы (W. P. Hurlbut, B. Ceccarelli, 1974). Впоследствии мембрана синаптического пузырька используется повторно при образовании новых везикул (*рециклизация*). Полный цикл от момента слияния везикулы с мембраной клетки до формирования новых синаптических пузырьков занимает менее одной минуты. При усиленной сти-

муляции пресинаптической терминали наблюдается увеличение времени круговорота везикул.

При исследовании экзоцитоза в хромаффинных клетках был предложен новый механизм поведения синаптических пузырьков, названный «*kiss and run*». Соединение везикулы с мембраной сопровождается формированием небольшой поры, через которую часть содержимого синаптического пузырька устремляется наружу. Впоследствии пора закрывается и везикула отходит внутрь клетки. При этом не происходит инкорпорирования мембраны синаптического пузырька в плазмалемму.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕДИАТОРА

Существуют по меньшей мере две субпопуляции синаптических пузырьков в нервных окончаниях. Первая из них образована скоплением везикул, способных к немедленному экзоцитозу и содержащих преимущественно вновь синтезированные молекулы медиатора. Для них характерен быстрый круговорот. Вторая группа представлена более многочисленными везикулами, находящимися в резерве и используемыми при усилении активности.

В 80-х гг. XX в. было открыто семейство белков (*синапсинов*), ассоциированных с мембраной синаптических пузырьков. Это фосфопротеины, способные взаимодействовать с большим количеством внутриклеточных белков, в том числе актином и нейрофиламентами, микротрубочками (тубулином), кальмодулином, спектрином, синтаксином и др.

Существует три изоформы синапсинов: I (Ia, Ib), II (Ia, Ib) и III. Они различаются по регуляторному влиянию, оказываемому на них Ca^{2+} . Синапсин I активируется ионами кальция, синапсин II – Ca^{2+} -независимый белок, а синапсин III угнетается в присутствии ионов кальция. Таким образом, три изоформы синапсинов обеспечивают разнообразные типы Ca^{2+} -регуляции в пресинаптической области.

Прикрепляя везикулы к элементам цитоскелета, синапсины препятствуют их свободному перемещению в пределах нервной терминали. Фосфорилирование указанных белков (синапсина I) посредством Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ приводит к отделению синаптических пузырьков от цитоскелета, увеличивая квантовый выход. Помимо этого, синапсин I вовлечен в процессы переноса везикул из одной субпопуляции в другую.

Процесс высвобождения медиатора начинается с образования комплекса между белками везикулярной мембраны (*v-SNARE*, «*v*» – *vesicle*) и белками активной зоны пресинаптической терминали (*t-SNARE*, «*t*» –

target), который удерживает синаптический пузырек в определенном положении и способствует слиянию мембран в присутствии Ca^{2+} (гипотеза SNARE, предложенная Т. Солнером и Дж. Ротманом (T. Sollner, J. E. Rothman, 1994)).

Б. Катц и Р. Миледи (B. Katz, R. Miledi, 1969) первыми постулировали, что присутствие ионов кальция увеличивает вероятность высвобождения медиатора, облегчая мобилизацию везикул и слияние их с плазмалеммой. Предполагалось, что ионы кальция изменяют пресинаптическую мембрану таким образом, что на ее внутренней стороне увеличивается количество мест для разрядки синаптических пузырьков. При этом для освобождения одного кванта требуется от одного до четырех ионов кальция.

Важная роль в процессе слияния везикул с плазмалеммой отводится растворимым белкам: NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor* – фактор, чувствительный к N-этилмалеимиду), обладающему АТФазной активностью, и семейству SNAP (*soluble NSF attachment proteins* – растворимые белки, прикрепленные к NSF).

Белки, способные выступать в качестве рецепторов к SNAP, SNARE-белки (от **SNAP receptors**), расположены как в цитоплазматической мембране (*t*-SNARE), так и в мембране везикул (*v*-SNARE).

В мембрану синаптического пузырька встроены *синаптобrevин*, известный также как VAMP (*vesicle associated membrane protein* – белок, ассоциированный с мембраной везикулы), взаимодействующий с находящимся в плазмалемме *синтаксином* и белком *SNAP-25* (*synaptosomal associated protein* – белок, ассоциированный с синаптосомами, *M(r)* 25 кДа).

Помимо этого, Ca^{2+} -зависимый белок *синаптотагмин* способен взаимодействовать с белками везикулярной и плазматической мембран, предотвращая их слияние в отсутствие Ca^{2+} и усиливая экзоцитоз при поступлении Ca^{2+} внутрь клетки. Кроме того, синаптотагмин может связываться с белками кальциевых каналов, позиционируя везикулу в участке с повышенным содержанием Ca^{2+} (рис. 43).

К образуемому после снятия ингибирующего влияния синаптотагмина комплексу белков *t*-SNARE и *v*-SNARE присоединяются NSF и SNAP.

Считается, что гидролиз АТФ под действием NSF приводит к распаду комплекса, сопровождаемому слиянием мембран синаптического пузырька и нервного окончания. Тем не менее тонкие детали этого явления изучены не до конца.

В механизмах экзоцитоза, происходящего по принципу «*kiss and run*», может быть задействован белок *синаптофизин* (p38), сходный по строению с белками щелевых контактов – коннексинами. В этом случае речь может идти об образовании обычной трансмембранной поры, через которую содержимое синаптического пузырька попадет в межклеточную среду.

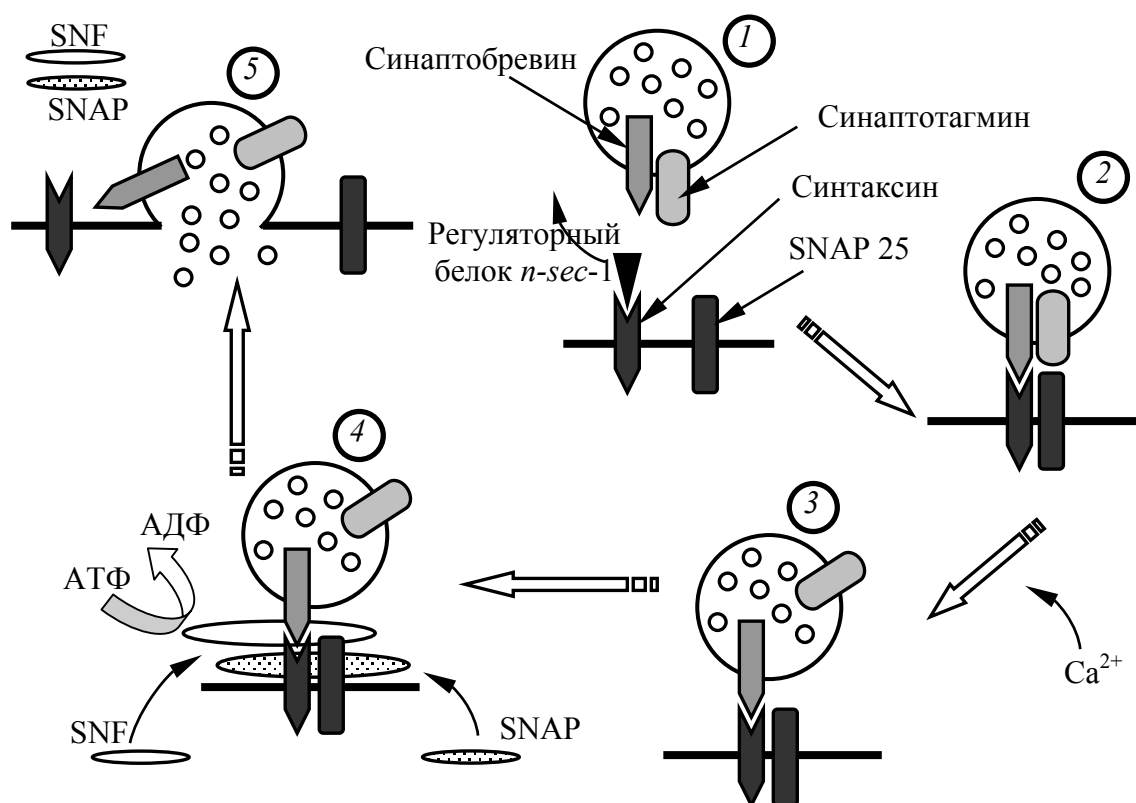


Рис. 43. Модель слияния синаптических пузырьков с мембраной

Таким образом, выделению медиатора в синаптическую щель предшествует целый каскад биохимических превращений, требующих временных затрат. В результате при химической передаче сигнала происходит *синаптическая задержка*, т. е. реакция постсинаптической клетки (постсинаптический потенциал) наблюдается спустя некоторое время (около 1 мс) после окончания развития потенциала действия в пресинаптическом волокне.

ГЛАВА 6 ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

СИНАПТИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИЗМЕНЕНИЕМ ПРОВОДИМОСТИ МЕМБРАНЫ

П. Фэтт и Б. Катц (P. Fatt, B. Katz, 1951–1953), а также Дж. Экклз (J. Eccles, 1957) применили ионную гипотезу для анализа синаптической передачи в химических синапсах. Оказалось, что изменения мембранной проводимости опосредуют возбуждающие и тормозные синаптические

воздействия. В основе наблюдаемых эффектов лежит взаимодействие выделившегося из пресинаптической терминали медиатора с соответствующим рецептором постсинаптической мембраны.

Очевидно, что возможны два базовых варианта изменения ионной проводимости постсинаптической мембраны, определяющие возникновение синаптических потенциалов.

1. Синаптические потенциалы, связанные с увеличением проводимости.

Возбуждающие ПСП. Их развитие связано с увеличением проницаемости мембраны для катионов, прежде всего для Na^+ и K^+ . ВПСП стремится сдвинуть мембранный потенциал в сторону деполяризации дальше порога генерации потенциала действия (-45 мВ). Характер реакции мембраны отдаленно напоминает таковой при развитии потенциала действия, но отличается от последнего целым рядом особенностей:

- возрастание натриевой и калиевой проводимостей происходит одновременно, а не последовательно, как при развитии потенциала действия;
- увеличение Na^+ -проводимости не носит регенеративного характера, т. е. Na^+ -каналы, активируемые медиатором, не являются потенциал-чувствительными;
- натриевая проводимость не снижается при действии ТТХ, а калиевая при аппликации ТЕА, что лишний раз подчеркивает участие в их развитии ионных каналов другого типа, нежели при возникновении потенциала действия.

Важной характеристикой ионного механизма, вызывающего ПСП, является уровень мембранного потенциала, при котором постсинаптический потенциал становится равным нулю (*потенциал инверсии*). Этот вопрос был исследован А. Такеучи и Н. Такеучи (A. Takeuchi, N. Takeuchi, 1959, 1960) при использовании методики фиксации потенциала.

Оказалось, что при сдвиге мембранного потенциала с -60 до -90 мВ, т. е. при гиперполяризации, амплитуда ВПСП возрастала (рис. 44).

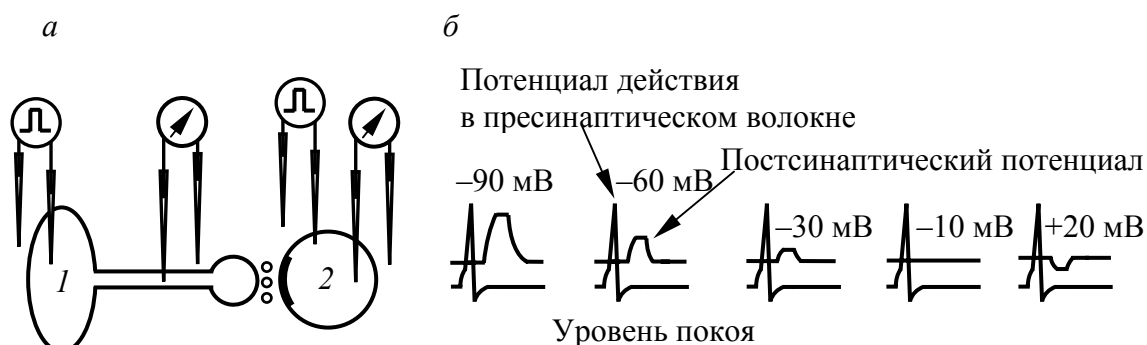


Рис. 44. ВПСП, связанные с увеличением проводимости:
а – схема эксперимента; б – определение потенциала инверсии:
1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

При этом через ионные каналы постсинаптической мембраны проходит больший входящий, а через несинаптическую мембрану больший выходящий ток, который, собственно, и приводит к развитию деполяризации. Постепенная деполяризация мембраны вызывает прогрессивное снижение амплитуды ВПСП. При мембранном потенциале от -10 до -15 мВ ВПСП обращается в нуль. Дальнейшая деполяризация вызывает инверсию ВПСП и линейный рост его амплитуды. При этом регистрируется суммарный выходящий ток через участки постсинаптической мембраны и, как следствие, гиперполяризация несинаптической мембраны. В физиологических условиях под влиянием медиатора мембранный потенциал от исходного уровня (-60 мВ) через порог (-45 мВ) сдвигается по направлению к потенциалу инверсии.

Потенциал инверсии для возбуждения ($E_{\text{ВПСП}}$) представляет собой среднее значение между натриевым ($+55$ мВ) и калиевым (-75 мВ) равновесными потенциалами. Следовательно, ионные токи, проходящие через синаптическую мембрану, не могут быть обусловлены движением только ионов натрия, поскольку в этом случае $E_{\text{ВПСП}}$ должен был бы соответствовать E_{Na} , ни тем более ионов кальция ($E_{\text{Ca}} = +120$ мВ), калия ($E_{\text{K}} = -75$ мВ) или хлора ($E_{\text{Cl}} = -65$ мВ). Изменение наружной концентрации натрия, калия и кальция приводит к изменению потенциала инверсии, в то время как концентрация ионов хлора никак не влияет на его величину. Использование радиоактивных изотопов также показало возрастание проницаемости постсинаптической мембраны только для катионов. Изучение методом локальной фиксации потенциала проводимости управляемых ацетилхолином ионных каналов постсинаптической мембраны показало, что они относительно легко проницаемы для Na^+ (входящий ток), K^+ (выходящий ток) и Ca^{2+} (входящий ток) в соответствии с их электрохимическими градиентами. При этом кальциевая проводимость относительно мала и ей можно пренебречь, а натриевая проводимость несколько выше калиевой из-за того, что количество ионов натрия, доступных для перемещения через канал, превышает таковое для K^+ .

Тормозные ПСП. Взаимодействие медиатора с рецептором приводит к увеличению ионной проницаемости постсинаптической мембраны для ионов калия и хлора. В большинстве случаев равновесный потенциал для этих ионов превышает уровень потенциала покоя. В результате при открытии соответствующих ионных каналов, когда K^+ и Cl^- начнут движение по градиенту своих концентраций соответственно из клетки или в клетку, потенциал на мембране будет стремиться достигнуть уровня E_{K} или E_{Cl} , т. е. будет происходить гиперполяризация клетки.

При оценке потенциала инверсии для торможения ($E_{\text{ТПСП}}$) применяются те же методы, что и в случае возбуждения (рис. 45).

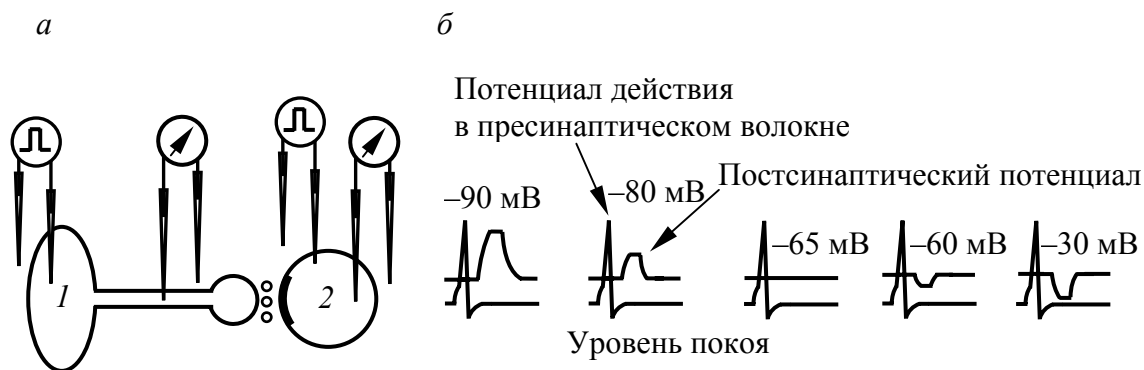


Рис. 45. ТПСП, связанные с увеличением проводимости:
 а – схема эксперимента; б – определение потенциала инверсии:
 1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

При деполяризации мембраны постсинаптической клетки наблюдается увеличение амплитуды ТПСП, поскольку уровень мембранного потенциала еще больше смещается по отношению к равновесным потенциалам для калия или хлора. При сильной гиперполяризации, например до -100 мВ, электродвижущая сила превысит действие концентрационного градиента, и в результате ионы хлора начнут выходить из клетки, а ионы калия, напротив, поступать в нее. В обоих случаях это приведет к деполяризации, т. е. реверсии ТПСП. Значение $E_{\text{ТПСП}}$ при этом будет соответствовать равновесным потенциалам для K^+ или Cl^- .

ТПСП, связанные с увеличением проводимости, способны реализовывать тормозное воздействие на клетку двумя способами:

- увеличивают проводимость мембраны (*шунтирующее* или *закорачивающее* действие), что наблюдается во всех случаях;
- гиперполяризуют мембрану клетки, уводя ее от порога (не наблюдается в клетках с высоким значением потенциала покоя).

Даже в случаях, когда ТПСП не гиперполяризует мембрану, его развитие препятствует развитию возбуждения за счет фиксации мембранного потенциала на уровне E_K или E_{Cl} .

2. Синаптические потенциалы, связанные с уменьшением проводимости.

Впервые были обнаружены в нервной системе моллюска *Aplysia*. Встречаются гораздо реже и действуют медленно, т. к. связаны с увеличением сопротивления мембраны, а следовательно, и постоянной времени мембраны (τ_m).

Возбуждающие ПСП. Для некоторых клеток характерна высокая проницаемость мембраны для ионов калия. В результате мембранный потенциал таких клеток несколько выше «нормального» уровня (-60 мВ). Под действием медиатора указанные каналы закрываются, калиевая проводимость падает и клетка деполяризуется.

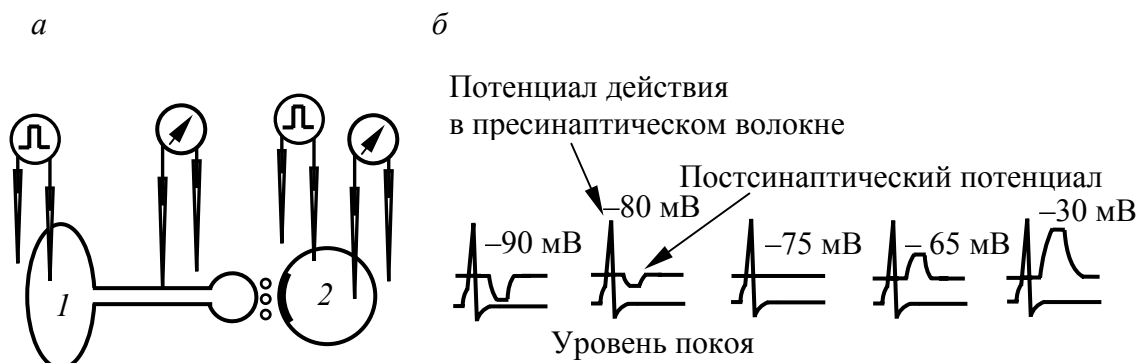


Рис. 46. ВПСП, связанные с уменьшением проводимости:
 а – схема эксперимента; б – определение потенциала инверсии:
 1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

Данные ВПСП ведут себя иначе, нежели ВПСП, связанные с увеличением проводимости (рис. 46).

Деполаризация постсинаптической мембраны приводит к увеличению их амплитуды, а гиперполяризация, напротив, вызывает инверсию таких ВПСП (потенциал инверсии равен E_K). Это объясняется тем, что при деполяризации мембраны выключится больший синаптический ток, что вызовет большую деполяризацию. При гиперполяризации мембраны дальше уровня E_K результирующий электрохимический градиент изменится таким образом, что ионы калия будут стремиться войти в клетку и деполяризовать ее. В этом случае выключение калиевой проводимости приводит к гиперполяризации клетки.

ВПСП, обусловленные уменьшением проводимости, могут быть более эффективными, чем ВПСП, связанные с увеличением проводимости, поскольку они увеличивают проводимость находящихся поблизости и работающих одновременно возбуждающих каналов постсинаптической мембраны.

Тормозные ПСП. Характерны для клеток с высокой натриевой проводимостью в покое. В результате из-за просачивания Na^+ внутрь клетки ее мембранный потенциал будет ниже «нормального» уровня. Действие медиатора выключает эту повышенную проводимость мембраны и клетка гиперполяризуется.

Гиперполяризация постсинаптической мембраны увеличивает амплитуду таких ТПСП (рис. 47).

Это происходит за счет того, что в этих условиях входящий (Na^+) деполяризующий ток усиливается, поэтому его инактивация делает мембрану клетки более электроотрицательной (гиперполяризует клетку). Деполаризация мембраны уменьшает их амплитуду, а при достижении E_{Na} (+55 мВ) ТПСП обращаются в нуль. При еще больших деполяризациях,

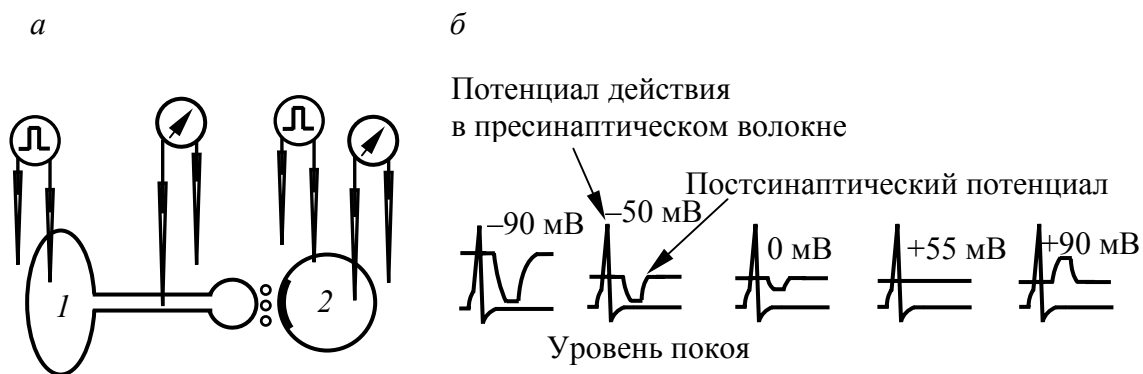


Рис. 47. ТПСП, связанные с уменьшением проводимости:
 а – схема эксперимента; б – определение потенциала инверсии:
 1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

например +100 мВ, указанные ТПСП изменяют знак и превращаются в деполяризующий постсинаптический потенциал. В этом случае натриевая проводимость обуславливает выходящий (как следствие нового электрохимического градиента) гиперполяризующий ток. Его инактивация приводит к деполяризации клетки. Тормозное действие ТПСП, обусловленных уменьшением проводимости, менее эффективно по сравнению с ТПСП, вызываемыми увеличением проводимости мембраны. Это обусловлено тем, что последние способны закорачивать близлежащие возбуждающие каналы синаптической мембраны и каналы несинаптической мембраны, обеспечивающие генерацию потенциала действия.

ЭКВИВАЛЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ПРЯМОЙ И НЕПРЯМОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

Прямая синаптическая передача обусловлена наличием щелевых контактов между взаимодействующими клетками. В результате часть тока (токов), возникающего в пресинаптической клетке, протекая через обладающие невысоким сопротивлением коннексоны, попадает внутрь постсинаптической клетки (рис. 48).

Распространение тока происходит при помощи электротона, поэтому передачу через электрические синапсы часто называют *электротонической*. Таким образом, изменение потенциала в пресинаптической клетке вызывает в постсинаптической клетке однонаправленный сдвиг потенциала, как правило, меньшей амплитуды из-за потерь, связанных с преодолением сопротивления внутренней среды клетки и утечки тока через мембрану клеток и область щелевого контакта.

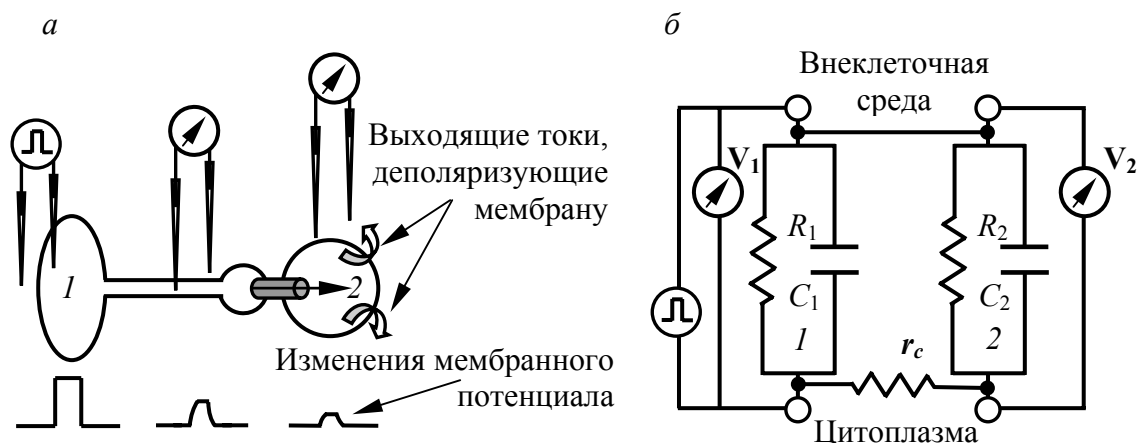


Рис. 48. Протекание тока в электрическом синапсе:
 а – схема эксперимента; б – эквивалентная электрическая схема:
 1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

Важнейшей характеристикой прямой синаптической передачи является *коэффициент связи*. Это безразмерная величина, позволяющая оценить степень падения амплитуды сигнала при передаче от клетки к клетке. Он определяется как

$$\frac{V_2}{V_1} = \frac{R_2}{(R_2 + r_c)}, \text{ в случае передачи в прямом направлении, и}$$

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{R_1}{(R_1 + r_c)}, \text{ в случае передачи в обратном направлении,}$$

где V_1 , R_1 и V_2 , R_2 – изменения потенциала и входные сопротивления пре- и постсинаптической клеток, r_c – сопротивление связи между ними.

При этом в формулу для определения коэффициента связи не входит сопротивление пресинаптической клетки. Это теоретически объясняет наличие *выпрямляющих свойств* электрических синапсов, т. е. передачу сигнала преимущественно в одном направлении, а не в обоих, как это можно предположить, исходя из их структурной организации.

Действительно, если сопротивление мембраны постсинаптического нейрона (R_2) значительно превышает сопротивление связи (r_c), то коэффициент прямой связи (V_2/V_1) будет стремиться к единице – сигнал передается с минимальными потерями в амплитуде. В случае, когда сопротивление мембраны пресинаптического нейрона (R_1) мало по сравнению с сопротивлением связи (r_c), коэффициент обратной связи (V_1/V_2) стремится к нулю – сигнал передается с большими потерями амплитуды. Таким образом, в одном направлении передача сигнала может быть намного эффективнее.

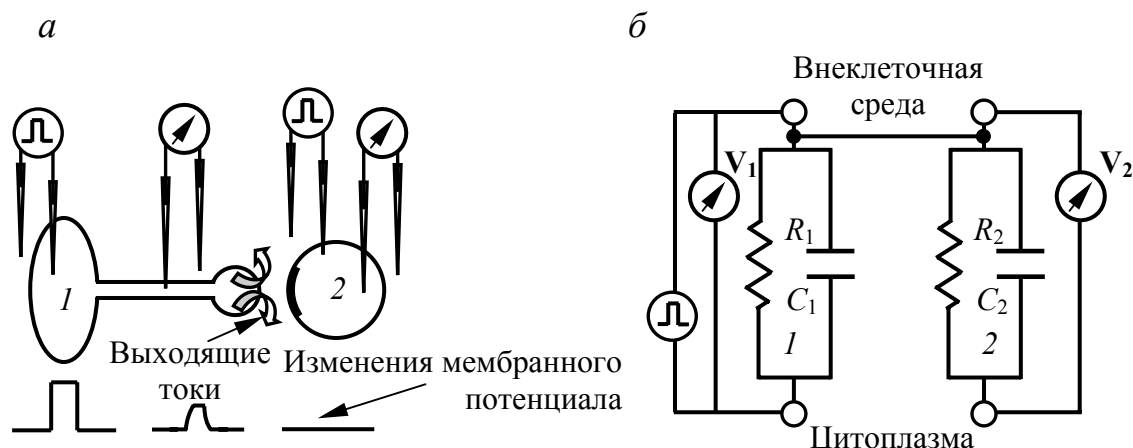


Рис. 49. Протекание тока в химическом синапсе:
 а – схема эксперимента; б – эквивалентная электрическая схема:
 1 – пресинаптическая клетка; 2 – постсинаптическая клетка

В химических синапсах мембраны взаимодействующих клеток расположены на некотором удалении друг от друга (200 \AA). При этом внеклеточная жидкость, разделяющая их, обладает низким электрическим сопротивлением (рис. 49).

В результате электрический ток, генерируемый любой из мембран, почти полностью уходит через синаптическую щель во внеклеточное пространство.

Подсчитано, что в синапсе диаметром 2 мкм на другую сторону синаптической щели проходит менее одной тысячной доли тока, при действии относительно длительных токов (J. L. Eccles, J. C. Jaeger, 1958). При более кратковременных токах, например при развитии потенциала действия, через синаптическую щель протекает менее одного процента генерируемого тока (Дж. Экклз, 1966). В случаях, когда синапсы с химической передачей сигнала имеют большую площадь контакта синаптических мембран, весьма значительная часть тока, генерируемая пресинаптическим потенциалом действия, может проходить к постсинаптической мембране. В результате осуществляется прямая передача сигнала через синапс, предшествующая не прямой (электрохимические синапсы).

На эквивалентных электрических схемах химические синапсы характеризуются отсутствием связующего сопротивления между пре- и постсинаптической клеткой, а для электрических синапсов обязательно присутствие сопротивления связи (см. рис. 48, б и 49, б).

ЭЛЕКТРОТОНИЧЕСКИЕ СИНАПСЫ

Работы нейрофизиологов первой половины XX в. убедительно свидетельствовали, что синаптическая передача осуществляется только химическим путем. Однако Э. Фершпан и Д. Поттер (E. J. Furshpan, D. D. Potter,

1957) показали, что в нервной системе речного рака существует и электрический синапс. Его морфологической основой является структура типа щелевого контакта. Классификация электротонических синапсов основана на их функциональных характеристиках, а также способности проводить электрические сигналы в разных направлениях.

Электротонические синапсы двустороннего проведения. У беспозвоночных (кольчатые черви и ракообразные) в состав нервной системы входят гигантские аксоны, разделенные поперечными перегородками на сегменты (рис. 50, а). Последние не оказывают сопротивления продольному движению тока любой направленности в любом направлении, т. е. не обладают свойствами электрического выпрямителя. Перегородки представляют собой участок толщиной 200 \AA , где мембраны каждого сегмента аксона плотно прилегают друг к другу. В ряде случаев (у ракообразных) перегородки обладают значительным сопротивлением, что приводит к возникновению задержки передачи сигнала в $0,1\text{--}0,2 \text{ мс}$, и, по сути, функционируют как дополнительное сопротивление аксоплазмы, ослабляя электротоническое распространение деполяризации, лежащее в основе распространения потенциала действия. В противоположность этому, септальные мембраны кольчатых червей характеризуются низким сопротивлением (r_c мало). В результате передача сигнала ослабляется в гораздо меньшей степени.

Схожими характеристиками обладают и комиссуральные ветви, соединяющие два гигантских латеральных аксона в каждом сегменте. Эти контакты действуют одинаково в обоих направлениях в отношении импульсов и электротона. Коэффициент ослабления, в зависимости от вида животного, колеблется от 3 до 12.

Двусторонние электрические синапсы выявлены и между нейронами: в сердечном ганглии омара, ганглиях моллюсков и пиявки, спинном мозге рыб и амфибий, гиппокампе млекопитающих и т. д. В итоге, потенциал действия в одном нейроне способен вызвать пассивную деполяризацию в другом и даже вызвать генерацию импульса. Это свойство лежит в основе одной из важнейших функций, выполняемых электротоническими синапсами, – *синхронизации активности* групп нейронов.

Электротонические синапсы одностороннего проведения. Именно моторный синапс между латеральным гигантским волокном (пресинаптическое) и гигантским моторным волокном (постсинаптическое) третьего корешка рака впервые был описан Э. Фершпаном и Д. Поттером в качестве электрического (рис. 50 а, б).

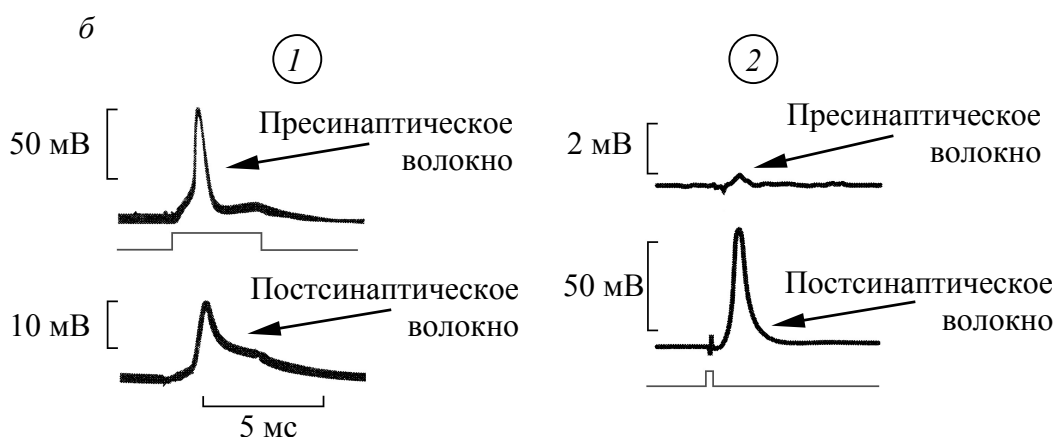
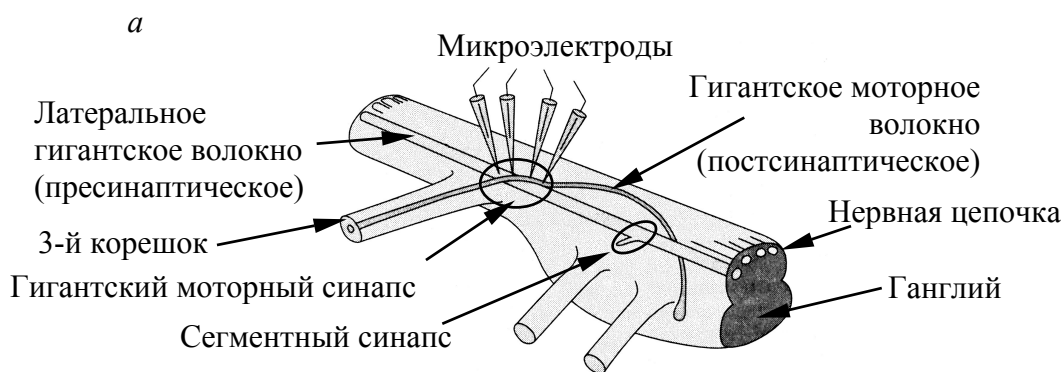


Рис. 50. Электрические синапсы в нервной системе рака:

a – брюшная нервная цепочка (схема); *б* – проведение сигнала в одностороннем электрическом синапсе:

1 – при электрической стимуляции пресинаптического волокна;

2 – при электрической стимуляции постсинаптического волокна

В этом случае возможна передача возбуждения только в одном (прямом) направлении, практически без задержки.

Задержка составляет 0,1 мс, что в 10–20 раз меньше времени синаптической задержки в синапсе звездчатого ганглия кальмара. Постсинаптическая реакция в прямом направлении имеет форму ВПСП или на его основе возникает потенциал действия. При возникновении потенциала действия в постсинаптическом волокне величина ВПСП составляет всего 0,3 мВ.

Некоторые электротонические синапсы, например между нейронами пиявки, обладают свойством *двойного выпрямления*. Так, через указанные контакты в прямом направлении хорошо передаются деполяризующие и плохо гиперполяризующие толчки тока. Для передачи в обратном направлении характерно противоположное.

Электротоническая передача сигнала обладает рядом преимуществ по сравнению с химической. Во-первых, это более высокая скорость прове-

дения возбуждения, обусловленная отсутствием или значительным снижением синаптической задержки, что существенно для реализации быстрых рефлексов избегания. Во-вторых, в основном за счет простоты организации, электрические синапсы отличаются большей надежностью – не подвержены действию нейротоксинов, синаптической депрессии.

Тем не менее химические синапсы обеспечивают значительно более высокую степень регуляции, а также специфичность межклеточной коммуникации. Как следствие, по мере усложнения организации нервной системы химические синапсы в значительной степени вытеснили электрические.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ (СМЕШАННЫЕ) СИНАПСЫ

Данный тип межклеточного соединения традиционно выделяется нейрофизиологами, хотя он представляет собой обычный химический синапс, обладающий рядом морфологических особенностей. Прежде всего, это очень большая площадь синаптического контакта, а также наличие многочисленных глиальных элементов, плотно окружающих область синапса. В результате значительная часть тока, возникающего в пресинаптической терминали под влиянием приходящего потенциала действия, может перетекать в постсинаптическую клетку, вызывая в ней развитие возбуждения.

Функционально электрохимические синапсы подразделяются на две группы:

1. Возбуждающие электрохимические синапсы. Впервые были описаны А. Мартином и Г. Пиларом (A. Martin, G. Pilar, 1963) в цилиарном ганглии цыпленка (описание строения см. гл. 1). При электрической стимуляции пресинаптической клетки наблюдается двухкомпонентная реакция постсинаптического нейрона. Начальная кратковременная компонента обусловлена постоянным электрическим током, затекающим в постсинаптическую клетку. Вторая компонента представляет собой ВПСП, генерируемый под действием медиатора. Она возникает через 1,5–2,0 мс после первой, уменьшается при гиперполяризации постсинаптического нейрона и блокируется при действии *d*-тубокурарина, как это характерно для холинергического синапса (рис. 51).

В нормальных условиях примерно для половины исследованных чашевидных синапсов цилиарного ганглия характерна электрическая передача в прямом направлении, а для большинства также и в обратном. Синаптическая щель шунтирует часть тока, поэтому фактор надежности электрической передачи сигнала значительно ниже, нежели в «классических» электротонических синапсах. Поэтому между клетками цилиарного

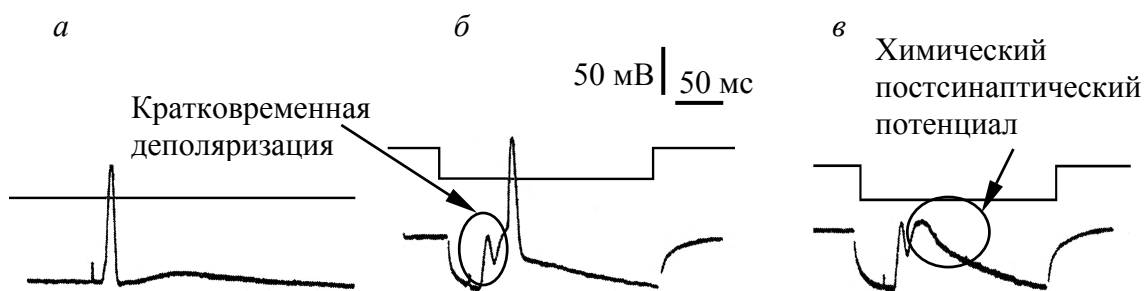


Рис. 51. Передача сигнала в цилиарном ганглии цыпленка:
 а – стимуляция преганглионарного волокна вызывает появление потенциала действия в постсинаптическом нейроне; б – при гиперполяризации постсинаптического нейрона обнаруживается ранняя кратковременная деполяризация, обусловленная «затеканием» тока из пресинаптического волокна; в – выявление химического ПСП при еще более сильной гиперполяризации

ганглия существует эффективная химическая передача, а электрическая передача не имеет особого функционального значения, по-видимому, представляя собой побочное следствие большой площади синаптического контакта.

2. Тормозные электрохимические синапсы. Совершенно другим образом организована передача в нервных окончаниях маутнеровских нейронов рыб. Эти клетки головного мозга вовлечены в реализацию рефлекса избегания (бегства), который у костистых рыб выражается в резких ударах хвостом, приводящих к тому, что рыбы быстро уплывают из опасной зоны. Маутнеровские нейроны интегрируют сигналы от органов чувств и посредством гигантских аксонов передают импульсы на противоположную сторону к мотонейронам, иннервирующим плавательную мускулатуру. В случае одновременного возникновения импульса (одновременного сокращения мышц на обеих сторонах) никакого движения происходить не будет. Из-за того, что сигналы от органов чувств практически не бывают симметричными по времени и амплитуде, один нейрон активируется раньше другого. При этом для нормальной реализации реакции бегства очень важно осуществить взаимное тормозное влияние одной маутнеровской клетки на другую (*реципрокное торможение*).

На аксонах маутнеровских нейронов расположено спиральное сплетение тонких волокон, погруженных в так называемую аксонную чашечку. Последняя представляет собой сферическую структуру, состоящую из глиальных и нервных элементов, простирающуюся от аксонного холмика до начала миелиновой оболочки аксона. Активация тонких нервных

волокон вызывает действующий на аксонный холмик деполяризующий ток, приводящий к торможению маутнеровского нейрона. Генерация потенциала действия в ипсилатеральном нейроне приводит к возникновению внеклеточной позитивной волны тока (*внешний гиперполяризующий потенциал* (ВГП)) с максимальной амплитудой 10–15 мВ и длительностью 1 мс, наблюдаемой в том числе и у контрлатеральной маутнеровской клетки. В результате мембрана аксонного холмика гиперполяризуется.

Возникает ситуация, аналогичная действию внеклеточных электродов на мембрану нервного волокна. Под положительным электродом (анодом) ток частично входит через мембрану клетки внутрь, что сопровождается изменением мембранного потенциала: в результате накопления положительных зарядов, поступающих к наружной поверхности мембраны, увеличивается трансмембранная разность потенциалов, т. е. происходит гиперполяризация (рис. 52).

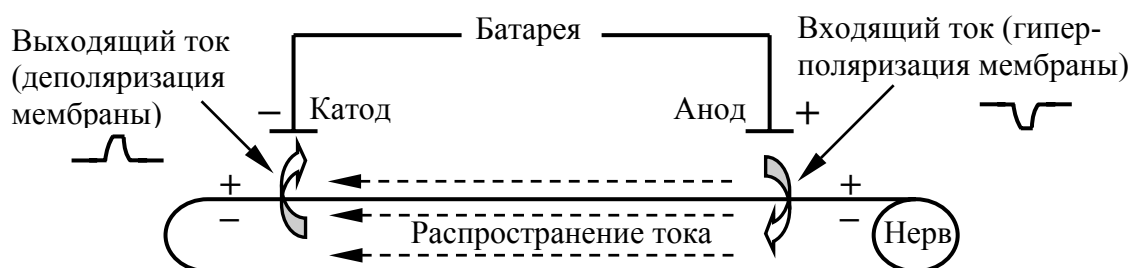


Рис. 52. Схема внеклеточной аппликации тока

Внешний гиперполяризующий потенциал имеет бóльшую величину для контрлатеральной, нежели ипсилатеральной клетки, и его развитие повышает порог генерирования потенциала действия нейроном. Непосредственно после гиперполяризации маутнеровской клетки под действием ВГП в ней развивается собственно ТПСП, обусловленный действием медиатора на рецепторы мембраны аксонного холмика, вызывающий увеличение проницаемости для ионов хлора. Начальное кратковременное электрическое тормозное действие, благодаря короткому латентному периоду, обеспечивает более раннее торможение, которое затем продлевается за счет «нормального» ТПСП. Таким образом, не происходит одновременного сокращения симметричных мышц хвоста рыб, что позволяет последним успешно избежать опасности.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

Кальциевая проницаемость, от которой зависит выделение медиатора в синаптическую щель, напрямую определяется уровнем мембранного потенциала. Даже небольшие изменения последнего способны кардинально повлиять на высвобождение медиатора, т. е. на эффективность синапса.

Так, устойчивая деполяризация инактивирует потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы и, следовательно, приток кальция в клетку. В то же время легкая гиперполяризация пресинаптического волокна способна снять их инактивацию, увеличив, в итоге, выделение медиатора.

Многочисленные влияния на эффективность синапсов подразделяют на два вида:

- 1) **гомосинаптические** (*внутренние процессы*): изменения определяются активностью того же синаптического пути;
- 2) **гетеросинаптические** (*внешние процессы*): изменения определяются активностью другого (соседнего) синаптического пути, воздействующего на данный синаптический путь.

В основе другой классификации лежит длительность вызываемых изменений синаптической передачи:

- 1) **кратковременные**: происходят в течение нескольких секунд, после чего активность синаптического пути возвращается в норму;
- 2) **долговременные**: могут длиться несколько часов и дней, предполагается, что именно они являются физиологическими коррелятами памяти.

Важнейшей особенностью аксо-аксональных синапсов, обеспечивающих протекание гетеросинаптических процессов, является возможность реализации *пресинаптического торможения*. Впервые оно было обнаружено Дж. Дуделем и С. Куффлером (J. Dudel, S. W. Kuffler, 1961) при изучении нервно-мышечного синапса омара (рис. 53).

Оно длится всего несколько сотен миллисекунд, достаточно эффективно снижая количество высвобождаемых квантов медиатора, и не влияет на проводимость постсинаптической мембраны. Пресинаптическое торможение осуществляется химическим путем. В качестве нейромедиатора используется ГАМК.

У беспозвоночных она обеспечивает увеличение проницаемости мембраны пресинаптического волокна для ионов хлора. В результате входящий поток Cl^- нейтрализует положительно заряженные ионы натрия, поступающие внутрь при развитии потенциала действия. Как следствие, наблюдается снижение уровня деполяризации, что радикально уменьшает количество поступающих внутрь клетки ионов кальция. В ЦНС млекопитающих пресинаптическое торможение реализуется посредством дру-

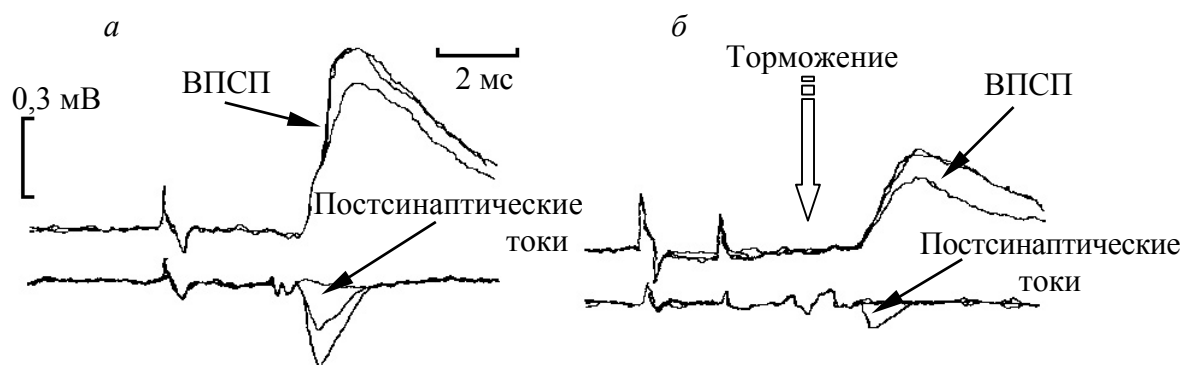


Рис. 53. Пресинаптическое торможение (по J. Dudel, 1965):
а – контрольные условия; б – при стимуляции тормозного аксона

ного механизма. ГАМК вызывает стойкую деполяризацию пресинаптического волокна, инактивируя потенциал-зависимые Na^+ -каналы. Это приводит к тому, что потенциал действия не может пройти через этот участок мембраны в пресинаптическую терминаль и вызвать поступление в нее ионов кальция (подробнее о работе ГАМК-ергических систем мозга см. гл. 10).

Пресинаптическое облегчение было обнаружено при изучении рефлекса втягивания жабры у *Aplysia* (V. Castellucci, E. Kandel, 1975). В этом случае стимуляция пресинаптического входа вызывает увеличение квантового выхода медиатора и не влияет на чувствительность к нему рецептора постсинаптической мембраны. При этом активация нервных волокон вызывает выделение серотонина, блокирующего калиевую проводимость через каналы S-типа. Это задерживает реполяризацию мембраны после прохождения потенциала действия, дольше оставляя ее в состоянии деполяризации, что вызывает дополнительный приток ионов кальция в пресинаптическое волокно и увеличивает количество высвобождаемого медиатора.

Кратковременные изменения характерны для всех отделов нервной системы позвоночных и беспозвоночных животных, но прежде всего для ее периферических элементов. В настоящее время выделяют следующие типы кратковременных изменений:

- **синаптическое облегчение** (*facilitation*): при стимуляции пресинаптического волокна коротким залпом импульсов происходит увеличение результирующих постсинаптических потенциалов с постоянной времени около 250 мс. В ее основе лежит увеличение квантового выхода (m) благодаря увеличению вероятности высвобождения отдельных квантов (p). Данный тип синаптического облегчения обусловлен «остаточным кальцием» (B. Katz, R. Miledi, 1968) – при высокой частоте стимуляции входящие в пресинаптическое волокно ионы кальция не могут быть быстро

убраны во внутриклеточные депо. В результате каждый последующий потенциал действия приводит к нарастанию внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Поскольку высвобождение медиатора пропорционально 4-й степени внутриклеточной концентрации кальция, даже незначительный ее прирост вызовет усиление квантового выхода;

- **синаптическая депрессия**: если количество квантов медиатора, выделяемых под влиянием пачки импульсов, велико, то ритмическая стимуляция приводит к снижению амплитуды ответов постсинаптического нейрона. По всей видимости, определяющим фактором при этом является истощение запаса везикул в пресинаптическом волокне.

Не исключено, что в нервно-мышечных препаратах лягушки синаптическая депрессия может быть обусловлена действием производных АТФ, выделяемого в качестве котрансммиттера вместе с ацетилхолином и реализующего свое тормозное действие за счет активации соответствующих пресинаптических рецепторов (R. S. Redman, E. M. Silinsky, 1994);

- **синаптическое усиление** (*augmentation*): отличается от синаптического облегчения тем, что эффект ритмической стимуляции развивается и спадает гораздо медленней, с постоянной времени порядка 5–10 с (K. L. Magleby, J. E. Zengel, 1976). В основе явления также лежит увеличение квантового выхода медиатора, возможно, обусловленного участием вторичного внутриклеточного посредника;

- **посттетаническая потенция** (ПТП): принципиально не отличается от синаптического облегчения. Она вызывается относительно длинными сериями потенциалов действия. ПТП начинается несколько позже и, достигнув максимума через несколько секунд после окончания стимуляции, сохраняется в течение нескольких десятков минут, вплоть до нескольких часов. По всей видимости, она также обусловлена «остаточным кальцием». При этом важную роль играет повышение внутриклеточной концентрации Na^+ вследствие высокой частоты генерации потенциала действия на этом участке клетки. В результате эффективность $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменника снижается, что способствует поддержанию внутриклеточной концентрации ионов кальция на повышенном уровне.

Долговременные изменения обусловлены ритмической активностью преимущественно центральных нейронов. В настоящее время выделяют следующие типы долговременных изменений:

- **долговременная потенция** (ДВП) (*long-term potentiation, LTP*): впервые была описана применительно к нейронам гиппокампа Т. Блиссом и Т. Ломо (T. V. P. Bliss, T. Lomo, 1973). В результате высокочастотной стимуляции наблюдалось значительное увеличение синаптических ответов, которое длилось часы и даже дни. В случаях, если ДВП обу-

словлена стимуляцией одного входа, говорят о *гомосинаптической* ДВП, если двух входов – *ассоциативной* ДВП.

В механизме развития ДВП существенную роль играют пресинаптическая, т. е. увеличение квантового выхода, и постсинаптическая, т. е. увеличение ответа на каждый квант, составляющие. При этом главная роль отводится возрастанию концентрации ионов кальция в постсинаптическом нейроне, поступающих в клетку вследствие активации глутаматергических NMDA-рецепторов (о них см. гл. 10). Выступая в роли вторичного посредника, Ca^{2+} активирует целый ряд биохимических путей внутри клетки, вызывая в итоге появление новых рецепторов к глутамату (AMPA-рецепторы) на постсинаптической мембране, что приводит к выраженному усилению эффекта пресинаптической стимуляции. Пресинаптическая компонента, вызывающая увеличение квантового выхода, предполагает наличие *ретроградного* передатчика, на роль которого традиционно претендует монооксид азота (NO);

• **долговременная депрессия (ДВД)** (*long-term depression, LTD*): представляет собой длительное угнетение синаптической передачи, вызванной предшествующей низкочастотной ритмической активностью этого же входа (*гомосинаптическая* ДВД). В случае *гетеросинаптической* ДВД снижение синаптической эффективности обусловлено предшествующей тетанической активностью в другом, рядом расположенном, афферентном входе к этой же клетке, а при *ассоциативной* ДВД – при совпадающей по времени низко- и высокочастотной стимуляции двух соседних входов (угнетение низкочастотного входа).

В настоящее время развитие ДВД связывают с возрастанием уровня кальция в постсинаптическом нейроне, обусловленного его поступлением в результате активации NMDA-рецепторов, а в случае их отсутствия – через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. При этом возрастание внутриклеточной концентрации кальция не столь выражено, как при развитии ДВП. В конечном итоге это приводит к снижению количества AMPA-рецепторов на постсинаптической мембране. Не исключена и пресинаптическая компонента, опосредующая ДВД.

Остается неясным, почему в обоих случаях (ДВП и ДВД) наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации кальция (хоть и в неодинаковой степени), приводящее к столь различным эффектам. Не исключено, что в реализацию указанных эффектов вовлечены различные системы вторичных посредников, характеризующиеся различной Ca^{2+} -зависимостью.

Электрические синапсы (щелевые контакты) также чувствительны к регулирующим влияниям (рис. 54).

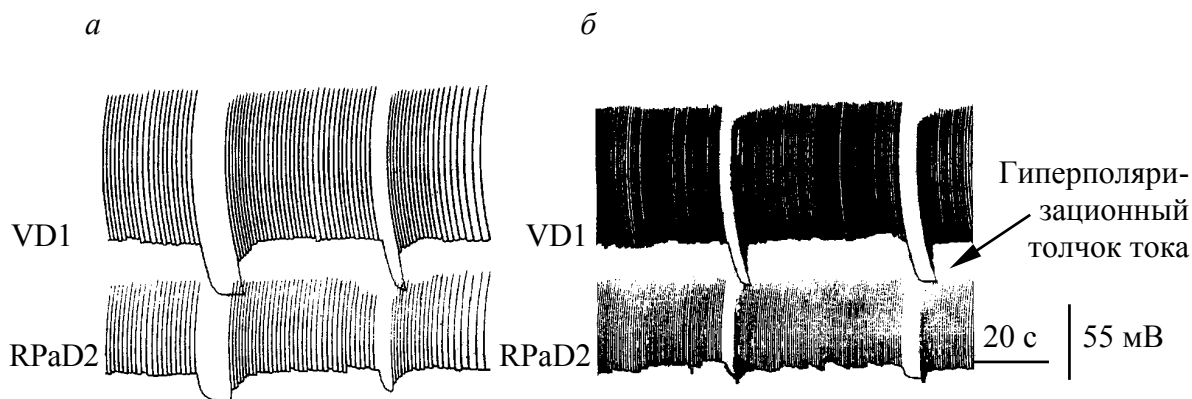


Рис. 54. Влияние температуры на электротоническую передачу между нейронами VD1 и RPaD2 в нервной системе *Lytnaeta stagnalis* (по А. V. Sidorov, 2001): Гиперполяризационные толчки тока в VD1, распространяясь электротонически, вызывают гиперполяризацию в постсинаптическом нейроне RPaD2, степень которой изменяется в зависимости от температуры (*a* – 15 °C; *б* – 25 °C)

Так, их активность изменяется под действием медиаторов, внутриклеточных регуляторов (цАМФ и цГМФ), при снижении вне- и внутриклеточного рН, действии высоких и низких температур и т. п. Таким образом, электротонические синапсы наравне с химическими синапсами участвуют в функциональных перестройках нейронных сетей организма.

ГЛАВА 7 СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ

ПРИНЦИПЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Клетки в составе многоклеточного организма подвержены действию многочисленных сигналов, поступающих извне. В качестве последних выступают различные химические вещества – *сигнальные молекулы*. Таким образом, для обеспечения специфичности выполняемых функций клетки должны *избирательно* реагировать на те или иные внешние воздействия. Это зависит прежде всего от того, обладает или нет клетка специальными структурами, способными взаимодействовать с теми или иными молекулами, т. е. *рецепторами*. В отсутствие рецептора клетка остается безучастной к внешнему сигналу.

|| П. Эрлих (P. Ehrlich) сформулировал эту особенность следующим образом: «*corpora non agunt nisi fixata*» (вещество не действует не будучи связанным).

Большинство рецепторов представлено белками, поскольку именно благодаря различным способам укладки полипептидной цепи может быть обеспечено необходимое разнообразие и специфичность формы, определенный электрический заряд на поверхности. В качестве рецепторов могут выступать регуляторные, транспортные, структурные белки, а также ферменты (см. ниже).

Основа рецепторной теории была заложена пионерскими работами П. Эрлиха (1854–1915) и Дж. Ленгли (J. N. Langley) (1852–1925). Разрабатывая основы химиотерапии (1900), П. Эрлих обратил внимание на то, что синтетические органические вещества, несмотря на структурное сходство, обладают разной антипаразитарной эффективностью. Работы Дж. Ленгли (1905) показали, что мышечное сокращение, вызываемое прямой электрической стимуляцией мышцы, сохраняется при действии кураре, в норме способного блокировать сокращение, опосредованное действием никотина (агонист ацетилхолина). Справедливости ради заметим, что идея о существовании на поверхности клеток специфических структур, ответственных за действие веществ, просматривается и в более ранних работах П. Эрлиха и Дж. Ленгли.

Следовательно, обладая лимитированным числом рецепторов, клетка ограничивает количество молекул, способных изменить ее активность. Тем не менее даже немногочисленные сигналы могут обеспечить составной характер ответной реакции, которая проявляется следующим образом:

- **одно и то же вещество**, связываясь с одним и тем же типом рецептора, вызывает **различные эффекты** в клетке-мишени: изменение формы, метаболизма, уровня экспрессии генов и т. п.;

- как правило, **внешний сигнал передается внутрь через систему вторичных посредников**, различающихся от клетки к клетке. Кроме того, различны и конечные внутриклеточные мишени действия сигнальных молекул. В результате одно и то же вещество вызывает неодинаковый физиологический эффект.

Так, ацетилхолин вызывает уменьшение частоты сердечных сокращений, но усиливает продукцию секрета слюнными железами;

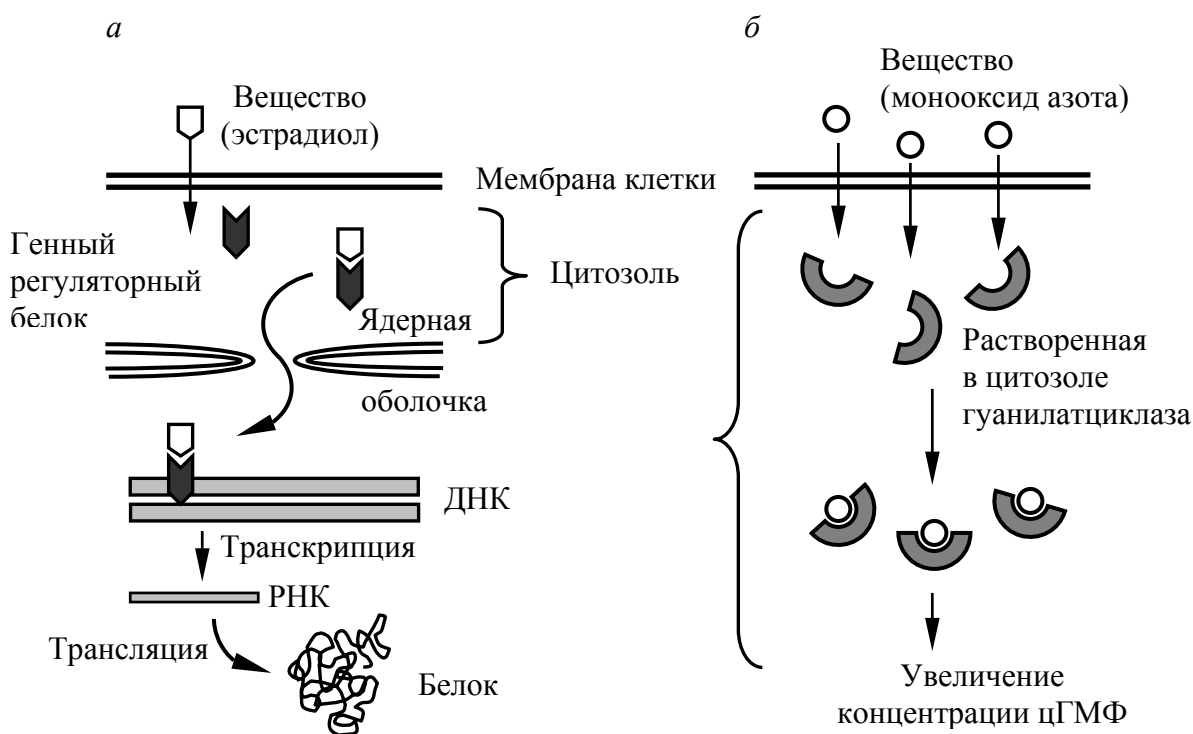
- поскольку клетка располагает **разными рецепторами**, она способна **одновременно** реагировать на **многие сигналы**. При этом даже относительно небольшое количество сигнальных молекул создает возможность разнообразных комбинаций, контролирующих поведение клетки, например взаимное ослабление или усиление ее активности.

Существование различных типов рецепторов также способствует разнообразию реакций клеток. Хорошо известна способность ацетилхолина вызывать сокращение скелетной мускулатуры (*н*-холинорецепторы) в противоположность уже упомянутому урежению сердечных сокращений (*м*-холинорецепторы).

ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Важнейшим этапом, контролирующим функцию клеток, является момент превращения внеклеточных сигналов во внутриклеточные. Существует две группы механизмов, обеспечивающих трансмембранную передачу сигнала. Они различаются по способности связываться с рецепторами наружной мембраны клетки: ряд сигнальных молекул связывается с ними, другие – нет.

Передача сигнала, не требующая наличия рецепторов на поверхности клетки. Относительно небольшое количество сигнальных молекул представлено веществами с низкой молекулярной массой или высокой степенью гидрофобности. В результате они достаточно легко преодолевают плазматическую мембрану за счет диффузии (рис. 55). Их классификация основана на особенностях взаимодействия с внутриклеточными компонентами. Выделяют две основные группы сигнальных молекул:



*Рис. 55. Передача сигнала, не требующая наличия
рецепторов на поверхности клетки:*

*а – при наличии внутриклеточного рецептора (стероидные гормоны);
б – прямое изменение ферментативной активности (монооксид азота)*

1. Сигнальные молекулы, взаимодействующие с внутриклеточными рецепторами. Наиболее известными представителями являются *стероидные* (кортизол, эстрадиол, тестостерон) и *тиреоидные* (тироксин) гормоны.

Пройдя через плазматическую мембрану, они связываются с белками, находящимися в цитозоле или ядре. Указанные рецепторные молекулы представляют собой генные регуляторные белки (*gene regulatory proteins*), изначально находящиеся в клетке в неактивном состоянии.

Под действием гормонов они претерпевают большие конформационные изменения, что приводит к их связыванию с регуляторными участками цепочки ДНК. Как следствие, инициируется или прекращается транскрипция определенных генов (см. рис. 55, а).

Характерными особенностями данной группы веществ являются:

- *большой латентный период действия*: видимый эффект развивается спустя некоторое время (от 30 минут до нескольких часов), затрачиваемое на синтез новых белков;
- *продолжительное действие*: развившийся эффект может сохраняться в течение нескольких часов (дней), даже после того, как концентрация действующего вещества во внеклеточной жидкости снижается до нуля.

2. Сигнальные молекулы, напрямую изменяющие ферментативную активность белка. Самым известным представителем является монооксид азота (NO), относящийся к группе *газообразных медиаторов* (см. гл. 12).

За счет своих малых размеров NO быстро пересекает мембрану и, попадая в цитозоль, взаимодействует с гуанилатциклазой, катализирующей образование цГМФ, важнейшего внутриклеточного посредника (см. рис. 55, б). В отличие от гормонов, эффект развивается в течение нескольких секунд и сохраняется не столь продолжительное время.

Передача сигнала, требующая наличия рецепторов на поверхности клетки. Большинство сигнальных молекул относится к гидрофильным высокомолекулярным веществам, неспособным пересекать цитоплазматическую мембрану ни путем диффузии, ни за счет каких-либо других систем транспорта. В этом случае рецепторы пронизывают мембрану, что дает им возможность распознать сигнал на ее наружной поверхности со стороны внеклеточного пространства и обеспечить его передачу внутрь клетки. При этом сигнальная молекула *не переносится* через мембрану.

Различают три больших семейства таких рецепторов:

1. Рецепторы, ассоциированные с ионными каналами (*ионотропные рецепторы*) – представляют собой трансмембранные канальные белки, открытие-закрытие которых контролируется присоединением соответствующего вещества (лиганд-управляемые ионные каналы). При этом передача сигнала происходит посредством изменения ионной проводимости мембраны. К естественным лигандам относятся многие нейромедиаторы: ацетилхолин, ГАМК, глицин и т. п. Подробное описание их строения приводится ниже (гл. 9–10).

2. Рецепторы, ассоциированные с мембран-связанными G-белками (*метаботропные рецепторы*) – взаимодействие с ними сигнальных молекул (таких как серотонин, ацетилхолин, пептиды и т. п.) приводит к запуску целого каскада биохимических превращений, вызывающих ответную реакцию клетки (подробнее см. ниже).

3. Рецепторы, ассоциированные с ферментами – связывание с сигнальной молекулой приводит к изменению каталитической активности фермента со стороны цитозоля.

Данная группа рецепторов играет важную роль в формировании клеточного ответа на действие различных факторов роста (эпидермального, тромбоцитарного), инсулина и т. п. Большинство трофических факторов выступает в качестве тканевых регуляторов, действуя в очень низких (10^{-9} – 10^{-11} М) концентрациях. При этом клеточный ответ развивается в течение нескольких часов, поскольку связан с изменением экспрессии генов. В то же время белки внеклеточного матрикса или белки, прикрепленные к поверхности клеток, способны активировать эту группу рецепторов. В данном случае происходят быстрые перестройки цитоскелета, приводящие к изменению формы клетки.

Цитоплазматический домен рецепторного фермента обладает выраженной тирозин-киназной активностью, т. е. он катализирует реакцию присоединения высокоэнергетического фосфата (фосфорилирование) к тирозиновым участкам внутриклеточных белков, поэтому сам рецептор называют *тирозин-киназным*.

Для него характерно наличие только одного трансмембранного сегмента, представляющего собой обыкновенную α -спираль. Такая молекулярная организация не дает возможности реализовать конформационные изменения при связывании рецептора с лигандом. Поэтому активация тирозин-киназного рецептора осуществляется посредством другого, оригинального механизма (рис. 56).

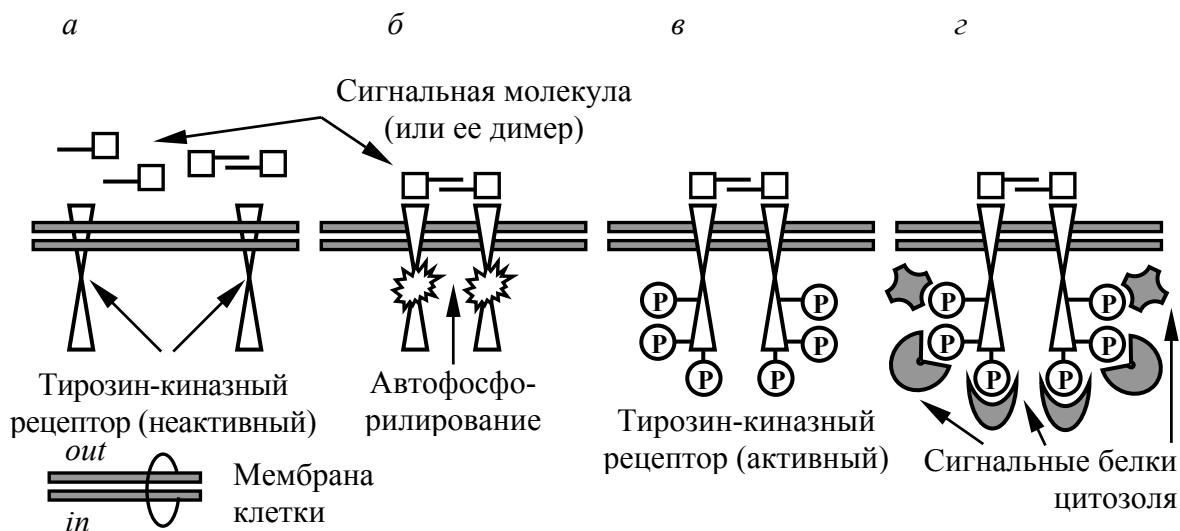


Рис. 56. Активация тирозин-киназного рецептора:
а–г – последовательные стадии процесса

Сигнальная молекула (димер сигнальных молекул) связывается с двумя рядом расположенными рецепторами, приводя к еще большему сближению их друг с другом. Контакт между ними стимулирует протеин-киназную активность, приводя к взаимному фосфорилированию рецепторов (*автофосфорилирование*). Фосфорилированные по остаткам тирозина многочисленные участки рецепторного комплекса взаимодействуют с различными молекулами (от 10 до 20), переводя последние в активное состояние. В результате сигнал распространяется в клетке по многочисленным направлениям, приводя к активации и координации множества биохимических превращений, что лежит в основе таких комплексных ответов клетки, как дифференцировка и пролиферация.

Существует два пути инактивации тирозин-киназных рецепторов:

- *посредством белковых тирозин-фосфатаз*, отщепляющих фосфатные группы от цитозольных доменов рецептора;
- *посредством эндоцитоза*: при этом рецептор попросту переваривается протеолитическими ферментами лизосом.

Многие внутриклеточные посредники, активируемые тирозин-киназными рецепторами, широко представлены в разных клетках. В частности, фосфолипазы, которые активируют инозитол-фосфатную систему (см. ниже). Другим важным направлением распространения сигнала является регуляция экспрессии генов.

Ряд молекул, активируемых связыванием с фосфорилированными протеинкиназными рецепторами, относится к сопрягающим белкам (*adaptor proteins*). В результате их взаимодействия с соответствующими молекулами происходит активация последних, что приводит к связыванию расположенных на внутренней стороне плазматической мембраны небольших, состоящих из одной субъединицы, белков (Ras-белки) с ГТФ. При этом активированный Ras-белок запускает каскадное фосфорилирование протеинкиназ, последняя из которых, в свою очередь, фосфорилирует белок, регулирующий экспрессию генов (рис. 57).

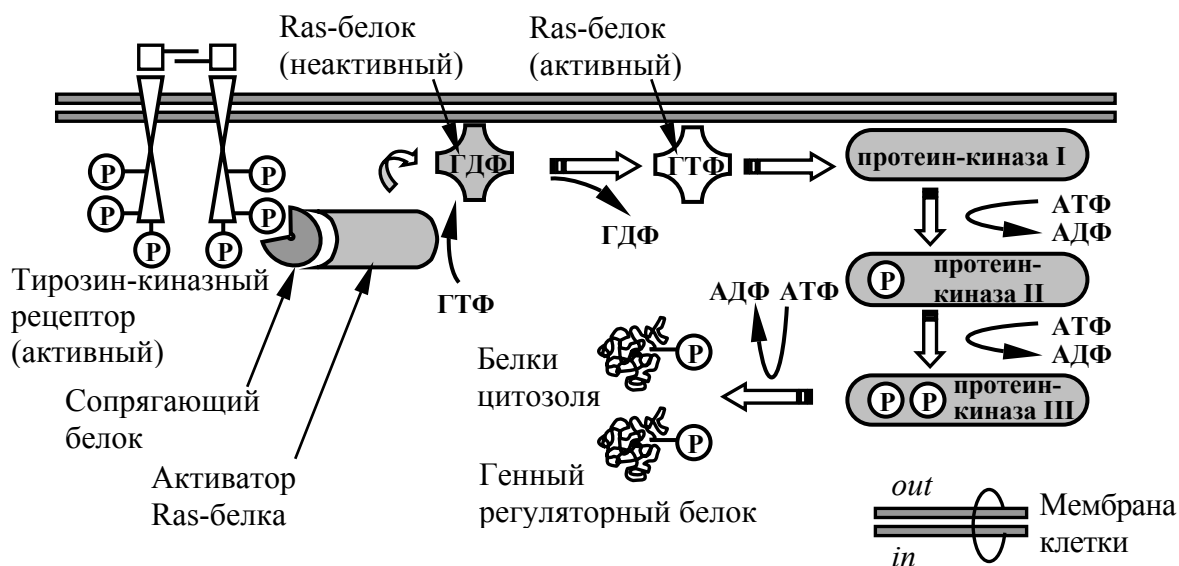


Рис. 57. Активация системы Ras-белков

Ras-белки представляют собой ключевое звено клеточного ответа на действие тромбоцитарного фактора роста (*platelet-derived growth factor, PDGF*), обеспечивающего пролиферацию клеток при заживлении ран, и фактора роста нервов (*nerve growth factor, NGF*), предотвращающего, в частности, гибель некоторых нейронов в ходе развития. Гиперактивность Ras-белков может привести к неконтролируемой клеточной пролиферации, что лежит в основе развития онкологических заболеваний. В частности, в 30 % случаев рака у человека отмечаются мутации Ras-генов.

РЕЦЕПТОРЫ, СВЯЗАННЫЕ С G-БЕЛКАМИ

В начале XXI в. насчитывалось свыше 2000 рецепторов, связанных с G-белками, разделенных на более 100 подсемейств в соответствии с гомологией их аминокислотных последовательностей, структурой лигандов и функциями.

Своим названием G-белки обязаны возможностью образовывать связи с гуаниновыми (G) нуклеотидами, т. е. ГТФ (GTP).

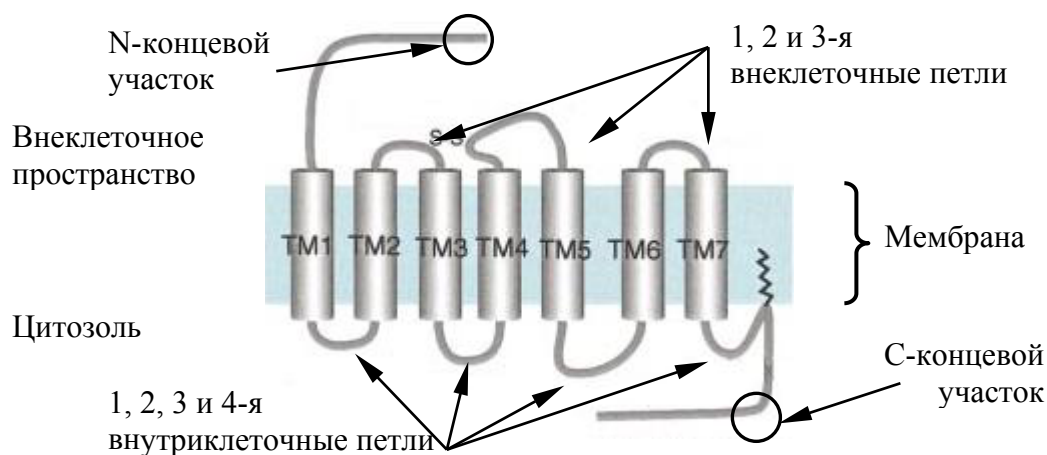


Рис. 58. Общая схема строения рецептора к G-белку
(по Т. Н. Ji et al., 1998)

Структура рецептора характеризуется внеклеточным N-концевым участком, семью трансмембранными сегментами, формирующими основу рецептора, тремя петлями, направленными во внеклеточное пространство, и тремя (четырьмя) – в сторону цитозоля, а также внутриклеточным C-концевым участком (рис. 58).

Третья внутриклеточная петля предназначена для связывания с G-белком. Каждый из трансмембранных сегментов состоит из 20–27 аминокислот. Напротив, выраженные колебания количества аминокислотных остатков N-(7-595) и C-(12-359)-концевых участков, петель (5-230) свидетельствуют о разнообразии выполняемых функций (рис. 59).

В качестве активатора рецепторов, связанных с G-белками, могут выступать нейромедиаторы (ГАМК, норадреналин, дофамин и т. п.), свет (родопсин), одоранты. Указанная группа рецепторов эволюционно очень древняя, они обнаружены даже у дрожжей.

Связывание сигнальной молекулы внеклеточного пространства с рецептором приводит к его конформационным изменениям, что делает возможным взаимодействие между обращенным в сторону цитозоля участком и G-белком, расположенным на внутренней стороне цитоплазматической мембраны.

Все G-белки состоят из трех субъединиц: α , δ , γ . Большое количество подтипов каждой из субъединиц (20 α , 6 β , 12 γ) создает основу для различных комбинаций, обеспечивающих разнообразие выполняемых функций.

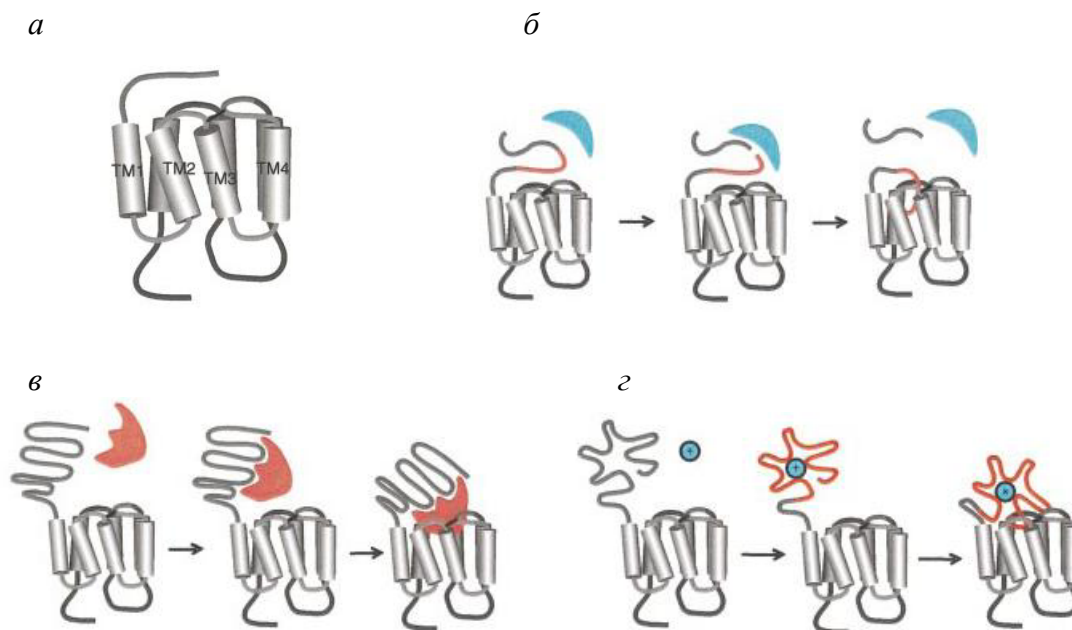


Рис. 59. Топология рецептора к G-белку (а) и участки его связывания с протеазами (б), гликопротеинами (в) и нейромедиаторами (г) (по Т. Н. Ji et al., 1998)

В неактивном состоянии α -субъединица G-белка связана с ГДФ, а все три субъединицы составляют единый комплекс. Взаимодействие с рецептором приводит к замещению ГДФ на ГТФ, что вызывает диссоциацию G-белка на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы (рис. 60).

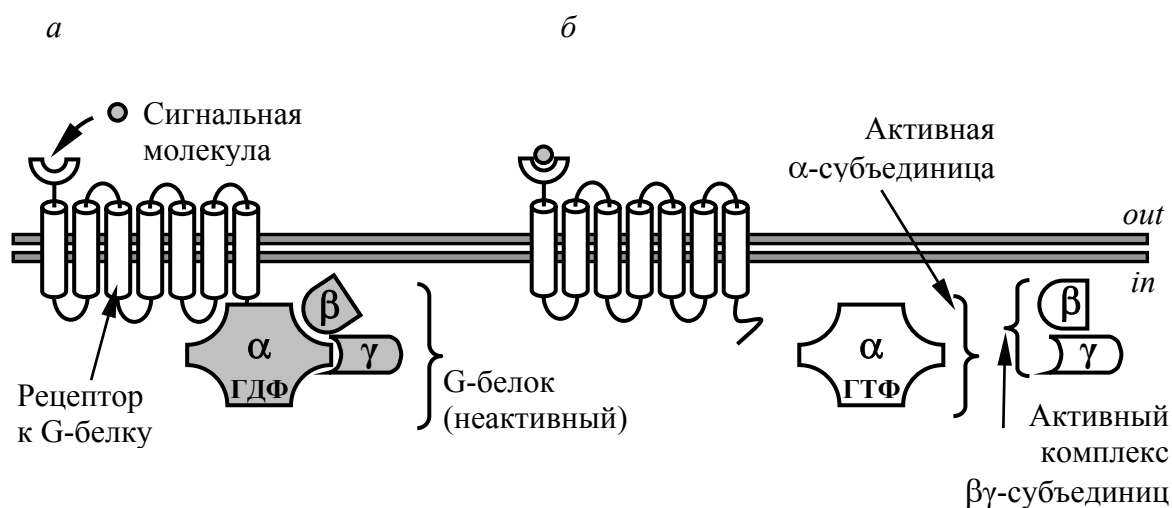


Рис. 60. Активация G-белка:
а, б – последовательные стадии процесса

Эти две составляющие способны диффундировать вдоль внутренней поверхности мембраны и напрямую взаимодействовать с белками-мишенями, локализованными в плазмалемме. Продолжительность их действия определяется поведением α -субъединицы, обладающей ГТФазной активностью, – гидролиз связанного с ней ГТФ до ГДФ приводит к обратному связыванию α -субъединицы и комплекса $\beta\gamma$ -субъединиц в единое целое (рис. 61). Это происходит спустя несколько секунд после исходной активации G-белка.

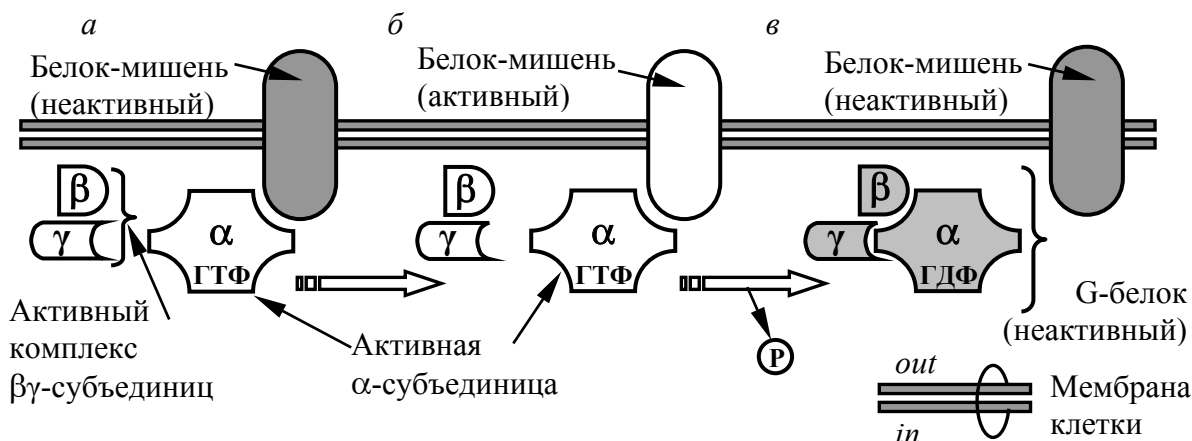


Рис. 61. Инактивация G-белка:
а–в – последовательные стадии процесса

Таким образом, существуют два действующих начала, ассоциированных с G-белком: α - и $\beta\gamma$ -субъединицы.

Активация посредством комплекса $\beta\gamma$ -субъединиц. Впервые изучена при исследовании молекулярных основ действия ацетилхолина на сердце (рис. 62).

Связывание ацетилхолина с рецептором (*m*-холинорецептором) приводит к последующей диссоциации G-белка. Комплекс $\beta\gamma$ -субъединиц взаимодействует с цитозольным доменом K^+ -канала, увеличивая вероятность нахождения его в открытом состоянии. Как следствие, клетка гиперполяризуется, увеличивается порог генерации потенциала действия и частота сердечных сокращений уменьшается. Инактивация α -субъединицы и последующая ее ассоциация с комплексом $\beta\gamma$ -субъединиц переводит калиевый канал в закрытое состояние.

Схожая ситуация наблюдается и при активации норадренергических ауторецепторов симпатических ганглиев лягушки. В этом случае комплекс $\beta\gamma$ -субъединиц блокирует Ca^{2+} -каналы N-типа в пресинаптических терминалях, что уменьшает выброс медиатора в синаптическую щель (*отрицательная обратная связь*) и служит надежным механизмом регуляции эффективности синапса.

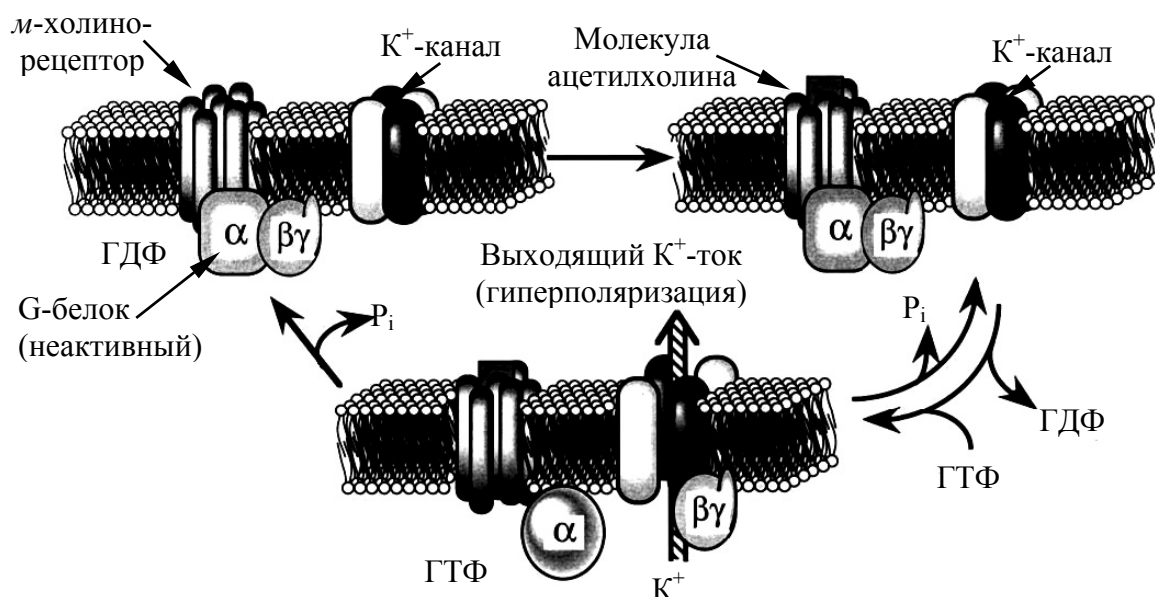


Рис. 62. Активация K^+ -каналов миокарда при действии ацетилхолина (по M. Yamada et al., 1998)

Активация посредством α -субъединицы. В этом случае наблюдается взаимодействие с белками, связанными с мембраной. Наиболее известными мишенями для α -субъединицы являются аденилатциклаза и фосфолипаза C. Эти ферменты катализируют реакции образования небольших сигнальных молекул – *вторичных посредников*, называемых так в противоположность сигналам, поступающим к клетке извне. Действие α -субъединицы может как стимулировать, так и ингибировать ферментативную активность.

G-белки функционально разделяют на четыре большие группы: G_s – стимулируют, а G_i – ингибируют аденилатциклазу (G_{s0} -изоформа связывается (ингибируя) с потенциал-зависимыми Ca^{2+} - и K^+ -каналами, а G_{st} активирует фосфодиэстеразу цГМФ); G_q – связывается с фосфолипазой C, а для G_{12} и G_{13} – мишени неизвестны (2000). Разные G-белки способны взаимодействовать с несколькими мишенями, равно как и модулировать активность одних и тех же ионных каналов.

СИСТЕМЫ ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

Аденилатциклаза располагается на внутренней стороне плазмалеммы и катализирует образование цАМФ из АТФ, которая всегда встречается в достаточном количестве внутри клетки. Под действием α -субъединицы G-белка концентрация цАМФ в цитозоле стремительно возрастает.

Бесконтрольному возрастанию концентрации цАМФ препятствует действие биологического антагониста – *цАМФ фосфодиэстеразы*, катализирующей переход цАМФ в АМФ. Циклический АМФ является водорастворимой молекулой и поэтому способен свободно диффундировать в цитозоле клетки на значительные расстояния от мембраны. Его основной мишенью является *цАМФ-зависимая протеинкиназа* (А-киназа).

Присоединение четырех молекул цАМФ вызывает диссоциацию неактивного комплекса А-киназы (две субъединицы) с регуляторным белком (две субъединицы). В результате высвобождаются две каталитические субъединицы, обладающие протеинкиназной активностью. А-киназа катализирует присоединение фосфатной группы к белкам по остаткам серина и треонина, вызывая изменения активности белков-мишеней.

Фосфорилированию могут подвергаться и белки, образующие ионные каналы, в частности Ca^{2+} -каналы L-типа.

Результаты стимуляции (ингибирования) аденилатциклазы могут проявляться как в течение короткого промежутка времени (от нескольких секунд до минуты), так и по прошествии многих часов. В последнем случае эффект обусловлен активацией белков, регулирующих экспрессию генов.

Несколько десятков рецепторов, связанных с G-белками, реализуют свое действие посредством стимуляции **фосфолипазы C** (рис. 63).

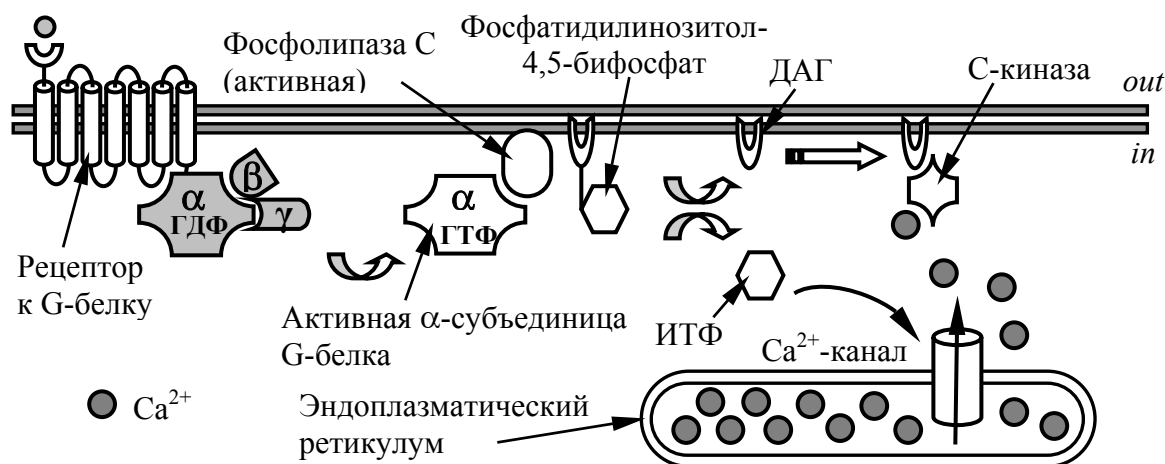


Рис. 63. Фосфолипазная система вторичных посредников

Она в свою очередь расщепляет находящийся во внутреннем липидном слое плазматической мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на диацилглицерол (ДАГ, DAG), который остается связанным с мембраной, и инозитол 1,4,5-трифосфат (ИТФ, IP_3) – диффундирует в цитоплазму. ИТФ вызывает открытие Ca^{2+} -каналов эндоплазматического ретикулума, что приводит к высвобождению кальция из названного внутриклеточного

точного депо. ДАГ, диффундируя в мембране, активирует *протеинкиназу С* (С-киназу). При этом ее полная активация возможна только в присутствии ионов Ca^{2+} , которые поступают из эндоплазматического ретикула под действием ИТФ. С-киназа фосфорилирует многие внутриклеточные белки, действуя схожим образом с А-киназой.

Возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} наблюдается не только при стимуляции фосфолипазы С. **Свободный кальций** является важнейшим регулятором биохимических превращений внутри клетки. Эффекты Ca^{2+} по отношению к большинству регуляторных макромолекул реализуются при посредстве *Ca^{2+} -связывающих белков*. Самым широко распространенным и наиболее известным является *кальмодулин*. Он представляет собой молекулу гантелевидной формы, два глобулярных конца которой соединены при помощи подвижной α -спирали (рис. 64).

Каждый концевой участок имеет по два Ca^{2+} -связывающих домена. Присоединение четырех ионов кальция изменяет конформационную стабильность кальмодулина, в результате он может связываться с большим количеством белков-мишеней, активируя или ингибируя их. Наиболее важным представляется его действие на *СаМ-киназы*. Предполагается, что именно они ответственны за долговременные изменения эффективности синаптической передачи.

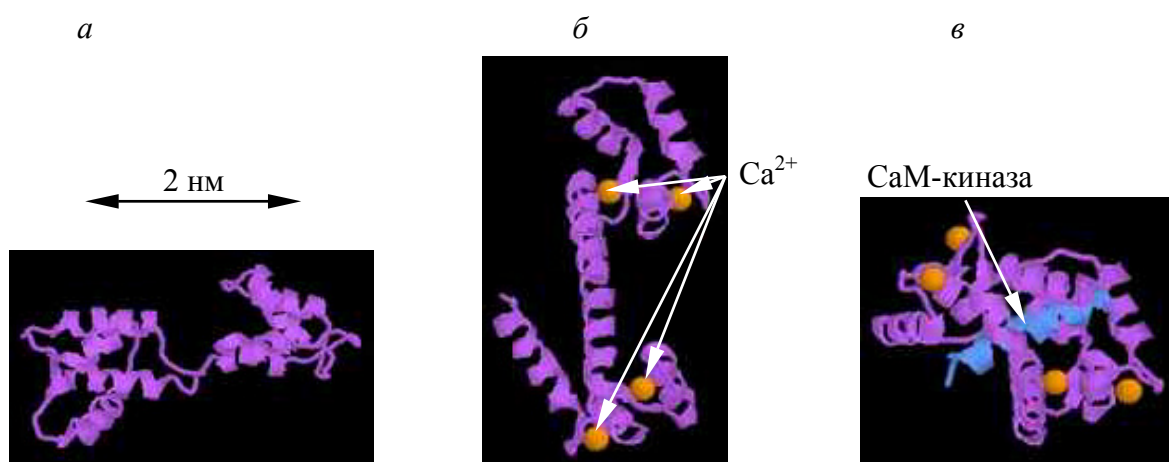


Рис. 64. Структура кальмодулина по данным рентгеноструктурного анализа (по М. Ikura et al., 1992):
 а – в свободном состоянии; б – связывание с Ca^{2+} ;
 в – связывание с СаМ-киназой

G-белки способны активировать фосфолипазу A_2 , что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты. Последняя может модулировать нейронную активность за счет прямого (через С-киназу) или опосредованного (через свои метаболиты – лейкотриены и простагландины) действия на ионные каналы.

Использование внутриклеточных вторичных посредников обладает рядом существенных преимуществ при передаче сигнала. Во-первых, благодаря им сигнал может переноситься от места своего возникновения в те участки клетки, где располагаются структуры, ответственные за формирование ответа. Во-вторых, происходит *усиление* сигнала – так, всего несколько сигнальных молекул во внеклеточном пространстве способны вызвать образование множества вторичных посредников, что также позволяет *распределить* сигнал внутри клетки. В результате наблюдается активация многих параллельных путей биохимических превращений. В-третьих, каждый этап сигнального каскада подвержен регуляторным влияниям, что создает огромные возможности для *модуляции* сигнала в соответствии с условиями, создающимися в определенный момент времени вне и внутри клетки.

Предполагается, что 2 % генома ответственно за синтез протеин-киназ. При этом в «типичной клетке» млекопитающего присутствует не менее 1000 разных протеинкиназ. В результате формируются многочисленные протеинкиназные сети, работа которых и определяет ответ клетки на внешнее воздействие.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ

Рецепторы представляют собой макромолекулярные белковые комплексы, обеспечивающие узнавание сигнальных молекул клеткой. Существует ряд положений, характеризующих роль рецепторов в межклеточной сигнализации:

1. Рецепторы определяют количественные связи между концентрацией действующего вещества и биологическим эффектом – общее количество рецепторов ограничивает максимальный эффект, вызываемый сигнальными молекулами. При этом *аффинитет* (прочность связывания) рецептора к лиганду определяет концентрацию вещества, способную вызвать биологический эффект, т. е. образовать достаточное количество связей «вещество – рецептор».

Физиологический эффект на малые дозы вещества возрастает прямо пропорционально его концентрации. По мере ее увеличения прирост ответной реакции снижается и, в конечном итоге, дальнейший рост концентрации действующего вещества не приводит к усилению ответа клетки. Связь между количеством вещества, соединенного с рецептором, т. е.

биологическим эффектом (E), и концентрацией свободного вещества (C) описывается гиперболой (рис. 65) в соответствии с уравнением:

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{C + K_D},$$

где E_{\max} – максимальный эффект, вызываемый действием вещества (общее количество участков связывания на рецепторной молекуле); K_D – равновесная константа диссоциации, т. е. концентрация вещества, при которой наблюдаемый эффект (степень связывания) составляет 50 % от максимально возможного (EC_{50}).

K_D обратна аффинитету – чем она выше, тем меньше степень связывания вещества с рецептором, и наоборот.

Как правило, при графическом представлении данных о связи «доза – эффект» по оси концентраций откладывается логарифм дозы. В результате гипербола преобразуется в сигмовидную кривую, что «удлиняет» шкалу при низких концентрациях вещества, когда эффект развивается быстро, и «укорачивает» ее при высоких концентрациях, характеризующихся медленным изменением ответной реакции клетки.

Чувствительность клетки к определенной концентрации действующего вещества зависит не только от его сродства к рецептору, но и от количества последних. В случае наличия «избыточных» рецепторов максимальный эффект может наблюдаться и при более низкой концентрации действующего вещества.

|| Так, максимальный ответ сердечной мышцы при стимуляции β -адренорецепторов достигается даже в условиях фармакологической блокады 90 % от их общего числа.

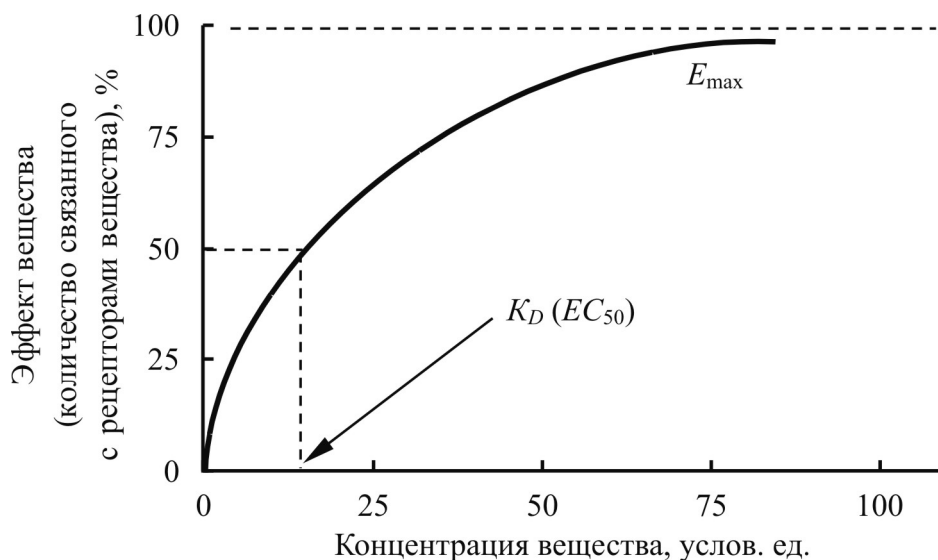


Рис. 65. Кривая «доза – эффект»

При избыточности рецепторов лиганды с низким сродством к рецептору способны вызвать максимальный ответ даже при низкой концентрации ($EC_{50} < K_D$). Это особенно важно по той причине, что при высоких K_D вещество быстро диссоциирует и его биологический эффект отменяется. Напротив, низкая K_D , свидетельствующая о высоком аффинитете, говорит о медленной диссоциации вещества и пролонгировании его эффекта.

2. На уровне рецепторов реализуется действие агонистов и антагонистов – химических веществ, способных в той или иной степени взаимодействовать с рецепторами.

Агонисты – это эндогенные (физиологические агонисты) или экзогенные (фармакологические агонисты) химические вещества с сигнальными свойствами, регулирующие функции рецептора при связывании с ним. В зависимости от способности вызывать максимальный эффект при связывании со всеми доступными рецепторами они подразделяются на две группы:

- **полные** агонисты: при оккупации ими *всех* рецепторов достигается максимальный эффект;

- **неполные** (парциальные) агонисты: вызывают меньшую ответную реакцию клетки при связывании *всех* рецепторов. Их неспособность вызывать «полный» максимальный эффект не связана с низким аффинитетом, т. е. они способны взаимодействовать со всеми доступными рецепторами. По всей видимости, парциальные агонисты хоть и вызывают некоторые изменения конформации рецептора, но их оказывается недостаточно для полной его активации.

Антагонисты – химические вещества экзогенного происхождения, которые, взаимодействуя с рецептором и не изменяя его функций, предупреждают связывание с ним агониста. В результате наблюдается блокада биологического эффекта. В зависимости от того, обратимо или необратимо они конкурируют с агонистом за связывание с рецептором, антагонисты подразделяются следующим образом:

- **конкурентные** антагонисты: увеличение их концентрации постепенно приводит к полному подавлению реакции на действие агонистов. Справедливо и обратное – увеличивая концентрацию агониста, можно подавить ответ клетки на действие конкурентного антагониста;

- **необратимые** антагонисты: сродство данных веществ к рецептору может быть столь выраженным, что последний становится вовсе недоступным для действия агониста. Необратимость эффекта может быть вызвана ковалентным связыванием сигнальной молекулы и рецептора. В результате число оставшихся свободных рецепторов может быть настолько

мало, что даже высокие концентрации агониста не в состоянии вызвать максимально возможный эффект. В случае избыточности рецепторов эффективность применения необратимых антагонистов может существенно снижаться.

Понятие «антагонизм» не ограничивается только взаимодействием вещества и рецептора. При *химическом антагонизме* одно вещество препятствует действию другого за счет простой инактивации, являющейся следствием их взаимодействия. Для его проявления взаимодействующие вещества вовсе не нуждаются в рецепторах. *Физиологический антагонизм* основан на способности различных веществ одновременно активировать механизмы, приводящие к противоположным биологическим эффектам.

3. Рецепторы ответственны за **избирательность действия** веществ – размер, форма, распределение электрических зарядов на поверхности сигнальной молекулы определяют возможность ее связывания с рецептором. При этом *авидность* представляет собой меру способности, с которой вещество взаимодействует с рецептором (легкость связывания). Модифицируя химическую структуру веществ, можно существенно изменить (уменьшить или увеличить) аффинитет вещества к рецептору.

Вещество взаимодействует с рецептором за счет образования химических связей: ковалентных, электростатических и гидрофобных. При этом их прочность убывает в вышеупомянутом ряду, а электростатические взаимодействия являются самыми распространенными.

Фармакологические препараты, которые связываются с рецепторами посредством слабых взаимодействий, обладают высокой *селективностью* (избирательностью) действия по сравнению с препаратами, использующими ковалентное связывание. Другими словами, взаимодействие, основанное на образовании слабых химических связей, требует «тонкой» подгонки структуры рецептора по отношению к действующему веществу.

ДЕСЕНСИТИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

При многократной аппликации действующего вещества наблюдается уменьшение клеточного ответа. Впервые явление *десенситизации* было исследовано при изучении действия ацетилхолина в нервно-мышечном препарате лягушки. Оказалось, что оно определяется свойствами самого рецептора, поскольку модулируется при его фосфорилировании. Десенситизация обратима: так, повторная аппликация агониста через 15 минут после его удаления вызывает ответ, сравнимый по величине с первоначально наблюдаемым.

В физиологических условиях десенситизация холинергической передачи в нервно-мышечном синапсе не играет существенной роли. В то же время десенситизация в некоторых ГАМК- и глутаматергических синапсах является важным фактором, определяющим активность в постсинаптической клетке.

Десенситизация характерна и для метаботропных рецепторов, функционирование которых опосредуется G-белками. В этом случае модуляция активности рецепторов осуществляется за счет их фосфорилирования А-киназой или специфическими киназами, связанными с G-белком.

ГЛАВА 8

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ

(общий обзор)

ДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВ СИНАПТИЧЕСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

Большинство сигнальных молекул оказывает выраженное влияние на синаптическую передачу. Учитывая примат нервной системы в процессах координации активности различных функциональных систем организма, необходимо подчеркнуть, что именно нейромедиаторы и нейромодуляторы играют ключевую роль в межклеточной коммуникации. Структурные и физиологические особенности химических синапсов позволяют выделить ряд этапов в передаче сигнала, подверженных регуляторным влияниям:

- **потенциал действия в пресинаптическом волокне** — именно деполяризация пресинаптического окончания, происходящая при развитии потенциала действия, лежит в основе каскада реакций, приводящих к высвобождению медиатора (см. гл. 5);

- **синтез, хранение и метаболизм медиатора** — подавление синтеза и хранения медиатора выражено уменьшает эффективность синаптической передачи. Напротив, снижение его катаболизма, т. е. уменьшение скорости распада медиатора, приводит к увеличению его концентрации в пресинаптическом волокне, а следовательно, и количества, выделяемого при каждом импульсе;

- **выделение медиатора** — является ключевым моментом химической передачи сигнала. Процесс демонстрирует сильную Ca^{2+} -зависимость, хотя возможны и исключения, например, при действии газообразных нейромедиаторов;

• **обратный захват и деградация медиатора** – эти процессы ограничивают действие медиатора после его выделения в синаптическую щель. Следует заметить, что для большинства нейромедиаторов существует механизм обратного захвата в пресинаптическую терминаль или в окружающие область синапса клетки нейроглии. Ряд медиаторов (ацетилхолин, катехоламины) инактивируется посредством ферментативного гидролиза или окисления. Подавление обратного захвата или ингибирование ферментативных систем, отвечающих за распад медиатора, пролонгирует его действие;

• **связывание с рецептором и обусловленные этим реакции клетки** – многие фармакологические препараты выступают в качестве агонистов или антагонистов тех или иных «естественных» медиаторов. При этом может быть реализовано как прямое действие вещества на рецептор, например, блокада образованного им ионного канала (при действии барбитуратов), так и опосредованное влияние на клетку за счет усиления (ослабления) продукции того или иного вторичного посредника (например, метилксантин повышает уровень цАМФ).

Во многом селективность действия того или иного препарата обусловлена еще и тем, что нейроны, входящие в состав тех или иных сетей, преимущественно используют *определенный медиатор* (группу медиаторов). Именно это дает возможность оказывать влияние на *отдельные функции*, находящиеся под контролем нервной системы.

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ

Существует целый спектр методов различной направленности (электрофизиологических, молекулярно-биологических, биохимических, гистологических, физико-химических и др.), позволяющих не только выявить природу веществ, обладающих сигнальной активностью, но и установить механизм их действия на клетку и организм в целом.

1. Изучение действия веществ на биологические объекты – возможно на разных уровнях организации организма, что и обуславливает различие применяемых методик:

а) электрофизиологические методы – предназначены для изучения электрической активности возбудимых тканей. В зависимости от условий их применения различают следующие:

• **электрофизиология *in vivo***: ее несомненным преимуществом является регистрация электрической активности участков *неповрежденной*

ткани. При исследовании поведения нервных клеток предварительно анестезированное животное помещается в *стереотаксическую установку*, позволяющую вводить электроды в строго заданную область мозга (в соответствии с разработанной системой стереотаксических координат). Отведение электрических потенциалов возможно как от отдельных клеток, так и от их совокупности (электроэнцефалограмма (ЭЭГ); электрокортикограмма (ЭкоГ)). При этом электрод помещается снаружи клетки (клеток), что позволяет улавливать слабые колебания потенциала.

Недостатком указанной методики является необходимость постоянного гистологического контроля за тем, от какой структуры в действительности была отведена электрическая активность. Это обусловлено индивидуальными различиями животного, используемого в опыте, и животных, на основании исследований мозга которых были созданы стереотаксические атласы.

Вживление электродов позволяет избежать артефактов, обусловленных анестезией, а также провести параллели с изменениями поведения экспериментальных животных;

- **электрофизиология *in vitro***: в этом случае электрическая активность отводится от изолированных клеток из состава клеточных культур, срезов нервной ткани (*slices*, слайсов) и т. п. Недостатки этой методики очевидны – речь идет о модельных системах, но при этом создается уникальная возможность регистрации электрических сигналов от *идентифицированных* в функциональном отношении структур. В данном случае особое преимущество имеет использование так называемых «модельных» организмов – моллюсков, ракообразных, насекомых, нервная система которых нередко построена из крупных, легко идентифицируемых нейронов (см. рис. на обложке) с известными связями и позицией в той или иной нейронной сети.

Наличие индивидуальных клеток позволяет проводить как внеклеточную, так и внутриклеточную регистрацию. В первом случае она принципиально мало чем отличается от электрофизиологической регистрации *in vivo*. Внутриклеточная регистрация электрической активности может быть осуществлена в разных конфигурациях: **фиксация тока** (*current clamp*) – позволяет оценить изменения мембранного потенциала – и **фиксация напряжения** (*voltage clamp*) – позволяет оценить количество тока, протекающего через мембрану при том или ином напряжении на ней. Важнейшим методом исследования функции клеточных мембран является методика локальной фиксации потенциала (*patch clamp*).

Рассмотренные методики часто используются в сочетании с *ионофоретической аппликацией* сигнальных молекул и *стимуляцией* определенных путей в пределах ЦНС или отдельных клеток в пределах нейронной сети;

б) методы биоанализа – благодаря им возможно охарактеризовать некоторые функции, выполняемые биологически активными веществами в организме. Базовый принцип этого метода – удаление из организма источника, продуцирующего то или иное вещество (*экстирпация*). Это вызывает различные нарушения биохимической и физиологической направленности. Если при этом экзогенная аппликация исследуемого вещества способна предотвратить развитие патологии, то это является свидетельством, подтверждающим вовлеченность вещества в регуляцию определенной функции.

Указанные методы были впервые успешно использованы еще на заре современной физиологии (первая половина XIX в.) для выяснения роли эндокринных желез, продуцирующих различные гормоны;

в) эксперименты по изучению поведения – позволяют выяснить функциональные эффекты фармакологических препаратов, работу отделов и частей нервной системы и т. п. Они проводятся в контролируемых условиях лаборатории, что позволяет минимизировать артефакты, связанные с действием внешних, «отвлекающих» факторов. Анализ поведения животных дает возможность исследовать влияние сигнальных веществ на восприятие, обучение, формирование памяти. Важнейшим этапом в истории изучения поведения животных стала разработка методик исследования научения: *классического* (И. П. Павлов, 1906, 1927) и *инструментального* (Э. Торндайк, 1898) **условных рефлексов**.

При выработке классического условного рефлекса необходимо, чтобы неэффективный сам по себе стимул (*условный раздражитель*), как, например, свет лампочки или звук звонка, предшествовал и сочетался с эффективным стимулом (*безусловным раздражителем*), например, пища или укол иголкой. В результате повторения этих сочетаний в течение некоторого времени предъявление одного лишь условного раздражителя способно вызвать ответную реакцию (условный рефлекс), в нашем примере – выделение слюны или отдергивание конечности.

Развитие инструментального условного рефлекса предполагает активное участие животного в эксперименте. При этом только определенное его поведение (например, движение в правильном направлении) приводит к вознаграждению со стороны экспериментатора – в результате научение идет быстрее. Кроме того, тренировка в выполнении одних операций улучшает выполнение других, сходных операций (*перенос* приобретенного навыка).

Классический и инструментальный рефлексы различаются по способу подкрепления безусловного стимула, а также по степени их угасания. Так, в случае *частичного подкрепления* инструментальный рефлекс не угасает, в то же время классический условный рефлекс такой стойкостью не обладает.

Помимо рассмотренного *ассоциативного* поведения, И. П. Павлов (1927) описал и *неассоциативные* типы изменения поведения: **габитуацию** (привыкание) – уменьшение силы последовательных рефлексорных реакций, вызываемых повторными раздражениями, и **сенситизацию** – усиление реакции на раздражитель в результате действия другого, обычно более сильного, раздражителя, которое не зависит от предшествующего сочетания раздражителей.

Помимо выработки условных рефлексов, существуют и другие методики изучения поведения животных – челночная камера, разнообразные лабиринты и другие, применяемые при анализе действия сигнальных веществ.

2. Изучение локализации нейромедиаторов и нейромодуляторов в пределах ткани и организма – позволяет определить физиологические системы, вовлеченные в реализацию различных функций. При этом в качестве объекта анализа выступают ферментативные системы синтеза медиатора, а также их рецепторы. В этом случае применяются следующие методы:

а) радиоизотопные методы – в основе лежат различные реакции связывания с радиоактивными веществами:

- **радио-иммунный анализ (РИА, RIA)**: осуществляется благодаря реакции антиген – антитело. В этом случае вещество, обладающее антигенными свойствами, инкубируется в течение определенного времени с помеченным радиоактивным изотопом аналогичным антигеном и антителами к нему. Сравнивая количество радиоактивных и нерадиоактивных комплексов антиген – антитело, можно оценить относительное количественное содержание вещества в пробе;

- **радио-рецепторный анализ (PPA, RRA)**: связывание радиоактивного лиганда с рецептором позволяет рассчитать константу диссоциации комплекса вещество – рецептор (K_D), определить плотность и число рецепторов в данной ткани. По характеру связывания можно предсказать молекулярный состав и аффинность рецептора, наметить пути его биохимической очистки;

- **авторадиография**: по сути представляет собой вариацию радио-рецепторного анализа. Связывание радиоактивно меченного лиганда происходит в пределах ткани и позволяет локализовать определенную группу рецепторов, поскольку излучение радиоактивных изотопов оставляет отпечаток (*автограф*) на фоточувствительной эмульсии, которую затем можно рассмотреть под микроскопом. Использование высокоспецифичных антагонистов дает возможность установить распределение различных типов (подтипов) рецепторов к одному и тому же веществу.

Следует заметить, что автораддиография относится к *непрямым* методам локализации рецепторов, в отличие от прямого радиоактивного мечения рецептора.

Радиоизотопные методы обладают крайне высокой чувствительностью, позволяя определять вещества в количестве фемтомолей (10^{-15}). В качестве радиоактивных меток используются, как правило, тяжелые изотопы водорода (^3H) или углерода (^{14}C);

б) микродиализ – используется для того, чтобы отвести небольшие количества исследуемого вещества от межклеточной жидкости или, наоборот, подвести. В основе метода лежит диффузия исследуемого вещества через полупроницаемую мембрану камеры для микродиализа. Позволяет также собирать межклеточную жидкость от интересующей области ткани. При этом камера для диализа используется в роли диффузионной ловушки (полупроницаемая мембрана пропускает вещество внутрь камеры по градиенту концентрации, но препятствует его выходу наружу). Метод может быть применим к живым организмам, однако существует возможность возникновения артефактов, связанных с хирургическим вмешательством в исследуемую область мозга;

в) электрохимические методы – могут быть использованы для обнаружения молекул, способных быстро переходить из восстановленного в окисленное состояние, например катехоламинов. Детектирование основано на знании значения окислительно-восстановительного потенциала, при котором то или иное вещество приходит в окисленное состояние;

г) иммуногистохимические методы – позволяют исследовать белки, прежде всего рецепторы и ферментативные системы синтеза медиатора, в составе различных анатомических структур. В основе метода лежит реакция связывания антиген – антитело и последующая визуализация комплексов. Выделяют несколько вариаций метода:

- **использование антител (*первичные антитела*)**, **изначально связанных с флуорохромом**: позволяет при помощи флуоресцентного микроскопа визуализировать изучаемые структуры непосредственно сразу после обработки препарата. Тем не менее вызывает нарекание необходимость связывания каждого нового типа антител с флуорохромом, а также относительно низкая чувствительность метода;

- **использование антител (*вторичные антитела*)**, **связывающихся с первичными антителами**: в этом случае вторичные антитела связаны либо с флуорохромом, либо с ферментом, способным катализировать какую-либо биохимическую реакцию. Так, пероксидаза хрена, взаимодействуя с гидроперекисью в присутствии диаминобензидина, вызывает образование плотного осадка, который можно наблюдать в микроскоп.

Преимущество этого метода заключается в том, что с первичным антителом связываются многие вторичные антитела, поскольку эта реакция обладает меньшей специфичностью. В результате исходный сигнал многократно усиливается.

Основным недостатком метода является малая уверенность в специфичности выявляемых структур, поскольку разные белковые молекулы могут содержать схожие участки связывания с антителами. Кроме того, существование многочисленных изоформ рецепторов также затрудняет интерпретацию полученных данных;

д) гибридизация *in situ* – позволяет выявить кРНК, кодирующую соответствующие рецепторы или ферментативные системы синтеза медиатора в исследуемых тканях. Необходимым условием является знание нуклеотидной последовательности кодирующих белок участков РНК или ДНК. Накопление соответствующих количеств кРНК (кДНК), используемой для гибридизации, происходит в результате полимеразной цепной реакции (*polymerase chain reaction*, PCR). Впоследствии синтезированная кРНК (кДНК) взаимодействует с комплементарной ей РНК, находящейся в клетках изучаемой ткани. Визуализация комплексов достигается за счет радиоактивного мечения используемой искусственно синтезированной кРНК или за счет связывания с ней же антигенной детерминанты (диоксигенина), которая может быть выявлена методами иммуногистохимии;

е) методы окраски ткани и визуализации нервных трактов – использование в качестве красителей солей тяжелых металлов (AgNO_3 , AuCl) позволило выявить тонкую организацию нервных клеток – тело с отходящими от него многочисленными отростками (К. Гольджи, ок. 1880; С. Рамон-и-Кахаль, 1906). В основе методов визуализации нервных трактов лежит тот факт, что сома (тело) нервной клетки является основным источником, поставляющим на периферию (отростки) различные метаболиты. Вводя внутрь клетки различные метки (флуоресцентные красители или ферменты, катализирующие реакции, сопровождаемые изменением окраски структуры, например, пероксидазу хрена), можно проследить не только ход отдельных отростков в составе нервных волокон или нейронных сетей, но и связи клеток друг с другом. Так, некоторые красители (люциферовый желтый, калцеин) достаточно невелики по размерам и могут спокойно проникать через щелевые контакты в соседние клетки.

Оригинальным методом визуализации нервных трактов является исходное разрушение тела нейрона или его ядра. При этом отмирающие отростки могут быть визуализированы с помощью специальной окраски.

3. Изучение структуры сигнальных молекул и их рецепторов – позволяет полностью охарактеризовать действующее вещество и установить молекулярное строение воспринимающих его структур. В этих целях применяют следующие методы:

а) хроматография – химические вещества могут быть выделены и очищены на основании различий в их размерах, молекулярной массе, поверхностном заряде, способности связываться с другими веществами. Хроматографию обычно предваряет разделение исследуемого клеточного материала на несколько фракций – ядерную, мембранную, цитозольную и т. д., полученных при высокоскоростном центрифугировании. В качестве образца, используемого для нанесения на хроматографическую колонку, могут использоваться и образцы, добытые при помощи микро-диализа. Выделяют два основных вида хроматографии:

- **аффинная хроматография**: при этом специфические антитела связаны с матриксом хроматографической колонки. Химические вещества образца, обладающие антигенной активностью, связываются с антителами матрикса, а вещества, не распознаваемые антителами, свободно проходят через хроматографическую колонку. Последующее нанесение раствора с низким рН вызывает разрушение комплекса антиген – антитело и иско-мое вещество «сходит» с колонки в виде отдельной фракции (фракций);

- **высокоэффективная жидкостная хроматография** (*high performance liquid chromatography*, HPLC): стационарная фаза такой колонки способна с высокой эффективностью связываться с неполярными молекулами. Подвижная фаза представляет собой обыкновенный растворитель с выраженными полярными свойствами. Под действием повышенного давления (30–200 бар) мобильная фаза проходит через колонку. При этом первыми с колонки сходят молекулы более заряженные и, следовательно, более полярные, поскольку их связывание со стационарной фазой колонки минимально. Напротив, неполярные, слабо заряженные молекулы сходят с колонки в составе более поздних фракций. Увеличение длины колонки позволяет добиться лучшего разделения исследуемого материала. Кроме того, использование HPLC позволяет провести и *количественную* оценку содержания веществ в образце. При этом сравниваются хроматограммы для экспериментального образца с хроматограммами, полученными для аналогичного вещества в известной концентрации;

б) рентгеноструктурный анализ – позволяет с высочайшей разрешающей способностью (около 2–3 Å) установить особенности организации белковых молекул. Начальным этапом при этом является необходимость получения достаточного количества белка. Этого можно достичь, осуществив клонирование соответствующих генов в некоторых модель-

ных системах (ооциты лягушки, *E. coli*). Сама же нуклеотидная последовательность, кодирующая синтез белка, может быть установлена исходя из знания его первичной аминокислотной последовательности. Вторым способом – прямое биохимическое выделение и очистка исследуемого белка – редко применяется на практике из-за того, что молекулы определенного рецептора составляют ничтожную долю от общего белка клетки. Дальнейшие этапы связаны с получением кристалла белка, что особенно сложно по отношению к мембранным белкам (на 2005 г. насчитывалось не более 100 связанных с мембраной белков, структуру которых удалось установить с высокой степенью разрешения). Впоследствии, анализируя дифракционную картину, полученную при облучении кристалла рентгеновскими лучами, возможно установить положение отдельных аминокислот в пределах каждой из субъединиц белка. На основании полученных данных можно с уверенностью говорить о том, как именно функционирует та или иная белковая молекула.

Методы молекулярной биологии и биоинформатики позволяют не только получать неограниченные количества рекомбинантного белка, но и выявлять новые, еще не известные рецепторные образования. Так, нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая тот или иной рецептор, содержит высокоустойчивые области, сходные или идентичные с таковыми, кодирующими рецепторы аналогичного класса или семейства. Таким образом, посредством ДНК–ДНК-гибридизации могут быть обнаружены новые области, ответственные за синтез рецепторов, лиганд к которым пока еще не известен (*рецептор-сирота*).

КРИТЕРИИ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ

Многие биологически активные вещества, равно как и промежуточные метаболиты разнообразных биохимических реакций, способны выступать в качестве медиаторов межклеточных взаимодействий. Заметим, что нейронная передача сигнала не ограничена областью ЦНС, а встречается также и на периферии – нервно-мышечные и нервно-железистые соединения. Сигнальные молекулы, участвующие в нейронной передаче сигнала, традиционно подразделяются на *нейромедиаторы* и *нейромоделаторы*. Несмотря на то, что они выполняют похожие функции, существует ряд критериев, позволяющих отделить их друг от друга.

Вещество может рассматриваться **в качестве нейромедиатора**, когда будет установлено, что оно удовлетворяет следующим условиям (по W. D. M. Paton, 1958; D. R. Curtis, 1961; H. McLennan, 1963; Дж. Экклз, 1966):

1) вещество должно присутствовать в достаточных количествах в **пресинаптических окончаниях**, содержащих ферментативную систему для его синтеза. Существует несколько подходов для доказательства того, что тот или иной предполагаемый медиатор находится в исследуемой области нервной ткани. В частности, это химический анализ локальных концентраций веществ (комбинируется с прерыванием анализируемых нейронных путей) посредством микродиализа и целый спектр иммуногистохимических методов, позволяющих успешно локализовывать биохимические системы синтеза предполагаемого нейромедиатора;

2) раздражение пресинаптических нервов должно приводить к высвобождению достаточных количеств вещества из пресинаптических терминалей определенной области. Стимуляция *in vitro* или *in vivo* происходит посредством действия электрического тока или химических раздражителей. Выполнив затем локальный сбор внеклеточной жидкости, можно определить количество исследуемых веществ в пробе.

Анатомическая сложность нервной системы позвоночных затрудняет точную локализацию терминалей, содержащих предполагаемый медиатор. Поэтому его количество, определяемое в перфузате, составляет ничтожную часть его истинного количества, выделяемого при стимуляции пресинаптического окончания.

Кроме того, для определения связи между высвобождением нейромедиатора и химической синаптической передачей надо показать, что высвобождение Ca^{2+} -зависимо;

3) действие вещества на постсинаптическую клетку должно быть идентично синаптическому действию. Методы микроионофореза позволяют чрезвычайно точно локализовать введение вещества в заданную область нервной ткани. В данном случае речь идет о *физиологической идентичности*: вещество должно вызывать такие же изменения ионной проводимости постсинаптической клетки, что и медиатор, обеспечивающий передачу сигнала в синапсе.

Следует помнить, что *разные нейромедиаторы* вызывают *одинаковые изменения* ионной проводимости;

4) влияние фармакологических препаратов на синаптическую передачу и постсинаптическое действие исследуемого вещества **должно быть одинаково.** При этом аппликация препаратов также производится ионофоретическим способом. Важно показать *фармакологическую идентичность* исследуемых веществ: эффект должен быть одинаков в случае использования агонистов и сниматься антагонистами, прежде всего, селективными блокаторами соответствующих рецепторов;

5) в области синаптической щели должна существовать ферментативная система инактивации вещества. В последнее время считается, что ей может быть противопоставлена система обратного захвата нейромедиатора. В обоих случаях речь идет об удалении избыточного (не связанного с рецептором) нейромедиатора из синаптической области.

Основной особенностью нейромодуляторов, как это следует из самого термина, является их способность модулировать синаптическую передачу – как правило, пролонгировать действие «классических» медиаторов. **Нейромодуляторы** отличаются от нейромедиаторов на основании следующих критериев:

1) количество выделяемого в синаптическую щель **нейромодулятора**, как правило, **значительно меньше** количества выбрасываемого нейромедиатора;

2) нейромодуляторы реализуют свое действие при более низких концентрациях, нежели нейромедиаторы;

3) нейромодуляторы не опосредуют протекание быстрых синаптических процессов. Для них характерно медленное и продолжительное действие, опосредуемое активацией G-белков и системы вторичных посредников;

4) нейромодуляторы действуют опосредованно – взаимодействуя с нейромедиаторами в случае, когда они выступают в качестве ко-медиаторов, как, например, АТФ в холинергических нервно-мышечных синапсах. Прямое действие нейромодуляторов на синаптическую передачу выражено слабо;

5) зачастую отсутствуют механизмы быстрой инактивации нейромодулятора **в синаптической щели** – при этом механизмы обратного захвата встречаются крайне редко.

Некоторые нейромодуляторы в ряде ситуаций, например АТФ, обнаруживают поразительное сходство с действием нейромедиаторов. В этом случае говорят о «**предполагаемых**» (*putative*) нейромедиаторах.

КЛАССИФИКАЦИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ

Классификация нейромедиаторов и нейромодуляторов основана на различиях в их химической природе.

Нейромедиаторы подразделяются на две большие группы:

1) аминокислоты: γ -аминомасляная кислота (ГАМК), глицин, глутамат и аспартат;

2) биогенные амины: во многих случаях являются производными соответствующих аминокислот, получаемыми в результате декарбоксилирования последних.

Дальнейшее разделение в пределах группы основано на характере взаимодействия аминокислоты с органическим радикалом:

- **ацетилхолин**: является единственным представителем производных *холина*;

- **гистамин**: является производным аминокислоты *гистидина* и содержит в своем составе *имидазольную* группу;

- **моноамины**: в их состав, помимо первичной аминокислоты, входят производные *индола* – **серотонин** или *катехола* (катехоламины) – **дофамин**, **адреналин** (*эпинефрин*) и **норадреналин** (*норэпинефрин*). Основой для синтеза этих подгрупп нейромедиаторов служат аминокислоты – триптофан и тирозин соответственно.

Нейромодуляторы подразделяются на четыре большие группы:

- 1) **нейропептиды**: эндорфин, мет-энкефалин, кальцитонин, вещество Р и т. п. Образуются из крупных белковых молекул-предшественников. В результате из одного белка может быть сформировано более одного нейропептида. В одной клетке может одновременно существовать более одного нейропептида, они также нередко выступают в роли комедиатора;

- 2) **производные жирных кислот**: *эйкозаноиды* и *арахидоновая кислота*. Данные нейромодуляторы принимают участие в регуляции реакции воспаления, в качестве медиаторов лихорадки и т. п.;

- 3) **пурины и пиримидины**: к указанной группе относятся *внеклеточные* АТФ, АДФ и аденин (пурины), а также УТФ и УДФ (пиримидины).

В настоящее время почти не вызывает сомнений *нейромедиаторная* роль АТФ и аденина;

- 4) **газообразные вещества**: обладают целым спектром уникальных особенностей, среди которых отсутствие специфических механизмов их накопления и хранения внутри клетки. В настоящее время к ним относятся, как минимум, три молекулы: NO, CO и H₂S.

Долгое время по отношению к нейромедиаторной специфичности того или иного нейрона считался справедливым так называемый *принцип Дэйла* (Н. Dale, 1935). Согласно ему, из окончаний нервной клетки высвобождается только один медиатор, причем эта специфичность не изменяется с течением времени. Дж. Экклз (J. C. Eccles, 1957) расширил этот принцип, постулировав, что «каждый данный класс нейронов во всех синаптических окончаниях будет функционировать либо только как возбуждающий, либо как тормозный»¹. Тем не менее было показано (Н. Wachtel, E. R. Kandel, 1967), что электрическая стимуляция одного и того же пре-

¹ Цит. по: Кэндел Э. Клеточные основы поведения. М., 1980. С. 243.

синаптического нейрона вызывает одновременно возникающие ТПСР и ВПСР в двух разных постсинаптических нейронах, моносинаптически связанных с первой клеткой. Более того, в нейронах вегетативной нервной системы одни и те же клетки высвобождают как адреналин, так и ацетилхолин. Существование многочисленных комедиаторов (АТФ в холинергических нервно-мышечных синапсах, нейропептиды в синапсах симпатических ганглиев и т. п.) также противоречит принципу Дэйла.

В своей работе 1935 г. Г. Дэйл категорически *не утверждал*, что идентификация нейромедиатора в периферическом синапсе какого-либо нейрона автоматически подразумевает его же (медиатора) участие в синаптической передаче, обеспечиваемой другими его отростками.

ГЛАВА 9

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ: АЦЕТИЛХОЛИН, ГИСТАМИН И СЕРОТОНИН

АЦЕТИЛХОЛИН: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Первым веществом, нейромедиаторная роль которого была установлена со всей ясностью, является ацетилхолин (АХ).

В начале XX в. Дж. Хант (J. Hunt, 1907) и Г. Дэйл (H. Dale, 1914) показали, что сложные эфиры холина обладают выраженным биологическим эффектом. Г. Дэйл также разделил холинорецепторы на *м*- и *н*-типы. В 1921 г. О. Лёви (O. Loewi) демонстрирует, что тормозный эффект стимуляции блуждающего нерва на сердце опосредуется выделением в межклеточное пространство химического вещества, позднее (1926) идентифицированного как ацетилхолин. Наконец, Х. Чанг и Дж. Гаддум (H. Chang, J. Gaddum, 1933) показали, что АХ присутствует и в ЦНС млекопитающих.

Холинергическая система мозга образована тремя основными скоплениями нейронов (рис. 66):

1) мотонейроны спинного мозга – формируют нервно-мышечные соединения, коллатерали этих клеток, также образуют возбуждающие синапсы на мелких вставочных нейронах (клетки Реншоу, обладающие *н*-холинорецепторами), расположенных в промежуточном веществе;

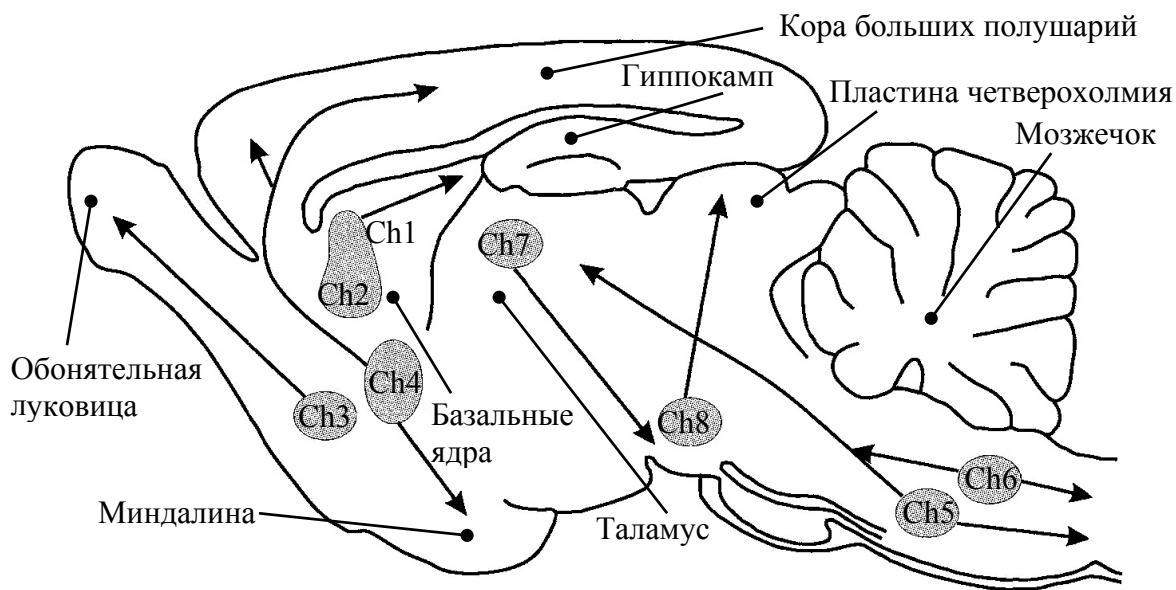


Рис. 66. Распределение проекционных холинергических нейронов и их связи в мозге крысы (здесь и далее по O. von Bohlen und Halbach, R. Dermietzel, 2002)

2) интернейроны базальных ядер – преимущественно локализованы в области стриатума (полосатого тела). Терминали этих клеток образуют синапсы с отростками, проецирующимися в эту область мозга, дофаминергическими нейронами *substantia nigra*;

3) проекционные нейроны – образуют синапсы с клетками, расположенными на значительном расстоянии от мест локализации скопления их тел. Их номенклатура предложена М. Месуламом и соавторами (M. Mesulam et al., 1983). Согласно номенклатуре, группы Ch1, Ch2, Ch3 и Ch4 находятся в подкорковых областях конечного мозга, давая отростки в участки гиппокампа, обонятельной луковицы, коры больших полушарий и миндалины. Группы Ch5 и Ch6 расположены в начальных отделах головного мозга – заднем (мосту) и продолговатом мозге. Их отростки направляются к зрительным буграм и гипоталамической области, а также к нижележащим областям ЦНС. Терминали расположенных в области поводков промежуточного мозга нейронов группы Ch7 достигают ядер ножек мозга, а нейронов группы Ch8 (околоблизнецовые (*parabigeminal*) ядра) – верхних холмиков среднего мозга. Отростки проекционных нейронов способны образовывать как асимметричные возбуждающие синапсы с дендритами клеток-мишеней, так и симметричные тормозные синапсы. Достаточно часто в этих нейронах АХ оказывается колокализован с ГАМК.

|| Малочисленные скопления холинергических нейронов существуют также в коре больших полушарий, гиппокампе и обонятельной луковице.

МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА

Ацетилхолин образуется в цитоплазме нервных окончаний из холина и ацетилкоэнзима А (ацетил CoA) под действием холин-ацетилтрансферазы (рис. 67).

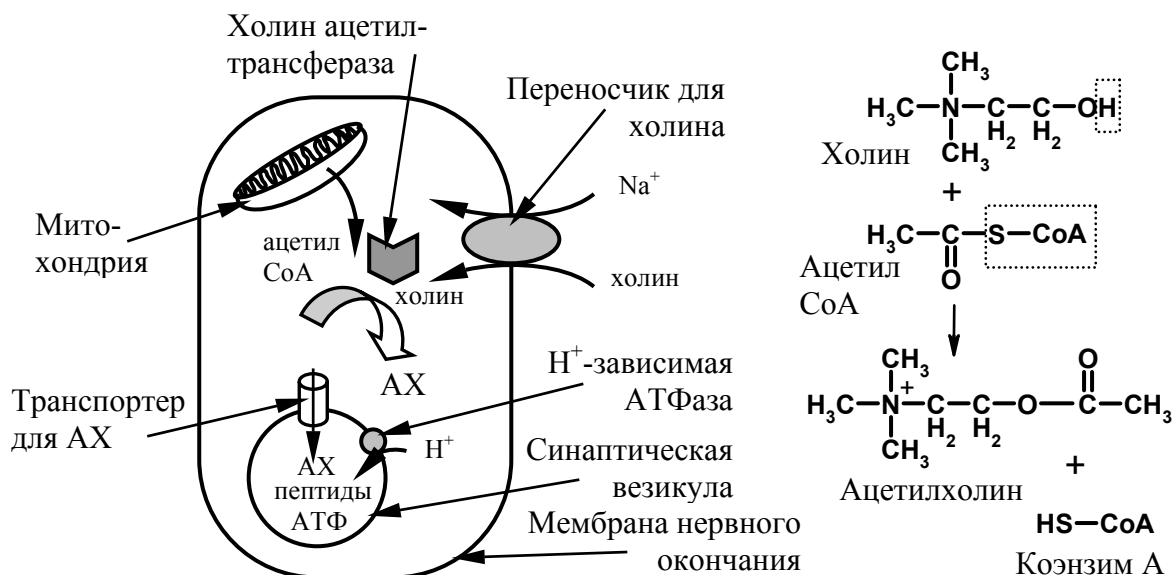


Рис. 67. Синтез ацетилхолина в нервном окончании

Этот фермент в высоких концентрациях содержится в нервных клетках, и его количество не является лимитирующим фактором при синтезе АХ.

Холин образуется при распаде экзогенного фосфатидилхолина или попадает в нейроны извне, как результат поступления в организм с пищей. Его перемещение в цитозоль осуществляется благодаря наличию в мембране клетки Na⁺-зависимого переносчика. Система, опосредующая симпорт ионов натрия и холина внутрь клетки, высокоспецифична и встречается только в мембране нервных окончаний холинергических нейронов. Она избирательно блокируется гемихолинием.

Ацетил CoA образуется в митохондриях из пирувата как один из продуктов метаболического распада глюкозы, откуда он и поступает в цитоплазму нейрона. Накопление синтезированного АХ в синаптических пузырьках осуществляется при помощи специфического транспортного белка – *транспортера АХ* (VACht), состоящего из 12 трансмембранных доменов. Помимо этого, мембрана везикул содержит H⁺-зависимую АТФазу, перекачивающую протоны внутрь. В результате ее работы рН внутри синаптических пузырьков понижен, а на внутренней стороне их мембраны накапливается положительный заряд. Потенциальная энергия соз-

данного таким образом электрохимического градиента используется для перемещения АХ против концентрационного градиента внутрь везикулы. Везамикол способен блокировать работу АХ-транспортера.

Помимо собственно АХ, синаптические пузырьки содержат также небольшие количества АТФ и пептидов, выступающих в роли комедиаторов.

Работы Р. Биркса и Ф. МакИнтоша (R. Birks, F. MacIntosh, 1957, 1961), выполненные на симпатическом ганглии кошки, позволили количественно оценить метаболизм АХ в нервных окончаниях (рис. 68).



Рис. 68. Схема метаболизма ацетилхолина в симпатическом ганглии кошки (по R. Birks, F. MacIntosh, 1961; с изменениями)

Оказалось, что АХ содержится в трех основных местонахождениях. В первом из них находится около 40 нг АХ, который не может быть израсходован даже при длительном раздражении пресинаптических волокон (*стационарный АХ*). Эта фракция АХ не подвержена действию ацетилхолинэстеразы и, вероятно, находится вне синаптической области. Основным резервуаром АХ в нервных окончаниях содержит около 220 нг АХ. При этом одна его часть содержится в синаптических пузырьках (*депонированный АХ*), а другая — вне синаптических везикул (*избыточный АХ*). Последняя фракция может быть подвергнута гидролизу при действии ацетилхолинэстеразы нервных окончаний. Запасы основного АХ в состоянии покоя пополняются со скоростью 4 нг/мин, из которых около 10 % (0,4 нг) спонтанно выделяются в синаптическую щель, а оставшиеся 3,5 нг пополняют резервуар избыточного АХ. В условиях активации пресинаптических волокон наблюдается увеличение как синтеза АХ, так и

скорости его высвобождения – до 28 нг/мин, способное оставаться на данном уровне сколь угодно долгое время (разумеется, при непрекращающемся поступлении в клетку холина и глюкозы). Не менее $\frac{1}{4}$ всего депонированного АХ относится к легко высвобождаемой фракции, способной сразу выделиться в синаптическую щель под влиянием нервных импульсов, а позднее возместиться из основных резервуаров депонированного АХ.

Выделение АХ Ca^{2+} -зависимо и опосредовано белками комплекса SNARE. При этом токсины столбняка и ботулизма, вырабатываемые бактериями из рода *Clostridium*, взаимодействуя с белками комплекса SNARE, предотвращают выделение нейромедиатора. Напротив, α -латротоксин, полученный от самки каракурта (*Lathrodectus tredecimguttatus*, «черная вдова»), усиливает выброс АХ.

Важную роль в механизмах распада АХ играют эстеразы – **ацетилхолинэстераза (АХЭ)** и **бутилхолинэстераза**, обладающая меньшей специфичностью и часто именуемая *псевдохоллинэстеразой* (рис. 69).

Ацетилхолинэстераза экспрессируется в нейронах, мышечной ткани и некоторых клетках крови. Она также присутствует в тех нервных клетках, которые не синтезируют АХ самостоятельно, но способны его воспринимать в качестве медиатора (*холиноцептивные нейроны*). Фермент представляет собой белок молекулярной массой около 80 кДа, существующий в нескольких изоформах: *мономерной* (G_1 , локализованной в цитоплазме), *димерной* (G_2) и *тетрамерной* (G_4 , доминирующей в ЦНС и расположенной в плазмалемме), асимметричных формах с коллагеновыми остатками (A_4 , A_8 , A_{12}). АХЭ образуется в теле нейрона и затем посредством *аксонного* транспорта попадает в нервные окончания (равно как и холин ацетилтрансфераза).

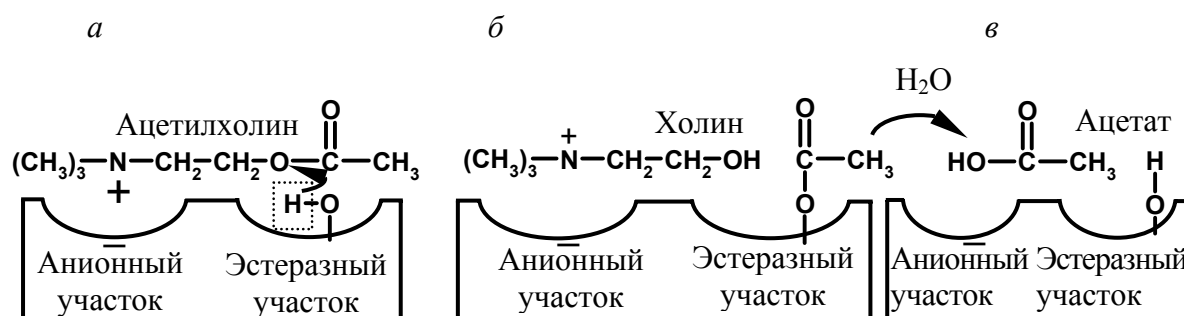


Рис. 69. Распад (гидролиз) ацетилхолина:
а–в – последовательные этапы работы ацетилхолинэстеразы

Стоит заметить, что в цитоплазме нервных окончаний, благодаря одновременному присутствию АХЭ и холин-ацетилтрансферазы, образование и распад АХ происходят непрерывно и скорости этих процессов примерно одинаковы. При этом уровень ацетилхолина контролируется в соответствии с *законом действующих масс* – так, снижение его концентрации при массивном выбросе в синаптическую щель приводит к нарастанию скорости образования АХ до тех пор, пока начальное равновесие не будет восстановлено. Бесконечное нарастание АХ в терминалах также невозможно, поскольку увеличение его концентрации неизменно приводит к усилению активности АХЭ, т. е. усиливает распад АХ. Именно благодаря этому механизму выделение АХ в синаптическую щель может поддерживаться на постоянно высоком уровне при интенсивной стимуляции пресинаптического волокна.

Считается, что образующийся в результате гидролиза в синаптической щели АХ холин в незначительном количестве захватывается пресинаптическими терминалями, где он снова включается в синтез новых порций АХ.

Инактивация АХЭ пролонгирует действие АХ, поэтому ее блокаторы обладают выраженным терапевтическим и токсическим действием. Блокаторы АХЭ конкурируют с АХ за АХЭ, обратимо (сложные эфиры карбамила) или необратимо (фосфорорганические вещества, нервно-паралитические газы) связываясь с последней.

АЦЕТИЛХОЛИН: РЕЦЕПТОРЫ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРЬ КЛЕТКИ

Выделившийся ацетилхолин взаимодействует с рецепторами постсинаптической мембраны или с ауторецепторами пресинаптических терминалей. Первичное разделение холинергических рецепторов на подтипы основано на характере их взаимодействия с двумя алкалоидами: никотином и мускарином.

Н-холинорецепторы активируются никотином в малых концентрациях и блокируются кураре, *м-холинорецепторы* активируются мускарином и блокируются атропином. Впоследствии выяснилось, что эти две группы имеют существенные структурные различия.

1. Н-холинорецепторы относятся к ионотропным рецепторам и представляют собой классический лиганд-управляемый ионный канал.

Н-холинорецептор был впервые изолирован в 1970 г. Источником белка при этом послужили клетки электрического органа, представляющего собой видоизмененные миоциты ската *Torpedo marmorata*, мембраны которых чрезвычайно насыщены рецепторами к АХ (рис. 70).

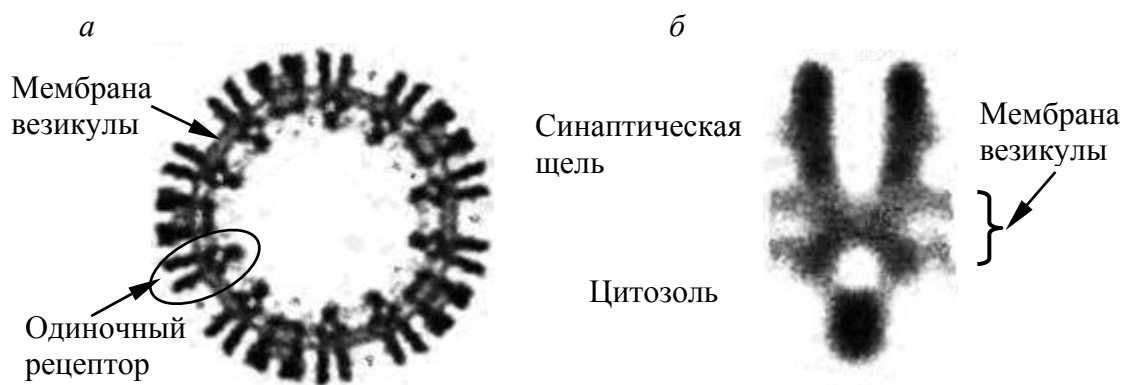


Рис. 70. *n*-холинорецептор (по А. Miyazawa et al., 2003):
a – поперечный разрез кристалла цилиндрической везикулы, мембрана которой содержит АХ-рецепторы; *б* – одиночный АХ-рецептор

Простейший *n*-холинорецептор представляет собой гликопротеин молекулярной массой около 300 кДа, состоящий из отдельных субъединиц, классифицируемых на основании молекулярной массы – α (40 кДа), β (50 кДа), γ (60 кДа) и δ (65 кДа).

Пять субъединиц (2α , β , γ , δ) закреплены в мембране и образуют кольцо вокруг центральной поры. Внеклеточная часть рецептора расширена по сравнению с мембранной частью, ее размеры составляют около 85 Å в диаметре и 70 Å в высоту. Интересно, что участок размером в 10 Å, находящийся у основания мембраны с внеклеточной стороны, образован гидрофобными участками субъединиц, аналогичными тем, что составляют основу мембранной части рецептора (30 Å). Диаметр поры равен 7 Å.

Каждая субъединица состоит из четырех трансмембранных участков (M1–M4), соединяющих их петель и внеклеточного концевой N-участка. Участки M1, M3 и M4 стабилизируют субъединицу в мембране за счет кластеризации гидрофобных участков аминокислотной цепи. Участок M2 в виде изломанной α -спирали обращен в сторону поры, формируя ее воротную часть, определяющую проницаемость канала для различных ионов (рис. 71).

Внеклеточный участок преимущественно образован β -спиралями. Сайты связывания с АХ находятся только на внеклеточных участках α -субъединиц. Для активации *n*-холинорецептора требуется присоединение к нему двух молекул АХ (рис. 72).

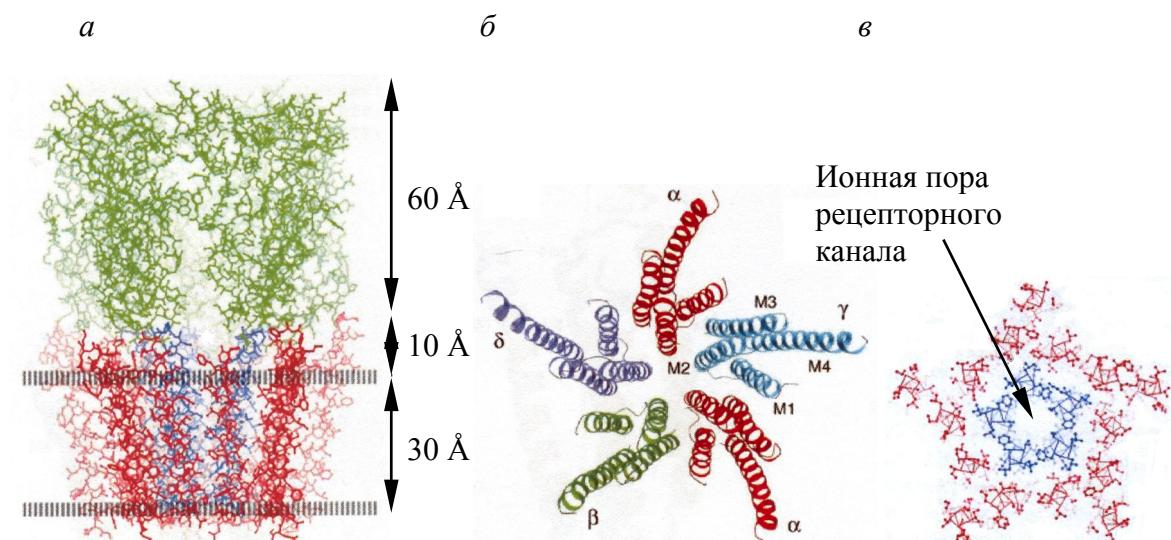


Рис. 71. Пентамерная организация *n*-холинорецептора (по А. Miyazawa et al., 2003):
a – вид сбоку; *б* – вид со стороны синаптической щели;
в – поперечный разрез на уровне мембраны

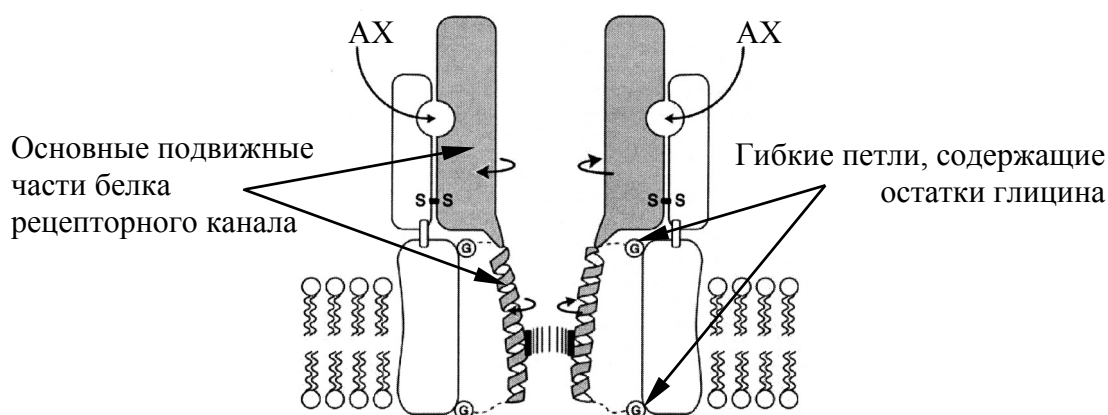


Рис. 72. Модель воротного механизма *n*-холинорецептора (по А. Miyazawa et al., 2003)

В результате изменения конформации α -субъединиц их M2-участки поворачиваются на 15° по отношению к центральной оси. Взаимодействуя с участками M2 других субъединиц, они вызывают смещение M1, M3 и M4, ослабляя гидрофобные связи субъединиц друг с другом в областях, обращенных к поре. Как следствие, ее диаметр увеличивается и канал становится проницаемым для положительно заряженных ионов.

n-холинорецептор может состоять и из меньшего количества субъединиц. В то же время существуют разнообразные изоформы α - и β -субъединиц: 9 (α_1 – α_9) и 4 (β_1 – β_4) соответственно. В зависимости от количеств-

ва типов субъединиц, участвующих в образовании канала, они могут быть подразделены следующим образом:

- **гетеромультимерные:** два или более типов субъединиц, например АХ-рецепторы вегетативных ганглиев ($\alpha_3\alpha_5\beta_4$) или нервно-мышечного соединения ($2\alpha, \beta, \gamma, \delta$);

- **гомомультимерные:** образованы субъединицами только одного типа. Представлены ауторецепторами, имеющими в своем составе лишь α_7 -субъединицы и образующими каналы для Ca^{2+} . Поскольку они расположены на мембране пресинаптических окончаний, то их активация вызывает усиление выхода нейромедиатора (не только АХ, но и дофамина, серотонина, глутамата) в синаптическую щель.

Изменение субъединичного состава происходит и в ходе индивидуального развития организма. Так, в АХ-рецепторах скелетных мышц с возрастом происходит замена эмбриональной γ -субъединицы на ϵ -субъединицу, что изменяет кинетику ионного канала – уменьшается время его нахождения в открытом состоянии.

В зависимости от места нахождения в организме *n*-холинорецепторы подразделяют на два подтипа:

- ***n_м*-холинорецепторы:** встречаются в нервно-мышечных соединениях, состоят из пяти субъединиц разного типа;

- ***n_н*-холинорецепторы:** рецепторы нейронального типа. Часто представлены гетеромультимерными, с «ограниченным» набором субъединиц, или гомомультимерными каналами. Характерны для постганглионарных нейронов вегетативных ганглиев, клеток коры больших полушарий, гиппокампа, таламуса, гипоталамуса, ядер моста.

В обоих случаях активация *n*-холинорецепторов приводит к увеличению проницаемости мембраны для положительно заряженных ионов, в основном натрия и калия, что приводит к деполяризации мембраны постсинаптической клетки и запуску целого спектра реакций (см. гл. 4 и 5).

2. М-холинорецепторы – относятся к метаботропным рецепторам, связанным с G-белками плазматической мембраны.

М-холинорецепторы представляют собой мономеры, состоящие из 440–540 аминокислотных остатков, образующие семь трансмембранных доменов. На основании фармакологических свойств *м*-холинорецепторы изначально были разделены на два подтипа: m_1 и m_2 . Впоследствии по результатам молекулярного клонирования были выделены еще три подтипа: m_3 , m_4 , m_5 . Таким образом, *м*-холинорецепторы объединены в две большие группы:

• **м₁-группа:** к ней относятся рецепторы подтипов м₁, м₃ и м₅. Они связаны с G_q-белками, активирующими фосфолипазу С и, как следствие, выход Ca²⁺ из внутриклеточных депо;

• **м₂-группа:** в ее состав входят рецепторы подтипов м₂ и м₄, связанные с G_i-белками, активация которых снижает продукцию цАМФ, вследствие ингибирования аденилатциклазы.

Кроме этого, существуют и дополнительные пути передачи сигнала при активации *м*-холинорецепторов: стимуляция фосфолипазы А₂ (рецепторы м₁-группы), фосфолипазы D (подтипы м₁ и м₃), прямое действие комплекса βγ-субъединиц на ионные каналы (подтип м₂) и даже ингибирование фосфодиэстеразы, приводящее к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ.

Активация *м*-холинорецепторов приводит как к деполяризации, так и к гиперполяризации мембраны клетки-мишени, реализуемых вследствие прямого или опосредованного действия. Описаны следующие изменения ионной проводимости мембраны при действии ацетилхолина:

- стимуляция K⁺-каналов внутреннего выпрямления (подтипы м₂ и м₄);
- снижение Ca²⁺-проводимости (подтип м₂);
- кальций-зависимая активация калиевой, хлорной и неспецифической катионной проводимостей (рецепторы группы м₁);
- торможение потенциал-зависимой K⁺-проводимости (подтипы м₁ и м₃).

М-холинорецепторы обнаружены не только в составе ЦНС, но также и на поверхности клеток-мишеней из состава других тканей. Рецепторы подтипов м₁ и м₂ встречаются в нейронах коры больших полушарий, гиппокампа, миндалины, полосатого тела, обонятельной луковицы. Они также характерны и для постганглионарных нейронов вегетативных ганглиев.

М₂-холинорецепторы характерны для кардиомиоцитов, благодаря им реализуется тормозное действие АХ на сердце и клетки гладких мышц. Для последних показано также наличие рецепторов подтипа м₃. Подтипы м₄ и м₅ встречаются реже и преимущественно локализованы в ЦНС.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АЦЕТИЛХОЛИНА

Исследование физиологической роли ацетилхолина стало возможным благодаря использованию различных биологически активных веществ, выступающих в роли агонистов или антагонистов холинергической передачи (табл. 4).

Кроме того, в их качестве могут выступать и химически синтезированные вещества: пилокарпин и оксотреморин (агонисты *м*-холинорецепторов), карбахол (агонист *м*- и *н*-холинорецепторов), физостигмин (блокатор АХЭ) и т. д.

**Вещества животного и растительного происхождения,
влияющие на холинергическую передачу**

Вещество	Источник происхождения	Влияние на холинергическую передачу
Никотин	Алкалоид <i>Nicotiana tabacum</i>	Агонист <i>n</i> -холинорецепторов
Мускарин	Алкалоид <i>Amanita muscaria</i>	Агонист <i>m</i> -холинорецепторов
α -Латротоксин	Токсин яда паука <i>Lathrodectus tredecimguttatus</i>	Усиливает выброс АХ в синаптическую щель
Атропин и скополамин	Алкалоиды <i>Atropa belladonna</i> и <i>Hyoscyamus niger</i>	Блокаторы <i>m</i> -холинорецепторов
Токсин ботулизма	Токсин бактерии <i>Clostridium botulinum</i>	Снижает выброс АХ в синаптическую щель
Бунгаротоксин	Токсин яда змеи <i>Bungarus multicinctus</i>	α -Токсин блокирует <i>n</i> -холинорецепторы, β - и γ -токсины снижают выброс АХ
<i>d</i> -Тубокурарин	Алкалоиды растений родов <i>Chondrodendron</i> и <i>Strihnus</i>	Блокатор <i>n_m</i> -холинорецепторов

Принимая во внимание расположение холинергических нейронов и локализацию АХ-рецепторов в организме, можно выделить следующие биологические эффекты, опосредуемые АХ:

1) обеспечение работы внутренних органов – реализуется благодаря использованию АХ в качестве нейромедиатора в ганглиях вегетативной нервной системы (симпатических и парасимпатических). Так, АХ снижает частоту и силу сердечных сокращений, повышает секреторную и моторную активность кишки, расслабляет непроизвольный сфинктер мочевого пузыря, способствуя мочеотведению, сокращает гладкие мышцы бронхоиол и глаза (сфинктер радужки) и т. п.;

2) участие в работе нейронных систем мозга – головной мозг относительно богаче *m*-холинорецепторами, а в спинном мозге преобладают *n*-холинорецепторы. Никотин в малых концентрациях оказывает умеренное возбуждающее действие на нейроны гиппокампа и коры больших полушарий, в то время как в высоких концентрациях угнетает работу холинергических систем. В ЦНС ацетилхолин вовлечен в контроль двигательной активности и процессов, связанных с обучением и памятью. Дисфункция холинергической системы наблюдается при нейродегенеративных заболеваниях, в частности при болезни Альцгеймера. При этом уменьшается активность АХЭ в нейронах коры больших полушарий, гиппокаппа и миндалины, снижается биосинтез АХ и обратный захват

холина, отмечается разрушение холинергических нейронов базальных ядер и уменьшение количества *n*-холинорецепторов в нейронах гиппокампа. В ходе развития болезни Паркинсона отмечается гиперактивность нейронов полосатого тела, как следствие – снижение активности дофаминергических структур среднего мозга, а при хорее Хантингтона, напротив, потеря нейронов *corpus striatum*;

3) обеспечение нервно-мышечной передачи – иннервация поперечно-полосатой мускулатуры осуществляется отростками холинергических нейронов передних рогов спинного мозга или двигательных ядер черепно-мозговых нервов. Рецепторы концевых пластинок относятся к n_m -холинорецепторам. Их аутоиммунная дегенерация приводит к развитию миастении (*Myastenia gravis*), выражающейся в мышечной слабости вследствие нарушения холинергической передачи, а антихолинэстеразные вещества обладают выраженным терапевтическим действием у больных с данным заболеванием.

ГИСТАМИН: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Основным источником гистамина служат базофильные лейкоциты и тучные клетки, выделяющие данное вещество в ответ на действие различных аллергенов. Гистамин является классическим представителем «тканевых» гормонов.

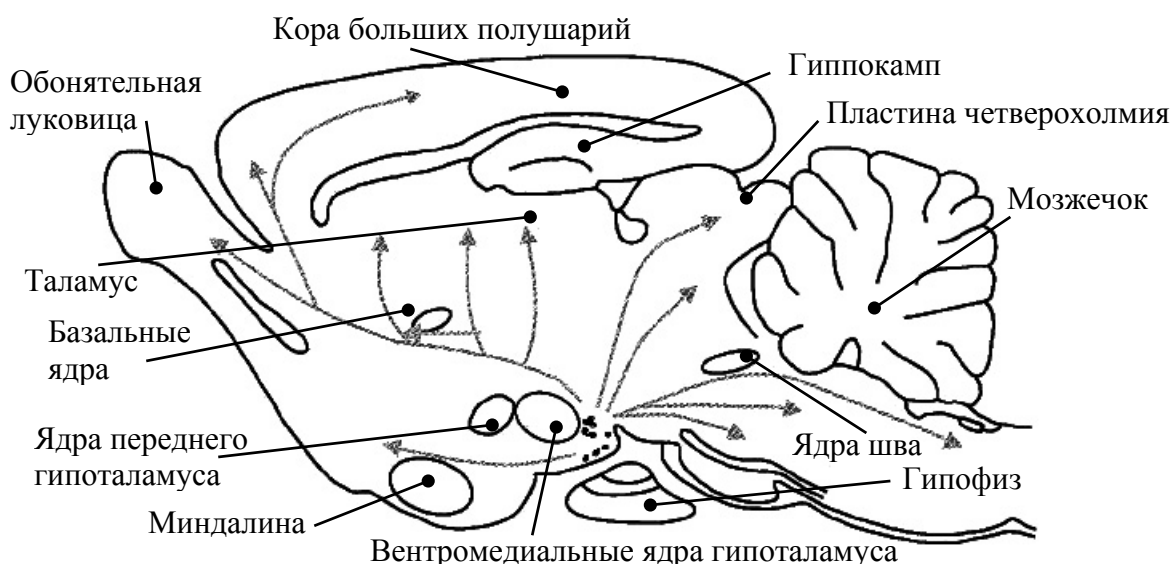


Рис. 73. Распределение гистаминергических нейронов
и их связи в мозге крысы

Биологическая активность гистамина была продемонстрирована Г. Дэйлом в начале XX в. К 1940 г. сложилось мнение, что гистамин выполняет нейромедиаторные функции, а не только опосредует протекание аллергических реакций. Этому способствовала его идентификация в ЦНС. При этом серотонин не способен проникать через гематоэнцефалический барьер, представляя собой нейромедиатор *per se*.

В ЦНС гистаминаргические нейроны расположены (рис. 73) в ядрах серого бугра и сосцевидных тел гипоталамической области промежуточного мозга. Их коллатерали достигают районов конечного мозга (кора больших полушарий и гиппокамп), таламуса, ствола мозга (центральное серое вещество среднего мозга, ядро солитарного тракта).

В мозге гистамин также содержится в тучных клетках интерстиция. При этом период полураспада в них гистамина вдвое больше периода полураспада в нейронах. Предполагается, что тучные клетки интерстиция вовлечены в регуляцию проницаемости стенки кровеносных сосудов.

МЕТАБОЛИЗМ ГИСТАМИНА

Гистамин образуется (рис. 74) в результате декарбоксилирования аминокислоты L-гистидина под действием *L*-гистидин-декарбоксилазы.

Ее активность служит лимитирующим фактором накопления гистамина в тканях. Время полураспада синтезированного нейронного гистамина составляет около 30 минут.

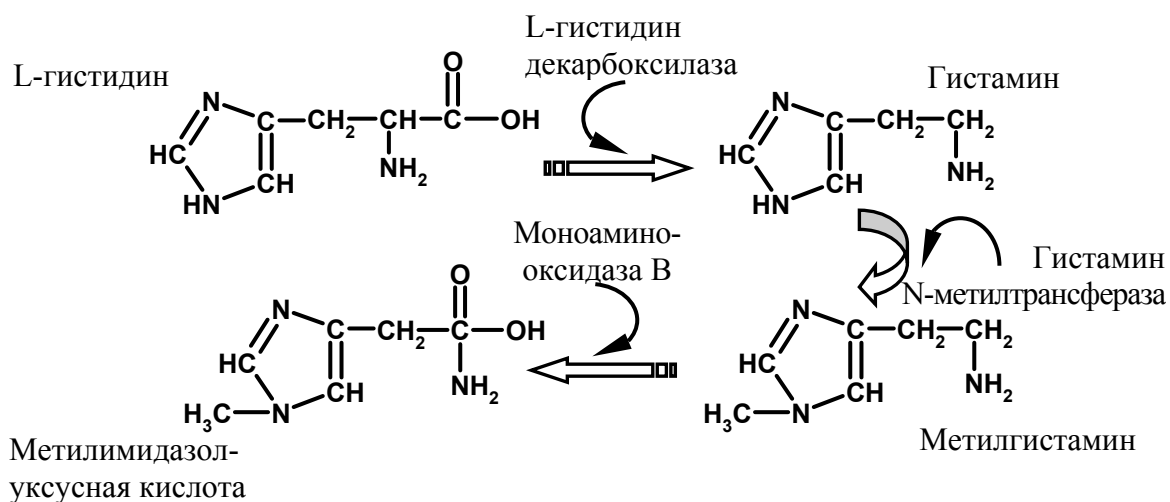


Рис. 74. Метаболизм гистамина

Известно, что под действием седативных препаратов обновление нейронной фракции гистамина замедляется, а стимуляция NMDA-рецепторов и μ -опиоидных рецепторов, напротив, усиливает этот процесс.

Гистамин накапливается в синаптических везикулах посредством механизма с выраженной чувствительностью к действию резерпина и высвобождается из нервных терминалей Ca^{2+} -зависимым образом. Инактивация гистамина происходит посредством широко распространенного фермента – *гистамин N-метилтрансферазы* с последующим окислением и деаминарованием метилгистамина до имидазолуксусной кислоты при помощи моноаминоксидазы В.

В настоящий момент не известны механизмы высокоаффинного обратного захвата гистамина в нейроны.

ГИСТАМИН: РЕЦЕПТОРЫ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРЬ КЛЕТКИ

Выделяют три подтипа гистаминовых рецепторов на основании их фармакологических свойств (табл. 5), локализации в области синапса и опосредуемых биологических эффектов.

Таблица 5

Агонисты и антагонисты гистаминергической передачи

Тип рецептора	H ₁	H ₂	H ₃
Агонист	(трифлюорометил-фенил)-Гистамин	Импромидин	(R)- α -Метилгистамин
Антагонист	Мепирамин	Циметидин	Тиоперамид

Все они принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белками (метаботропные рецепторы):

1) H₁-рецепторы – представляют собой гликопротеин из 490 аминокислотных остатков, расположенный на мембране постсинаптических клеток. Наибольшая плотность H₁-рецепторов отмечена в таламусе, пирамидальном слое гиппокампa, а также слое клеток Пуркинье в мозжечке. Действие гистамина реализуется посредством увеличения продукции цАМФ и концентрации внутриклеточного кальция.

Антагонисты этой группы рецепторов относятся к группе антигистаминовых препаратов, успешно используемых при терапии аллергических заболеваний. К сожалению, проникая через гематоэнцефалический барьер, они оказывают нежелательное побочное седативное действие, связанное с блокадой гистаминовых рецепторов мозга;

2) H₂-рецепторы – это гликопротеин, состоящий из 358 аминокислотных остатков и демонстрирующий 40 % гомологию с H₁-рецепторами. Они также расположены на постсинаптической мембране нейронов хвостатого ядра, скорлупы, миндалины и коры больших полушарий, а также клеток глии. Поскольку H₂-рецепторы связаны с G_s-белками, то их активация приводит к увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ. Большинство селективных антагонистов H₂-рецепторов не способно пересекать гематоэнцефалический барьер;

3) H₃-рецепторы – их выделение в отдельную группу проведено на основании фармакологических свойств. Они располагаются в мембране пресинаптических терминалей (ауторецепторы), участвуя в регуляции синтеза и выделения гистамина. В то же время их активация приводит к торможению секреции других нейромедиаторов – АХ, дофамина, серотонина и норадреналина. H₃-рецепторы обнаружены в участках лобной доли коры, базальных ядрах и *substantia nigra* среднего мозга. Внутриклеточные эффекты обусловлены активацией G_i-белков.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГИСТАМИНА

Гистамин является основным медиатором процессов воспаления и аллергических реакций в организме. Выделяемый нейронами гистамин участвует в регуляции мозгового кровообращения и проницаемости стенок кровеносных сосудов мозга.

Подтверждено участие гистамина в контроле сна и бессонницы, его вовлечение в регуляцию энергетического баланса, температуры тела, потребления пищи, а также различных эмоциональных состояний вследствие обширной гистаминергической иннервации компонентов лимбической системы. Значительное уменьшение числа гистаминергических нейронов отмечается при развитии болезни Альцгеймера.

|| Некоторые изменения поведения под действием диэтиламида лизергиновой кислоты (LSD) частично обусловлены блокадой H₂-рецепторов.

Активация H₁- и H₂-рецепторов сердечно-сосудистой системы приводит к выраженным изменениям ее работы. Так, увеличивается частота сердечных сокращений (H₂), происходит вазодилатация, а в сосудах микроциркуляторного русла, вследствие сокращения актиновых филаментов эндотелиальных клеток, приводящего к увеличению просвета между последними, наблюдается повышение их проницаемости (H₁). Гистамин вызывает сокращение гладких мышц кишечника и сильный бронхоспазм,

однако он не оказывает значительного действия на гладкую мускулатуру глаза и мочеполового тракта. Известно, что гистамин стимулирует желудочную секрецию посредством активации H_2 -рецепторов париетальных клеток желудка.

СЕРОТОНИН: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) представляет собой биогенный амин и наряду с катехоламинами относится к группе моноаминовых нейромедиаторов.

В 1947 г. было открыто вещество, обладающее вазоконстрикторными свойствами, названное серотином (от *serum* – сыворотка и *vasotonic* – вазотонический), идентифицированное (1951) с энтерамином, известным стимулятором гладких мышц кишечника (у млекопитающих до 90 % всего серотонина находится в энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта). Схожесть эффектов серотонина и LSD заставила предположить его центральное действие, но только развитие флуоресцентных и иммуногистохимических методов позволило (в 60-е гг. XX в.) идентифицировать серотонин в качестве нейромедиатора.

В ЦНС серотонинергические нейроны (рис. 75) преимущественно локализованы в верхних отделах ствола мозга, вдоль его центральной оси в т. н. ядрах шва (*raphe nuclei*).

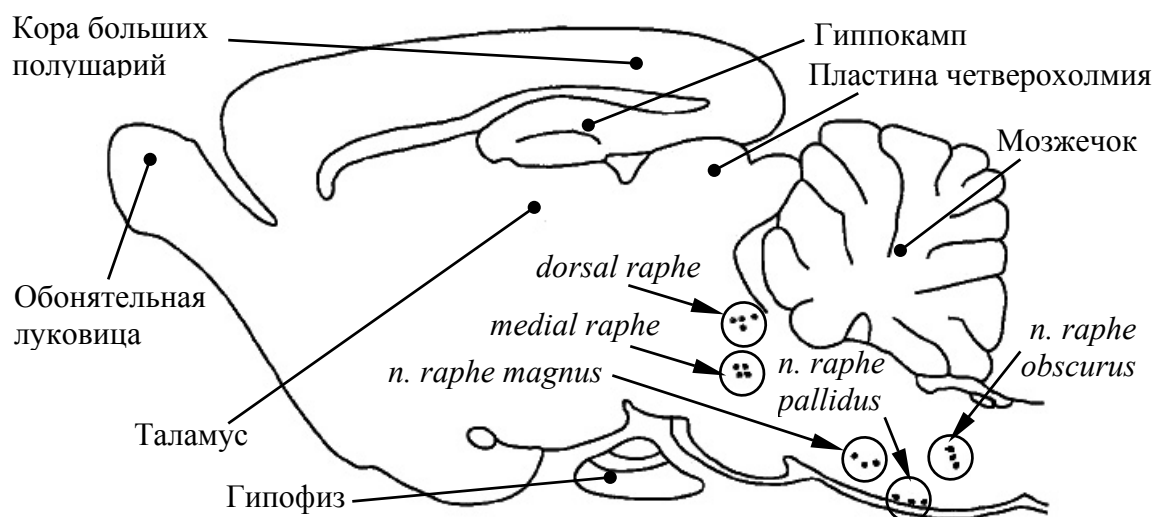


Рис. 75. Распределение серотонинергических нейронов в мозге крысы

Изначально насчитывали 9 серотонин-содержащих ядер (B1–B9), объединенных в две группы в зависимости от их положения: *нижнюю* (B1–B4) – в начальных отделах ствола и *верхнюю* (B5–B9) – расположенную ростральнее.

Отростки серотонинергических нейронов обнаруживаются в мозге почти повсеместно (кора больших полушарий, гиппокамп, базальные ядра конечного мозга, верхние холмики среднего мозга, студенистое вещество и передние рога спинного мозга), хотя их плотность и не особенно велика.

МЕТАБОЛИЗМ СЕРОТОНИНА

Исходным составляющим для синтеза серотонина является незаменимая кислота триптофан, поступающая в организм с пищей. Дальнейшее ее проникновение в ткань мозга, т. е. пересечение гематоэнцефалического барьера, происходит посредством облегченного транспорта. При этом триптофановый транспортер не обладает высокой степенью специфичности, будучи способным к переносу и других нейтральных аминокислот – фенилаланина, метионина, лейцина и лизина, выступающих в роли конкурентных ингибиторов синтеза серотонина. Поступление в нейроны также контролируется работой неспецифического переносчика для нейтральных аминокислот. В присутствии кислорода и донора водорода (тетрагидроптерина) индольное кольцо триптофана гидроксилируется по C5-положению под действием *триптофангидроксилазы* до 5-гидрокситриптофана (5-НТР). Эта стадия является лимитирующей при синтезе серотонина. В дальнейшем 5-НТР декарбоксилируется при участии декарбоксилазы ароматических аминокислот непосредственно до серотонина (рис. 76).

В отличие от триптофангидроксилазы, декарбоксилаза ароматических аминокислот встречается не только в серотонинергических нейронах. Она также катализирует реакцию превращения дигидроксифенилаланина (ДОФА) в дофамин в соответствующих клетках (см. гл. 9).

Серотонин переносится в синаптические пузырьки при помощи общего для всех моноаминов транспортера (VMAT), структурно и функционально сходного с таковым для ацетилхолина. Инактивация серотонина в синаптической щели происходит в основном посредством обратного захвата. Na^+/Cl^- -зависимый котранспортер для серотонина (SERT) состоит из 12 трансмембранных доменов, N- и C-терминалы ориентированы в цитозоль, а на внеклеточных участках обнаружено несколько мест для гликозилирования. Кроме этого, существует механизм ферментативного распада серотонина до 5-гидроксииндол-ацетальдегида (при участии моноаминоксидазы А) и последующего его окисления до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (при участии альдегиддегидрогеназы), которая выводится с мочой из организма.

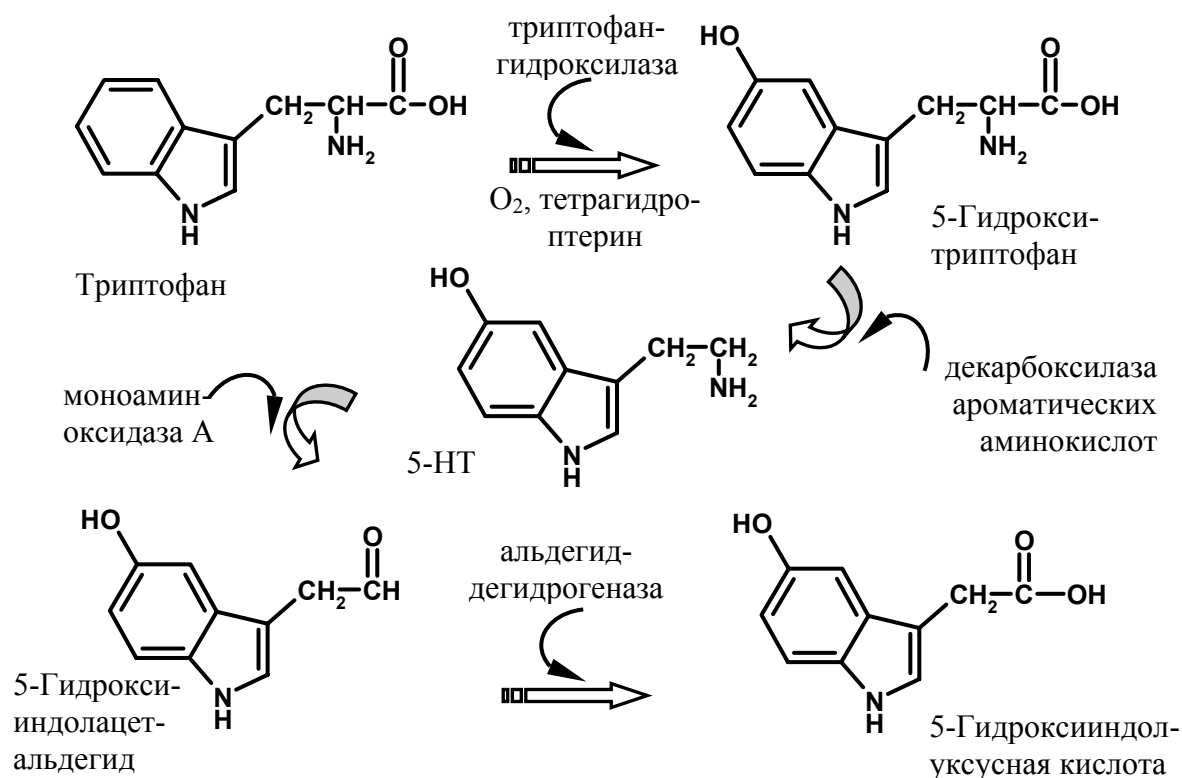


Рис. 76. Метаболизм серотонина

Действие многих антидепрессантов, таких как дезипрамин, флуоксетин (prozak) или пароксетил (рахil), основано на ингибировании обратного захвата серотонина в синаптической щели.

СЕРОТОНИН: РЕЦЕПТОРЫ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРЬ КЛЕТКИ

Существует семь подтипов (2005 г.) рецепторов к серотонину, выделенных на основании результатов молекулярного клонирования (дальнейшее их разделение основано на структурных различиях и фармакологических свойствах). К ним относят:

1) 5-НТ₁-рецепторы – в свою очередь состоят из семи подтипов (А, В, D, E, F, Р, S). Для них характерно высокое сродство к серотонину. Семейство 5НТ₁-рецепторов относится к метаботропным рецепторам, связанным с G_o- и G_i-белками, т. е. их стимуляция приводит к снижению уровня цАМФ внутри клетки. Этой группой опосредуются различные тормозные эффекты, обусловленные увеличением калиевой или снижением кальциевой проводимостей. Подтипы А–Е встречаются в различных областях головного мозга, подтип Р характерен для гладкомышечных клеток кишечника, а подтип S отмечен для нейронов спинного мозга.

Первоначально выделенные рецепторы 5-HT_{1C}-подтипа впоследствии были отнесены к семейству 5-HT₂-рецепторов.

Аминокислотная последовательность 5-HT₁-рецепторов насчитывает от 365 (5-HT_{1E}) до 422 (5-HT_{1A}) остатков с не менее чем 50 % гомологией между подтипами. Для D-подтипа, кроме того, характерно наличие двух изоформ. Рецепторы 5-HT_{1A} и 5-HT_{1D} человека относятся к ауторецепторам (у крыс это подтипы 5-HT_{1A} и 5-HT_{1B}), расположенным преимущественно на теле и дендритах серотонинергических нейронов. Их активация приводит к уменьшению выброса серотонина в синаптическую щель. Остальные подтипы серотониновых рецепторов локализованы на участках постсинаптической мембраны;

2) 5-HT₂-рецепторы – представляют собой гликопротеины, состоящие из 460–480 аминокислотных остатков в зависимости от подтипа (А, В, С). Это рецепторы постсинаптических мембран, связанные с G_q-белками и активацией фосфолипазы С. Их стимуляция вызывает медленно развивающееся возбуждение (деполяризацию мембраны), опосредуемое снижением калиевой проводимости и увеличением неспецифической ионной проводимости;

3) 5-HT₃-рецепторы – в отличие от всех остальных серотониновых рецепторов относятся к ионотропным рецепторам. Рецептор состоит из пяти субъединиц по 487 аминокислотных остатков в каждой, организованных в четыре трансмембранных домена (рис. 77).

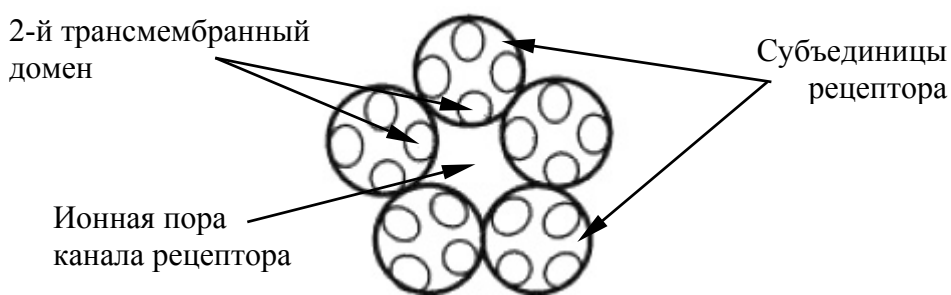


Рис. 77. Субъединичное строение 5-HT₃-рецептора

Его активация приводит к увеличению проницаемости мембраны для Na⁺ и K⁺, т. е. деполяризации соответствующего нейрона. Рецепторы 5-HT₃ характерны исключительно для нейронов ЦНС, где их плотность максимальна в продолговатом мозге (*area postrema*), обонятельной коре и миндалине;

4) 5-HT₄-рецептор – известно два рецептора такого подтипа, возникающих вследствие альтернативного сплайсинга исходной кодирующей их последовательности РНК. В обоих случаях речь идет о метаботропных рецепторах, ассоциированных с G_s-белком. Активация аденилатциклазы вызывает увеличение уровня цАМФ и последующее уменьшение калиевой проводимости, т. е. опосредует возбуждение. Характерны преимущественно для нейронов гиппокампа;

5) 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇-рецепторы – относятся к метаботропным рецепторам, контролирующим посредством G-белка аденилатциклазную систему. Были идентифицированы в результате молекулярного клонирования. Демонстрируют различную степень гомологии с другими семействами серотониновых рецепторов – от 40 (5-HT₆) до 88 (5-HT₅) %, будучи образованными, в зависимости от типа, 350–450 аминокислотами. Области локализации – различные отделы головного мозга.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕРОТОНИНА

Серотонинергические системы мозга вовлечены в модуляцию различных биологических функций, прежде всего благодаря широкому представительству рецепторов в различных областях ЦНС. Наибольшему влиянию подвержены половое и пищевое поведение, эмоциональное состояние организма, процессы обучения и памяти. Так, распределение серотониновых рецепторов в мозге различно у мужских и женских особей. Повышенная экспрессия 5-HT_{2C}-рецепторов вызывает увеличение массы тела, а применение их селективного антагониста (кетансерина) вызывает снижение аппетита. Отмечено участие серотонинергических систем и в механизмах модуляции болевых ощущений (ноницепции). Серотонин связан с развитием состояний тревоги, депрессии и различных фобий, обусловленных снижением его уровня в мозге. Их успешная терапия связана с использованием ингибиторов обратного захвата серотонина (трициклических антидепрессантов). Частичная гибель серотонинергических нейронов коры наблюдается при болезни Альцгеймера.

Серотонин является мощным сосудосуживающим агентом (за исключением сосудов сердца и скелетных мышц), благодаря влиянию на гладкомышечные клетки их стенок. Он повышает тонус мускулатуры желудочно-кишечного тракта и усиливает перистальтику, но почти не влияет на секрецию пищеварительных желез. Влияние на гладкие мышцы дыхательных и мочевыводящих путей выражено слабо.

ГЛАВА 10

НЕЙРОМЕДИАТОРЫ: КАТЕХОЛАМИНЫ И АМИНОКИСЛОТЫ

КАТЕХОЛАМИНЫ: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

К группе катехоламинов относятся вещества, содержащие бензольное кольцо с двумя гидроксильными группами и один этиламин, т. е. они являются моноаминами, – дофамин, норадреналин и адреналин. Их также объединяет «общность происхождения» – предшественником служит аминокислота тирозин.

Успешный химический синтез дофамина был осуществлен в 1910 г. Тем не менее это вещество долгое время считалось метаболическим предшественником норадреналина, пока не было обнаружено, что нейроны некоторых областей мозга (*substantia nigra* и *corpus striatum*) содержат дофамин и не содержат норадреналина. В 1989 г. дофамин был обнаружен и в периферической нервной системе.

Еще в 1921 г. О. Лёви, исследуя нервную регуляцию деятельности сердца, обнаружил вещество, увеличивающее частоту и силу сокращений, и назвал его «*accelerance*», т. е. «усилителем». Впоследствии (1936) оно было идентифицировано как адреналин. Поскольку норадреналин является предшественником синтеза адреналина, то вплоть до 40-х гг. XX в. его не считали «самостоятельным» нейромедиатором.

Разработка Б. Фалком и Н. Хилларпом (B. Falck, N. Hillarp, 1962) одноименного флуоресцентного метода, а также использование иммуногистохимических методов позволили выявить распределение моноаминергических нейронов в организме. Результаты проведенной работы показали, что норадреналинергические нейроны преимущественно сосредоточены в ЦНС, а адренергические – на периферии.

Дофамин. Дофаминергические нейроны ЦНС условно разделены на три группы, выделяемые на основании длины отростков этих клеток:

1) нейроны с ультракороткими проекциями – амакрино-подобные клетки сетчатки и некоторые нейроны обонятельных луковиц, характеризующиеся наличием слабо развитых отростков (дендритов);

2) нейроны с короткими проекциями – в свою очередь распадаются на три дополнительных подтипа (рис. 78, а):

- *нейроны дугообразных ядер гипоталамуса* (A_{12}), дающие отростки к гипофизу и срединному возвышению гипоталамуса;

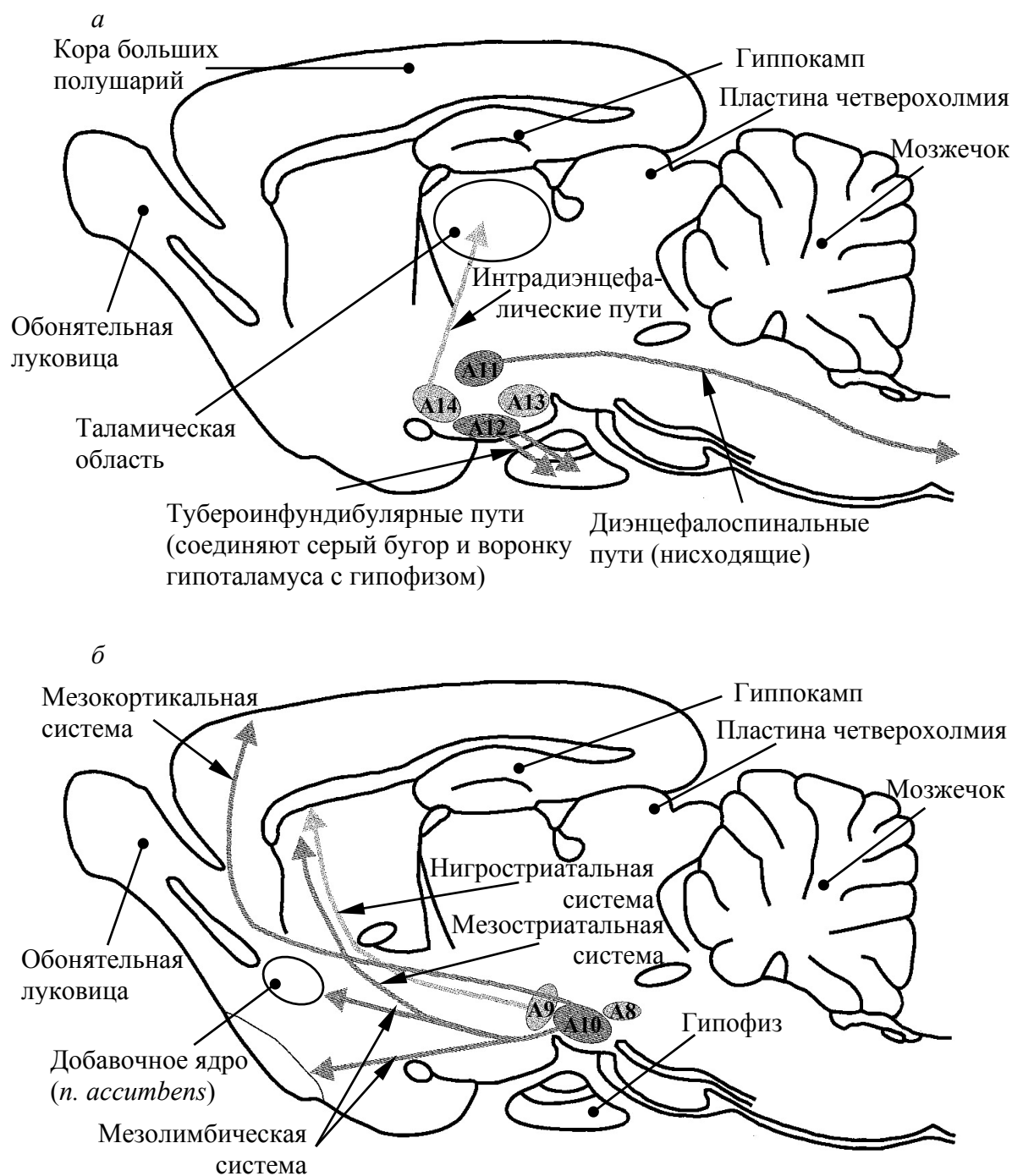


Рис. 78. Распределение дофаминергических нейронов с короткими связями (а) и дофаминергических нейронов с длинными проекциями (б), а также направление хода их отростков и области иннервации в мозге крысы

- *внутренние нейроны промежуточного мозга*: нейроны заднего гипоталамуса (A_{11}), *zona incerta* (A_{13}), нейроны, прилежащие к паравентрикулярному ядру гипоталамуса (A_{14});

- нейроны ядер солитарного тракта и серого вещества, расположенного вокруг водопровода среднего мозга;

3) нейроны с длинными проекциями – расположены в районе среднего мозга (рис. 78, б): позади красного ядра (A_8), в черном веществе (A_9), нижней части покрышки (*ventral tegmental area*, A_{10}). Отсюда их проекции достигают неостриатума (хвостатое ядро и скорлупа), лимбической коры и ряда нижележащих структур лимбической системы (перегородка мозга, прилежащее ядро и миндалина), образуя нигростриатальную, мезокортикальную и мезолимбическую системы.

Проекции групп A_8 – A_{10} к добавочному ядру образуют *мезостриатальную* дофаминергическую систему, а общие проекции этих нейронов в промежуточном мозге формируют *мезотэлленцефальную* дофаминергическую систему.

Помимо этого, указанные нейроны осуществляют иннервацию и других районов мозга. Отмечено также существование и нисходящих дофаминергических проекционных путей.

Норадреналин и адреналин. Нейроны, содержащие норадреналин, сконцентрированы в области моста заднего мозга (рис. 79).

Основное место залегания – голубое пятно (*locus coeruleus*), в котором сосредоточена примерно половина (3000) всех норадреналинергических нейронов мозга. Они также представлены в *locus subcoeruleus* (A_5 , A_6 , A_7), ретикулярной формации (A_1), ядрах солитарного тракта (A_2).

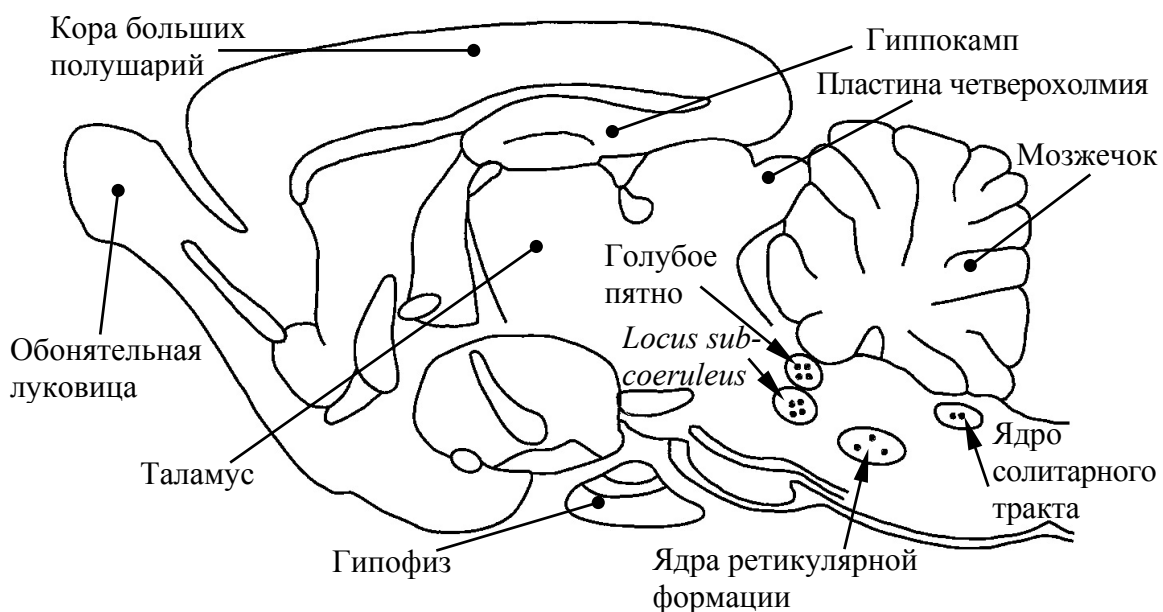


Рис. 79. Распределение норадреналинергических нейронов в мозге крысы

Для последних двух участков мозга характерно наличие адренергических нейронов – группы C_1 и C_2 соответственно.

Аксоны клеток голубого ядра направляются в кору больших полушарий, гиппокамп, таламус, гипоталамус, мозжечок и спинной мозг, при этом ипсилатеральные проекции преобладают над контрлатеральными. Терминали групп A_1 и A_2 направляются в таламус и миндалину. Отростки адренергических нейронов достигают некоторых гипоталамических ядер, спинного мозга.

Большинство симпатических постганглионарных волокон выделяют норадреналин, а основным источником адреналина на периферии служат хромоаффинные клетки мозгового вещества надпочечников, являющиеся гомологами постганглионарных симпатических нейронов. Некоторые периферические симпатические волокна выделяют и дофамин.

МЕТАБОЛИЗМ КАТЕХОЛАМИНОВ

Предшественники биосинтеза катехоламинов – аминокислоты фенилаланин и тирозин (может быть получен из фенилаланина под действием фенилаланингидроксилазы) – способны легко проникать через гематоэнцефалический барьер. Синтез дофамина из тирозина происходит в две стадии (рис. 80).

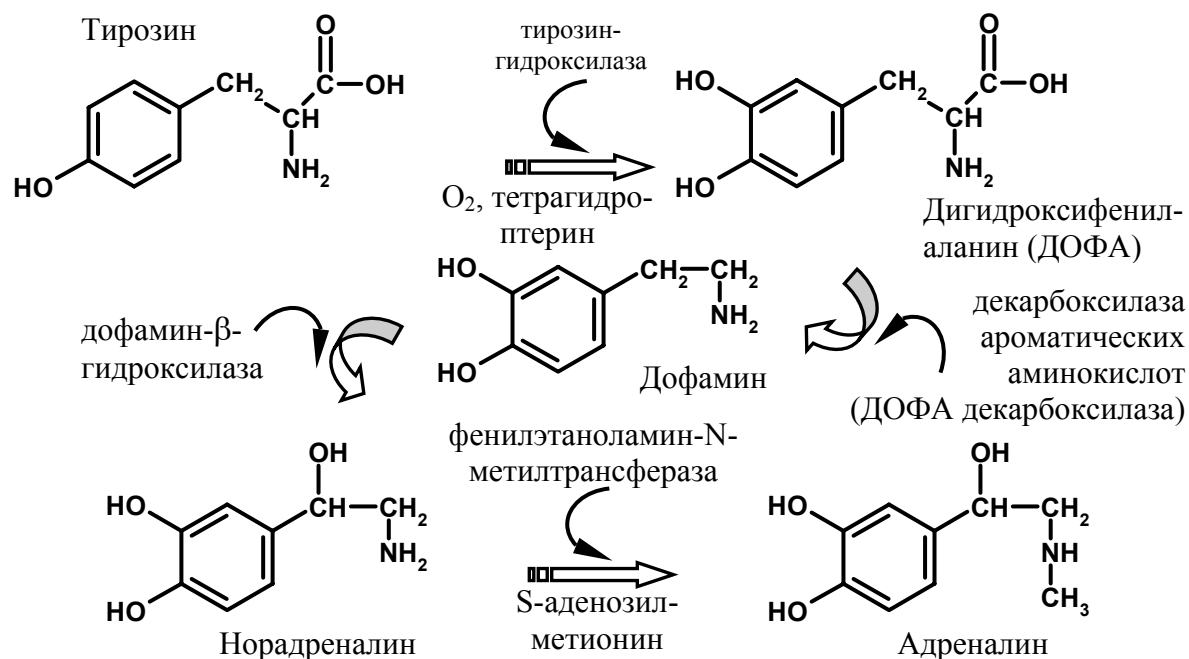


Рис. 80. Биосинтез катехоламинов

На первой стадии, лимитирующей скорость реакции, тирозин превращается в дигидроксифенилаланин (ДОФА) под действием *тирозингидроксилазы*.

В качестве кофакторов тирозингидроксилаза использует тетрагидроптерин и кислород и не является субстрат-зависимым ферментом – увеличение концентрации тирозина не приводит к увеличению продукции ДОФА. Ее активность регулируется по принципу отрицательной обратной связи – повышенные концентрации катехоламинов ингибируют активность тирозингидроксилазы.

Впоследствии декарбоксилирование ДОФА под действием цитозольной ДОФА-декарбоксилазы (декарбоксилазы ароматических аминокислот) приводит к образованию дофамина. При этом повышение концентрации ДОФА увеличивает продукцию дофамина. Благодаря транспортеру биогенных аминов (VMAT) дофамин поступает в синаптические везикулы.

Характерной особенностью дофаминергических нейронов является наличие многочисленных варикозных расширений их отростков, как дендритов, так и аксонов (аксоны *en passant*). Один нейрон нигростриатальной системы способен образовывать до 100 000 (!) таких расширений, многократно увеличивая количество областей иннервации.

Дофамин под действием *дофамин-β-гидроксилазы* превращается в норадреналин. Этот фермент является специфическим маркером адренергических нейронов, позволяя отличать их при помощи иммуногистохимических методов от дофаминсодержащих клеток. Дофамин-β-гидроксилаза может быть ассоциирована с мембраной синаптических пузырьков. В этом случае синтез норадреналина происходит после поступления дофамина в везикулы. В противоположность этому норадреналин, синтезированный в цитозоле, переносится в синаптические пузырьки посредством транспортера.

В некоторых клетках норадреналин может подвергаться дальнейшему превращению в адреналин под действием *фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы* (донором метильной группы выступает S-аденозилметионин). В качестве комедиатора катехоламинергические везикулы могут содержать АТФ.

В биосинтезе катехоламинов существуют и другие пути, приводящие к образованию конечных продуктов (норадреналина и адреналина). У человека они не имеют функционального значения, но у ряда животных некоторые промежуточные метаболиты (например, октопамин) могут выступать в качестве нейромедиатора.

Выделение катехоламинов соответствует классической для нейромедиаторов схеме. Их избыток в синаптической щели удаляется посредством обратного захвата. Переносчик для дофамина (DAT) представляет собой гликопротеин молекулярной массой 70 кДа (619 аминокислот), ор-

ганизованный в 12 трансмембранных доменов и использующий концентрационный градиент Na^+ и Cl^- для симпорта дофамина в клетку – 80 % высвобожденного дофамина подвергается обратному захвату. Гликопротеин не находится в активной зоне синапса, но его расположение ограничено областью пресинаптических терминалей.

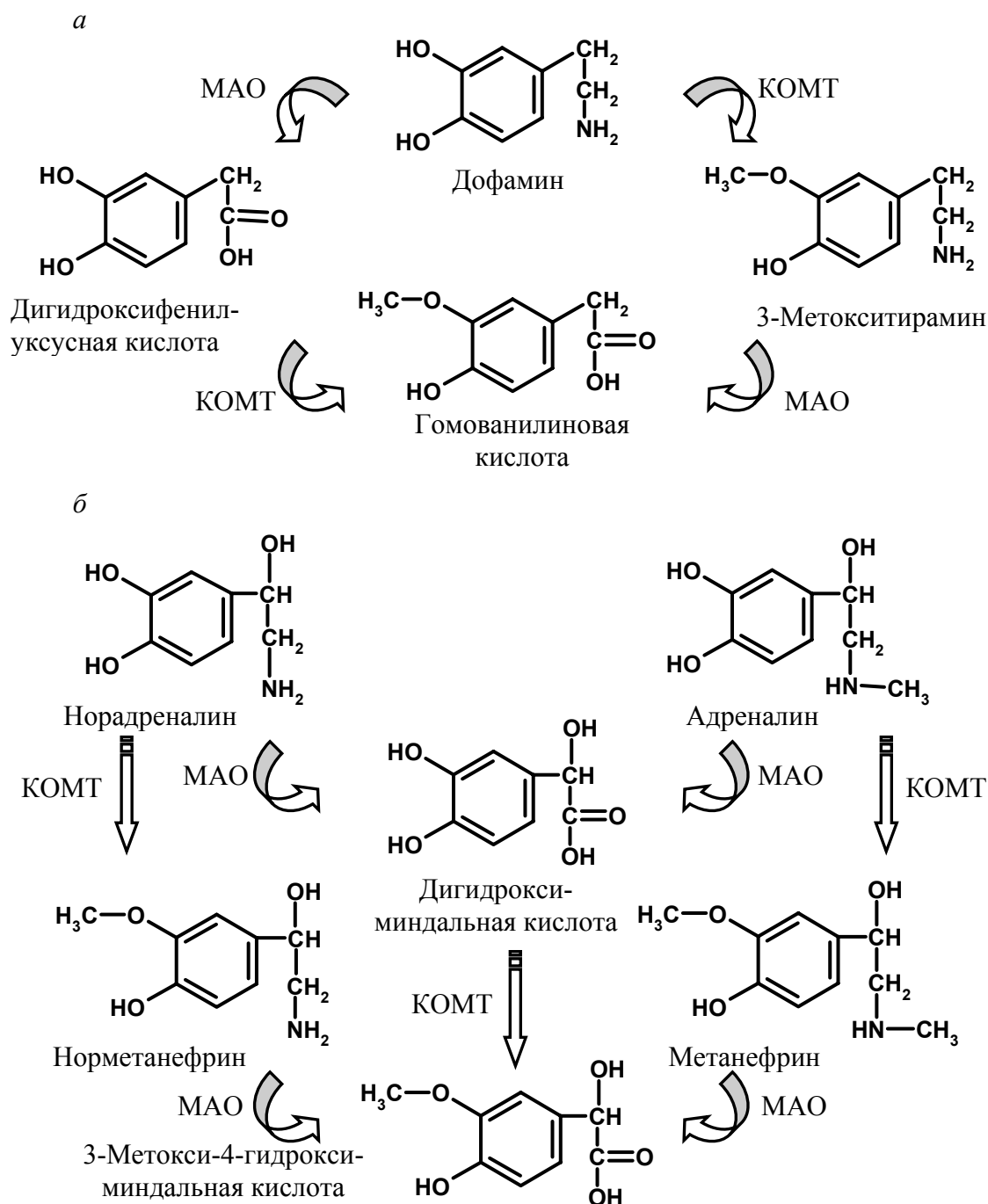


Рис. 81. Ферментативный распад катехоламинов:
а – дофамина; б – норадреналина и адреналина

Обратный захват норадреналина возможен благодаря наличию специального переносчика (NET), сходного с таковым для дофамина как структурно, так и по механизму переноса нейромедиатора.

Известны и ферментативные системы распада катехоламинов – *моноаминоксидаза* (МАО), расположенная внутри митохондрий, и цитозольная *катехол-О-метил-трансфераза* (КОМТ). Под их действием (рис. 81) дофамин в итоге преобразуется в гомованилиновую кислоту, а норадреналин (адреналин) в 3-метокси-4-гидроксиминдальную кислоту.

Блокаторы переносчиков катехоламинов обладают выраженным фармакологическим действием. Так, резерпин ингибирует работу везикулярного транспортера для дофамина, постепенно приводя к истощению депо катехоламинов в клетке, а кокаин и амфетамины инактивируют переносчики, ответственные за обратный захват катехоламинов – как следствие пролонгируется их действие на мембрану постсинаптической клетки, что лежит в основе психостимулирующего эффекта антидепрессантов.

КАТЕХОЛАМИНЫ: РЕЦЕПТОРЫ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРЬ КЛЕТКИ

Рецепторы к дофамину. Все дофаминергические рецепторы относятся к метаботропным рецепторам с наличием характерных семи трансмембранных доменов. На основании биохимических и фармакологических свойств пять типов дофаминергических рецепторов (D_1 – D_5) разделяют на две группы:

1) D_1 -группа – характеризуется наличием короткой третьей внутриклеточной петли и длинной С-терминалью в структуре рецептора. Они связаны с G_s -белками и активируют аденилатциклазу. Рецепторы D_1 -группы расположены на постсинаптической мембране. К ним относятся собственно D_1 -рецепторы (1А) и D_5 -рецепторы (1В), состоящие из 446 и 476 аминокислот соответственно. D_1 -рецепторы находятся на мембране *молодых* нейронов полосатого тела, миндалины, таламуса, гипоталамуса, среднего мозга и ствола мозга и не встречаются у зрелых нейронов. Распространение высокоаффинных к дофамину D_5 -рецепторов ограничено областью гиппокампа и таламуса;

2) D_2 -группа – характеризуется наличием длинной третьей внутриклеточной петли и короткой С-терминалью в структуре рецептора. Они связаны с G_i -белками и ингибируют аденилатциклазу. К ней относятся собственно D_2 -рецепторы (2А), D_3 - и D_4 -рецепторы (2В и 2С), каждый из которых представлен несколькими изоформами.

D_2 -рецепторы относятся к ауторецепторам, расположенным на мембране нервных окончаний, где их активация приводит к уменьшению

выхода дофамина или на мембране отростков и/или тела клетки. В последнем случае их стимуляция вызывает усиление импульсации дофаминергических нейронов, т. е. увеличение выхода дофамина. Различные варианты сплайсинга кодирующей их образования молекулы РНК вызывают появление двух изоформ – короткой (D_{2S}) и длинной (D_{2L}), состоящих из 415 и 444 аминокислот, ответственных за развитие десенситизации. D_2 -рецепторы распространены в нейронах гиппокампа, полосатого тела, гипоталамуса, среднего и спинного мозга.

Характерной особенностью состоящего из 446 аминокислот D_3 -рецептора является его слабая взаимосвязь с G-белком. Этот подтип широко представлен в нейронах голубого пятна, полосатого тела и черного вещества.

D_4 -рецептор состоит из 368 аминокислот (у крыс) и дополнительно экспрессируется в нейронах мозжечка.

Рецепторы к норадреналину (адреналину) – известны как адренорецепторы. На существование двух типов адренорецепторов (α и β) указал Р. Алквист (R. Ahlquist, 1948), выделивший их на основании различий в ряду активности адреномиметических средств (адреналин – норадреналин – изопротеренол). Все они относятся к метаботропным рецепторам, хотя и различаются по тому, какой вторичный посредник они используют.

Первый тип – **α -адренорецепторы**, характеризуются следующим рядом активности: адреналин \geq норадреналин \gg изопротеренол. В зависимости от типа G-белка, с которым они связаны, выделяют:

- **α_1 -адренорецепторы**: сильно восприимчивы к действию празосина. Представлены тремя подтипами – α_{1A} , α_{1B} и α_{1D} (ранее клонированный подтип α_{1C} оказался идентичным α_{1A}), каждый из которых связан с G_q -белком, стимуляция которого вызывает активацию фосфолипазы C и продукцию инозитолтрифосфата и диацилглицерола. Расположены на постсинаптической мембране;

- **α_2 -адренорецепторы**: известно три подтипа – α_{2A} , α_{2B} и α_{2C} (у крыс и мышей, кроме того, обнаружен α_{2D} -подтип, демонстрирующий высокую степень гомологии с α_{1A} -подтипом человека). Ранее считалось, что α_2 -адренорецепторы связаны с G_i -белком, однако это оказалось справедливым лишь в отношении α_{2C} -подтипа, в то время как стимуляция рецептора α_{2B} -подтипа, напротив, приводит к активации аденилатциклазы, а рецепторы α_{2A} -подтипа ингибируют образование цАМФ при низких концентрациях агониста и увеличивают его продукцию при высоких концентрациях адреналина, а также способны стимулировать некоторые протеинкиназы. Оказалось, что α_2 -адренорецепторы преимущественно локализованы на пресинаптической мембране нейронов (ауторецепторы).

Второй тип – **β -адренорецепторы**, характеризуются следующим рядом активности: изопротеренол > адреналин \geq норадреналин. Изначально были выделены два подтипа: β_1 - и β_2 -подтипы, различающиеся по степени сродства к норадреналину и адреналину. Так, β_1 -рецепторы имеют к этим веществам одинаковое сродство, а для β_2 -рецепторов характерен более высокий аффинитет к адреналину. Кроме того, рецепторы первого подтипа экспрессируются преимущественно в нейронах, тогда как β_2 -рецепторы характерны и для клеток нейроглии.

Методом молекулярного клонирования был обнаружен и рецептор β_3 -подтипа, обладающий весьма слабым сродством к природным агонистам (атипичный β -адренорецептор). Все β -адренорецепторы связаны с G_s -белками и подвержены десенситизации вследствие их фосфорилирования специфическими протеинкиназами.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КАТЕХОЛАМИНОВ

Дофамин вовлечен в регуляцию множества функций организма. В частности, неоспоримо участие дофаминергических систем мозга в модуляции артериального давления, когнитивных процессах, контроле тревожных состояний и, конечно же, двигательной активности. Именно nigro-стриатальная система ответственна за инициацию и контроль локомоторных проявлений жизнедеятельности.

Потеря дофаминергических нейронов среднего мозга (*substantia nigra*) приводит к развитию болезни Паркинсона, выражающейся в нарушении тормозного контроля за сокращением поперечно-полосатой мускулатуры. При этом гибнет не менее 80 % популяции нейронов, содержащих дофамин. Дефицит дофамина отмечен и при болезни Альцгеймера, а также при шизофрении. Напротив, гиперактивность дофаминергических систем мозга наблюдается при развитии маниакальных состояний и галлюцинаций. Модуляция автономных центров гипоталамуса под действием дофамина вызывает изменения в потреблении пищи и воды, гормонального статуса (из-за опосредованного действия на гипофиз).

Проекции нейронов голубого пятна входят в состав восходящей ретикулярной активирующей системы, регулирующей внимание, возбуждение и циркадные ритмы. На периферии адренергическая система обуславливает функционирование симпатического отдела вегетативной нервной системы, эффекты различных стрессорных воздействий на организм. Прежде всего это контроль за работой сердечно-сосудистой системы, а также влияние на промежуточный обмен – усиление глюкогенолиза в печени и др.

АМИНОКИСЛОТЫ: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Нейтральные (ГАМК и глицин) и *кислые* (глутамат и аспартат) аминокислоты присутствуют в высоких концентрациях в ЦНС, выступая в качестве полноправных нейромедиаторов. Первая группа относится к *тормозным*, а вторая – к *возбуждающим аминокислотам*.

γ-Аминomásляная кислота была открыта в 1883 г., однако только в середине 50-х гг. XX в. была доказана ее нейромедиаторная роль. Оказалось, что около 30 % синапсов в ЦНС являются ГАМК-ергическими, а сама ГАМК – основным тормозным медиатором в ЦНС.

Нейромедиаторная роль глицина была установлена на десять лет позже – в 1960–1970-х гг. До этого времени ему не придавали особого значения в процессах межклеточной сигнализации вследствие широкого распространения и примитивной химической структуры, считая глицин простым участником белкового метаболизма.

Схожая ситуация сложилась и по отношению к возбуждающим аминокислотам, долгое время считавшимся промежуточными метаболитами клетки. Так, высвобождение глутамата в центральных синапсах было доказано только в 1984 г., несмотря на то, что его нейромедиаторная роль в синапсах ряда беспозвоночных была установлена десятилетием раньше.

γ-Аминomásляная кислота (ГАМК). В некоторых областях мозга количество клеток, содержащих ГАМК, весьма велико. Так, около 95 % нейронов полосатого тела – это ГАМК-ергические нейроны. Они также широко представлены среди клеток бледного шара, ретикулярной части черного вещества среднего мозга, мозжечка (клетки Пуркинье), часто встречаются среди клеток таламуса, гиппокампа и коры больших полушарий. Многочисленные ГАМК-ергические терминалы подходят к нейронам бледного шара, ядрам верхних холмиков среднего мозга и ножкам мозга (рис. 82).

Глицин. В высоких концентрациях обнаруживается в спинном мозге, продолговатом мозге и мосту. В более низких концентрациях глицин обнаружен в мозжечке и переднем мозге.

В интернейронах задних рогов спинного мозга наблюдается ко-локализация ГАМК и глицина. Указанные нейромедиаторы выделяются и реализуют свое постсинаптическое действие одновременно.

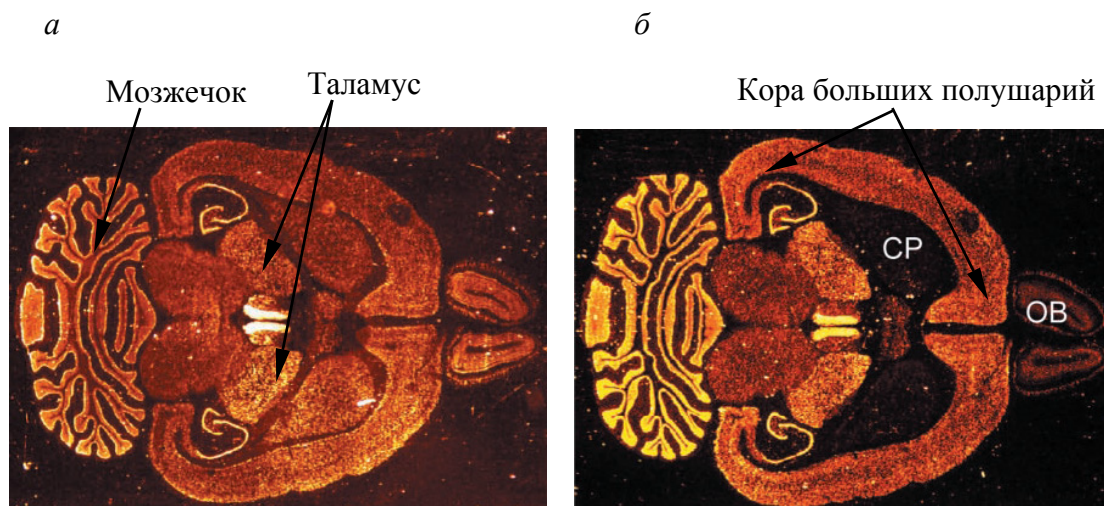


Рис. 82. Распределение ГАМК_B-рецепторов в мозге крысы (по В. Bettler et al., 2003):
 а – мРНК ГАМК_{B1}-рецепторов; б – мРНК ГАМК_{B2}-рецепторов.
 CP – хвостатое ядро и ограда; OB – обонятельная луковица.

Глутамат и аспартат. Наибольшее значение для организма имеет распространение глутаматергических нейронов в пределах ЦНС. Особенно широко они представлены в коре больших полушарий, откуда их проекции достигают гиппокампа, хвостатого ядра, миндалины, прилежащего ядра, верхних холмиков и красного ядра среднего мозга, ядер моста. Второе крупное скопление глутаматергических нейронов встречается в гиппокампе. Отсюда их отростки направляются к клеткам гипоталамуса, добавочного ядра и латеральной перегородки (рис. 83).

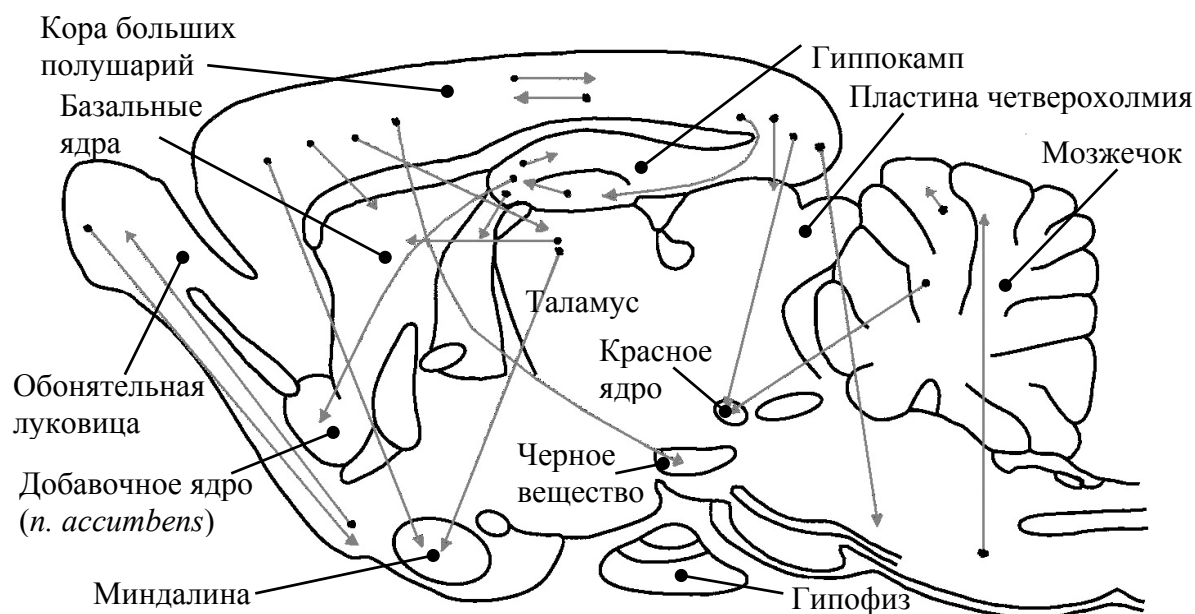


Рис. 83. Глутаматергические пути в мозге крысы

Распространение аспартатергических структур в мозге изучено слабо. Возможно участие аспартата в качестве медиатора в проекциях гиппокампальных нейронов.

МЕТАБОЛИЗМ ВОЗБУЖДАЮЩИХ И ТОРМОЗНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Метаболизм ГАМК. Она образуется при декарбоксилировании глутамата под действием *глутаматдекарбоксилазы* (GAD). Реакция протекает в присутствии пиридоксальфосфата (витамина В₆), выступающего в качестве кофактора. Существует две изоформы глутаматдекарбоксилазы, различающиеся по следующим признакам:

- *молекулярному весу*: GAD₆₅ (65 кДа) и GAD₆₇ (67 кДа), кодируемые двумя разными генами;
- *локализации внутри клетки*: GAD₆₅ преимущественно локализована в аксоне, а GAD₆₇ – в теле и дендритах нейрона;
- *сродству к пиридоксальфосфату*: низкое сродство характерно для GAD₆₅, ее активность может регулироваться доступностью этого кофактора. Высокое сродство GAD₆₇ позволяет этой изоформе фермента быть постоянно активной, обеспечивая тоническое высвобождение ГАМК. Ее регуляция осуществляется на уровне транскрипции.

Наличие двух изоформ глутаматдекарбоксилазы, активность которых регулируется посредством двух различных механизмов, позволяет осуществить тонкий контроль за уровнем ГАМК внутри клетки. ГАМК инактивируется за счет реакции трансаминирования с α -кетоглутаратом (α -КГ) под действием митохондриальной ГАМК-трансаминазы. В результате образуется глутамат и янтарный полуальдегид, превращающийся под действием одноименной дегидрогеназы в янтарную кислоту, которая утилизируется в цикле Кребса (рис. 84).

В синаптические пузырьки ГАМК поступает благодаря специфическому транспортеру, общему с глицином, состоящему из 10 трансмембранных доменов и использующему протонный градиент для «закачивания» медиатора в везикулы. Удаление ГАМК из синаптической щели происходит посредством обратного захвата благодаря работе переносчиков (GAT), расположенных как на мембране нейронов, так и глии. Выделяют две группы GAT, различающихся по степени чувствительности к ГАМК и локализации в ЦНС (GAT₁ и GAT₄ – нейроны, GAT₂ и GAT₃ – клетки глии). Как и в случае других транспортеров, для них характерна 12-сегментная трансмембранная топология и использование Na⁺/Cl⁻-градиента для переноса ГАМК внутрь клетки.

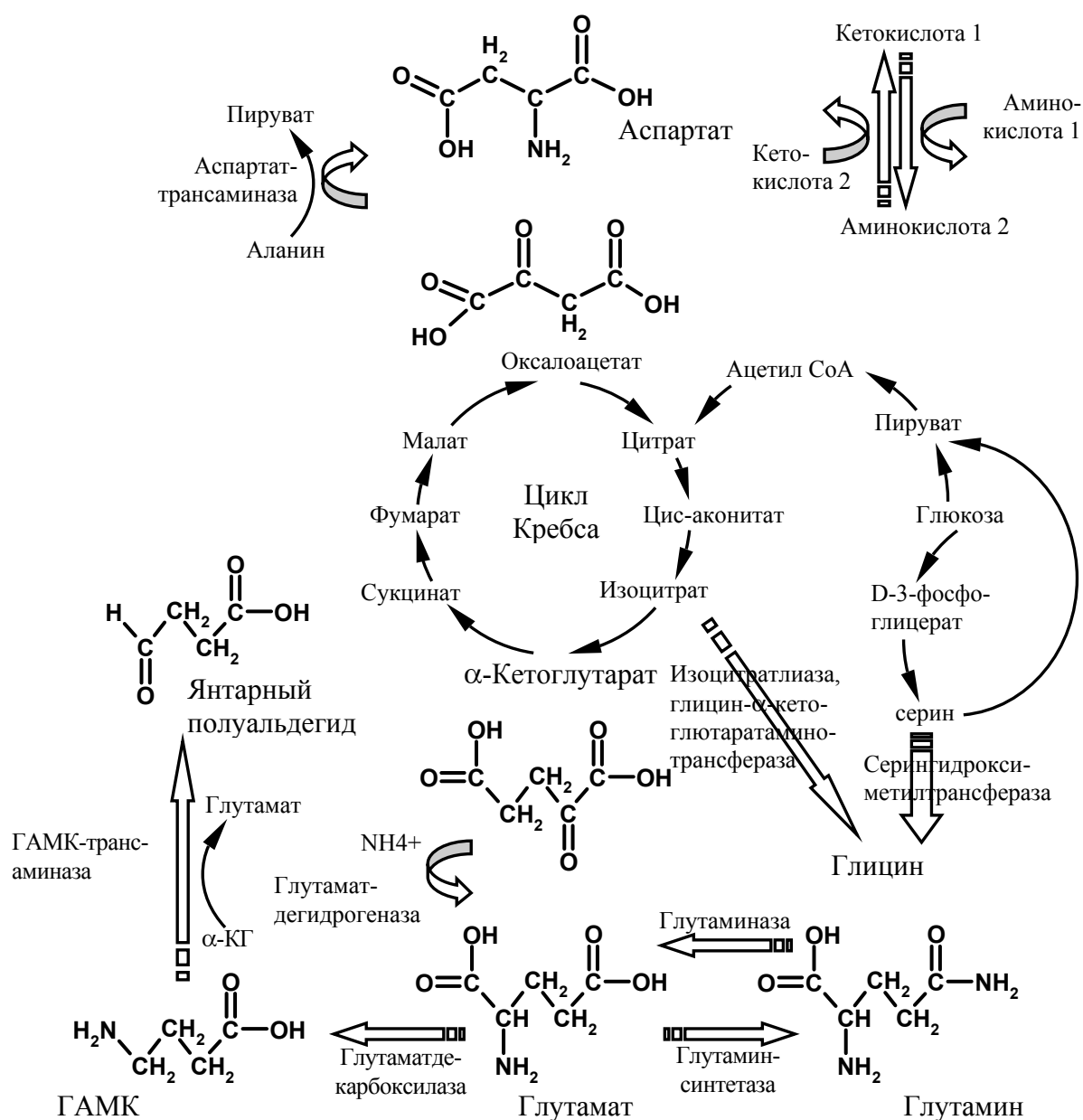


Рис. 84. Метаболизм тормозных и возбуждающих аминокислот

Метаболизм глицина. Биохимические пути синтеза и деградации глицина остаются малоизученными по сравнению с таковыми для других медиаторов. В ЦНС глицин образуется, главным образом, из другой аминокислоты – серина, источником которого, в свою очередь, служит глюкоза, точнее, гликолитический промежуточный продукт D-3-фосфо-глицерат. В митохондриях *серингидроксиметилтрансфераза* катализирует превращение серина в глицин (рис. 85).

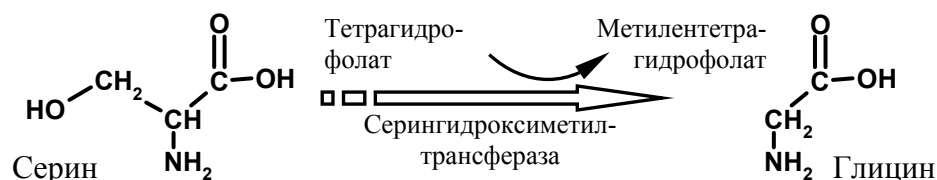


Рис. 85. Биосинтез глицина

Альтернативный путь синтеза – образование из изоцитрата посредством действия изоцитратлиазы и последующего трансаминирования *глицин-α-кетоглутаратамиотрансферазой*. Поступление глицина в везикулы опосредуется работой общего с ГАМК транспортера. Удаление глицина из синаптической щели осуществляется при помощи специфического транспортера (GLYT), имеющего 12 трансмембранных сегментов и демонстрирующего выраженную Na⁺-зависимость. Высокоаффинная система обратного захвата встречается в нейронах спинного и продолговатого мозга, моста. Низкоаффинная система отмечена в других областях мозга.

Метаболизм возбуждающих аминокислот. Глутамат и аспартат синтезируются непосредственно в ткани мозга, поскольку они не способны свободно проникать через гематоэнцефалический барьер. Глутамат образуется за счет восстановительного аминирования ионами NH₄⁺ α-кетоглутарата при действии *глутаматдегидрогеназы*. Аспартат получается в результате переаминирования оксалоацетата посредством трансаминазы.

Обратный захват (см. далее) глутамата клетками глии приводит к образованию из него глутамина под действием Mg-АТФ-зависимой глутаминсинтетазы. Впоследствии может происходить высвобождение глутамина из клеток глии, его перенос в нейроны и синтез из него глутамата, катализируемого глутаминазой.

Для транспорта глутамата в синаптические пузырьки служит специфический транспортер, структурно и функционально схожий с таковым для других нейромедиаторов. Действие глутамата и аспартата в синаптической щели ограничивается работой транспортеров для возбуждающих аминокислот (ЕААТ). В настоящее время известно о существовании четырех представителей этой группы (ЕААТ₁–ЕААТ₄) с молекулярной массой от 57 до 64 кДа, 10 трансмембранными сегментами и 50 % гомологией между друг другом (по отношению к другим транспортерам гомология гораздо меньше). В качестве движущей силы переноса аминокислот через мембрану служит концентрационный градиент Na⁺ и K⁺. Перенос также сопровождается изменением внутриклеточного рН и напряжения на мембране. Транспортеры возбуждающих аминокислот различаются по стехиометрии переноса и расположению в пределах ЦНС –

ЕААТ₁ и ЕААТ₂ встречаются только в клетках глии, а ЕААТ₃ – характерен для нейронов.

Ингибирование ЕААТ, например при действии дигидрокаината (ДНК), приводит к повышению концентрации глутамата и аспартата во внеклеточном пространстве, что лежит в основе цитотоксического действия возбуждающих аминокислот.

ВОЗБУЖДАЮЩИЕ И ТОРМОЗНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ: РЕЦЕПТОРЫ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРЬ КЛЕТКИ

Рецепторы к ГАМК. Их активация приводит к гиперполяризации мембраны и опосредует развитие тормозных эффектов. На основании фармакологических свойств, механизма передачи сигнала и субъединичной организации выделяют три типа рецепторов к ГАМК:

1. ГАМК_A – относятся к ионотропным рецепторам, структурно сходны с рецепторами к АХ и глицину. Они расположены на мембране нейронов и глии, а также клеток ганглиев автономной нервной системы и немиелинизированных волокон. У млекопитающих известно (на 2002 г.) о существовании 16 субъединиц, относящихся к семи классам ГАМК_A-рецепторов: 6 α , 4 β , 3 γ , 1 δ , 1 ϵ , 1 π , и 1 σ . Кроме того, различные варианты сплайсинга РНК, например в отношении α_5 , β_2 , β_4 и γ_2 , приводящие к возникновению изоформ, еще больше увеличивают разнообразие этих структурных компонентов. Каждая субъединица (около 50 кДа) состоит из примерно 450 аминокислотных остатков, организованных в четыре трансмембранных гидрофобных домена. По всей видимости, необходимо одновременное наличие пяти субъединиц трех разных типов – α , β , γ для формирования функционирующего ГАМК_A-рецептора (рис. 86).

Существование только двух типов субъединиц (α и β) в составе одного рецептора характерно для искусственных систем (экспрессия в ооцитах лягушки), но не обнаруживается *in vivo*. Наличие трех субъединиц одного типа в составе ГАМК_A-рецептора пока не установлено. Согласно наиболее известной модели ГАМК_A-рецептора он представляет собой пентамер, состоящий из субъединиц 2 α , 2 β и 1 γ или 1 δ (одновременное существование в одном рецепторе γ - и δ -субъединиц представляется маловероятным) и формирующий в мембране канал, проницаемый для

С^Г Считается, что γ -субъединица взаимодействует с белками цитоскелета (гефирин), «заякоривая» рецептор в определенном участке постсинаптической мембраны. Рецепторы, содержащие δ -субъединицу, преимущественно локализованы вне области синапса.

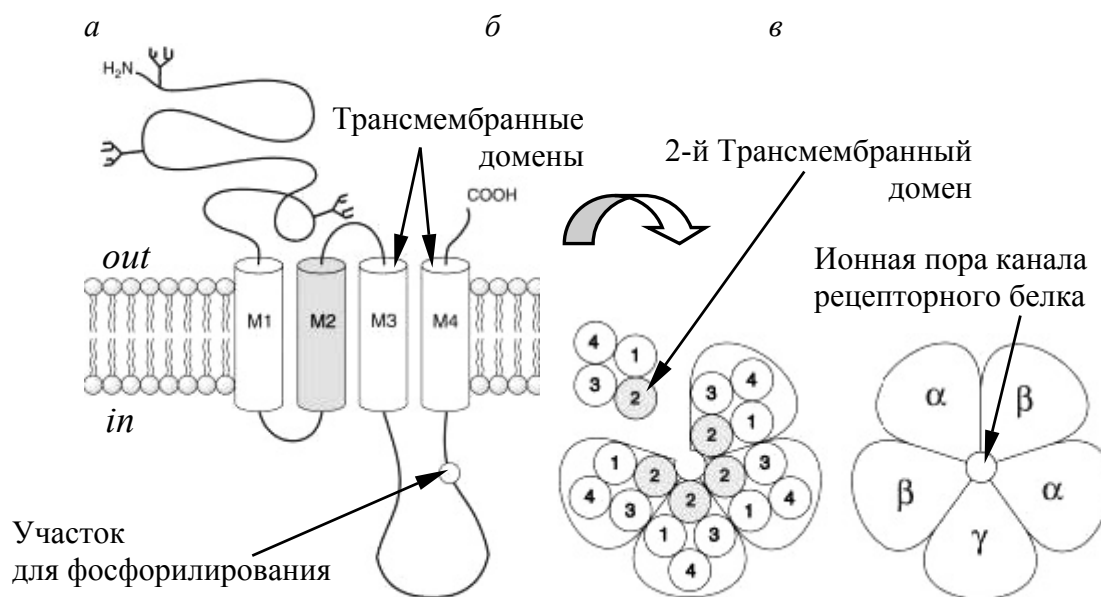


Рис. 86. Структурная организация ГАМК_A-рецептора (по R. Webster, 2001):

a – отдельная субъединица; *б* – топология трансмембранных доменов;

в – субъединичная организация рецептора

Различия в субъединичной композиции определяют неодинаковую фармакологическую чувствительность ГАМК_A-рецепторов. Так, те из них, которые содержат α_{1-5} -субъединицы, чувствительны к действию диазепама, а содержащие α_6 -субъединицу – диазепам-нечувствительны. В различных участках мозга экспрессируются различные по субъединичному составу ГАМК_A-рецепторы.

На поверхности ГАМК_A-рецептора существуют три участка для связывания – один для ГАМК (ГАМК может связываться как с α -, так и β -субъединицей), другой для бензодиазепамов и третий для барбитуратов. Селективным антагонистом ГАМК_A-рецепторов является бикикуллин, а селективным агонистом, помимо собственно ГАМК, – мусцимол.

2. ГАМК_B – представляют собой гетеродимерные метаботропные рецепторы, состоящие из двух субъединиц (GBR₁ и GBR₂) массой около 110 кДа, 35 % гомологией между друг другом, образованных в результате альтернативного сплайсинга. Одна из них (GBR₁) предназначена для связывания с ГАМК, а другая (GBR₂) – для связывания с G-белком (рис. 87).

Стимуляция ГАМК_B-рецепторов через активацию G_{o/i}-белков приводит к угнетению аденилатциклазы и снижению уровня внутриклеточного цАМФ либо к прямому действию компонентов G-белка на ионные (калиевые, кальциевые N и P/Q типов) каналы. Рецепторы ГАМК_B локализованы как на пост-, так и на пресинаптической мембранах. В первом случае они активируют калиевые каналы внутреннего выпрямления, вы-

зывая гиперполяризацию мембраны, а во втором – подавляют активность потенциал-зависимых кальциевых каналов (типов N и P/Q), снижая выброс медиатора (ГАМК и глутамат) в синаптическую щель. Селективным антагонистом ГАМК_B-рецепторов являются производные фосфиновой кислоты – CGP 36742, CGP 54626, CGP 55845, а селективным агонистом, помимо собственно ГАМК, – баклофен.

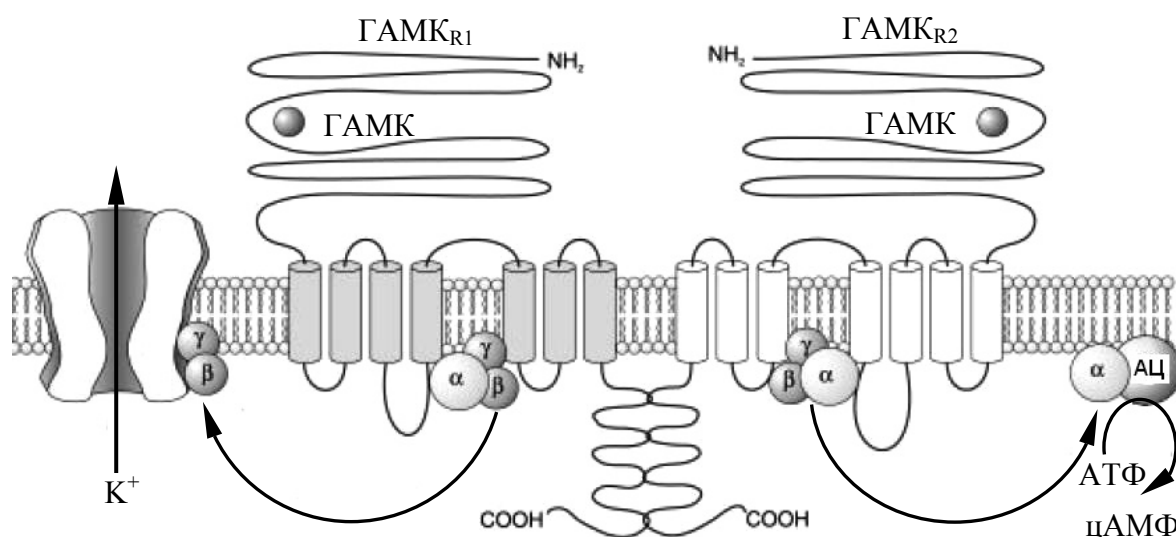


Рис. 87. Структурная организация ГАМК_B-рецептора
(по N. G. Bowery, S. J. Enna, 2000):

Показано, что G-белок связан с обеими субъединицами рецептора.
АЦ – аденилатциклаза

3. ГАМК_C – относятся к филогенетически наиболее древним ионотропным ГАМК-рецепторам, нечувствительным к действию бикикуллина и баклофена. Широко представлены в биполярных клетках сетчатки, а также в ряде нейронов гиппокампа. Относятся к гомомерным рецепторам, состоящим из ρ-субъединиц, насчитывающих три подтипа, хотя формирование гетеромерных рецепторов с участием ρ-субъединицы также возможно при их экспрессии в ооцитах лягушки. Эти рецепторы чувствительны к действию аналога ГАМК – *цис*-аминокротоновой кислоты. Субъединицы, их составляющие, формируют хлорный канал в мембране. В качестве их селективного антагониста выступает пикротоксин, хотя участки для связывания с бензодиазепами или барбитуратами у них отсутствуют.

Международный союз фармакологии (IUPHAR) не рекомендует выделять ГАМК_C-рецепторы в отдельный подтип, относя их к ГАМК_A-рецепторам.

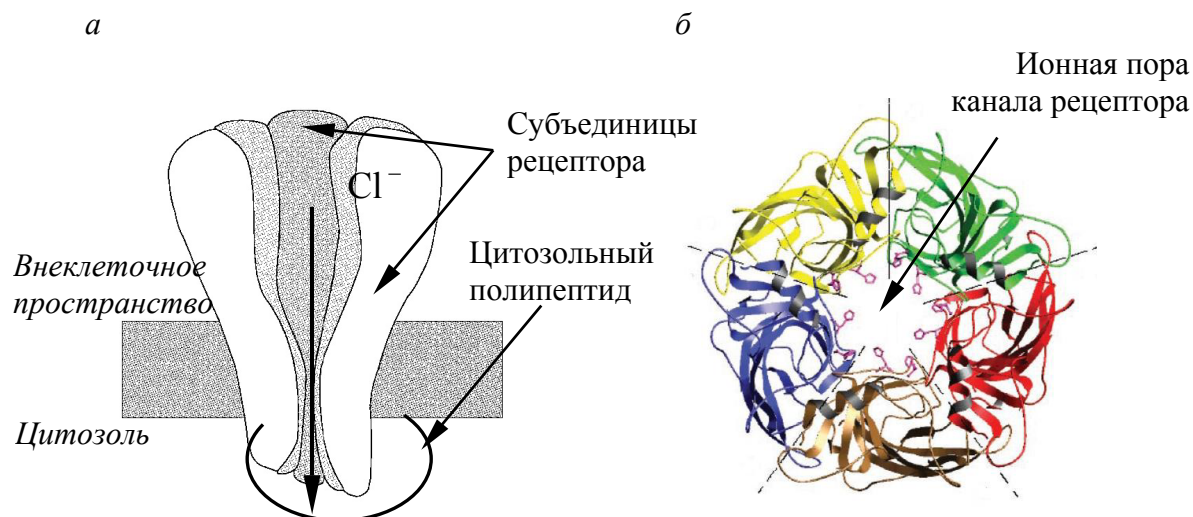


Рис. 88. Рецептор к глицину:
а – схема строения; б – вид со стороны синаптической щели (по J. W. Lynch, 2003)

Рецепторы к глицину. Относятся к ионотропным рецепторам, образуя наряду с ГАМК_A и АХ-рецепторами суперсемейство лиганд-управляемых ионных каналов. Представляют собой гликопротеин (250 кДа), состоящий из пяти субъединиц следующего состава: $2\alpha 3\beta$. При этом α -субъединица (48 кДа) ответственна за связывание с глицином (две молекулы глицина связываются с одним рецептором), β -субъединица (58 кДа) модулирует работу рецептора, а дополнительный цитозольный полипептид (93 кДа) связан с микротрубочками цитоскелета, фиксируя рецептор в определенных местах постсинаптической мембраны (рис. 88).

Методами молекулярного клонирования установлено существование четырех изоформ α -субъединицы.

α_1 -Субъединица характерна для глицинергических рецепторов спинного мозга взрослых особей, в то время как α_2 -субъединица экспрессируется в ходе эмбрионального и неонатального развития.

Связывание глицина вызывает увеличение проницаемости мембраны для Cl^- , что приводит к гиперполяризации мембраны клетки и демонстрирует выраженную чувствительность к действию стрихнина (селективный антагонист).

Участки стрихнин-независимого связывания глицина обнаружены и на рецепторах, нечувствительных к глицину – NMDA-рецепторах (см. далее). При этом глицин увеличивает частоту открытия NMDA-рецепторных каналов.

Рецепторы к глутамату и аспартату. Представлены как ионотропными, так и метаботропными рецепторами, классифицируемыми на основании фармакологических различий (способности активации специфическими агонистами) (рис. 89):

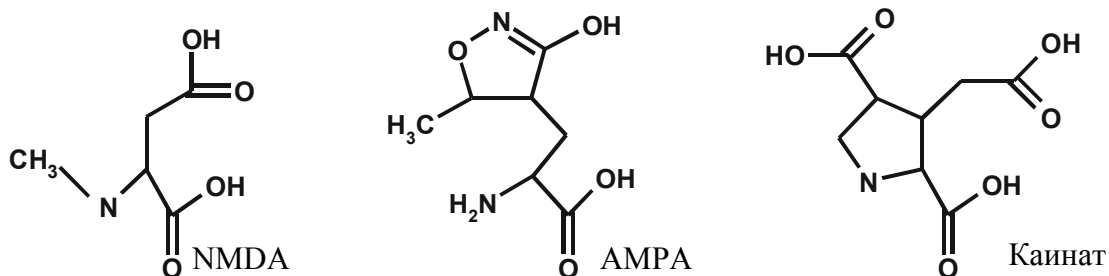


Рис. 89. Селективные агонисты рецепторов к глутамату и аспартату

1. NMDA-рецепторы – в качестве специфического агониста выступает N-метил-D-аспартат. Широко представлены в клетках коры больших полушарий (слои II и III), гиппокампа, базальных ядер, обонятельной луковицы и гипоталамуса. Состоят из пяти трансмембранных белков с различными участками для связывания (агонистов, модуляторов проводимости ионного канала – Mg^{2+} и ряда неконкурентных антагонистов, различных регуляторов активности, например, глицина), образующих ионный канал, проницаемый для Na^+ , K^+ и Ca^{2+} (ионотропные рецепторы).

NMDA-рецептор организован из четырех трансмембранных сегментов, из которых второй сегмент ответствен за образование ионного канала и, кроме того, формирует цитозольные участки для фосфорилирования и гликозилирования, в том числе протеинкиназой C и кальмодулин-зависимыми киназами. В покое ионный канал, образованный NMDA-рецептором, блокирован Mg^{2+} . Блокирующее влияние снимается при развитии деполяризации, и в клетку поступают положительно заряженные ионы, вызывая дальнейшую деполяризацию мембраны. Важнейшим следствием активации NMDA-рецепторов является поступление Ca^{2+} в клетку (рис. 90).

При этом в случае длительной активации NMDA-рецепторов его (Ca^{2+}) избыточное количество внутри клетки оказывается токсичным для нейронов, вызывая их гибель.

NMDA-рецептор представляет собой гетеродимерный рецептор, образованный двумя типами субъединиц:

- NR₁, кодируемой одним геном, но благодаря различным вариантам сплайсинга, образующей восемь изоформ. Формирует остов NMDA-рецептора;
- NR₂, кодируемой четырьмя различными генами (NR_{2A-D}), образующей пять изоформ и определяющей физиологические и фармакологические свойства NMDA-рецептора.

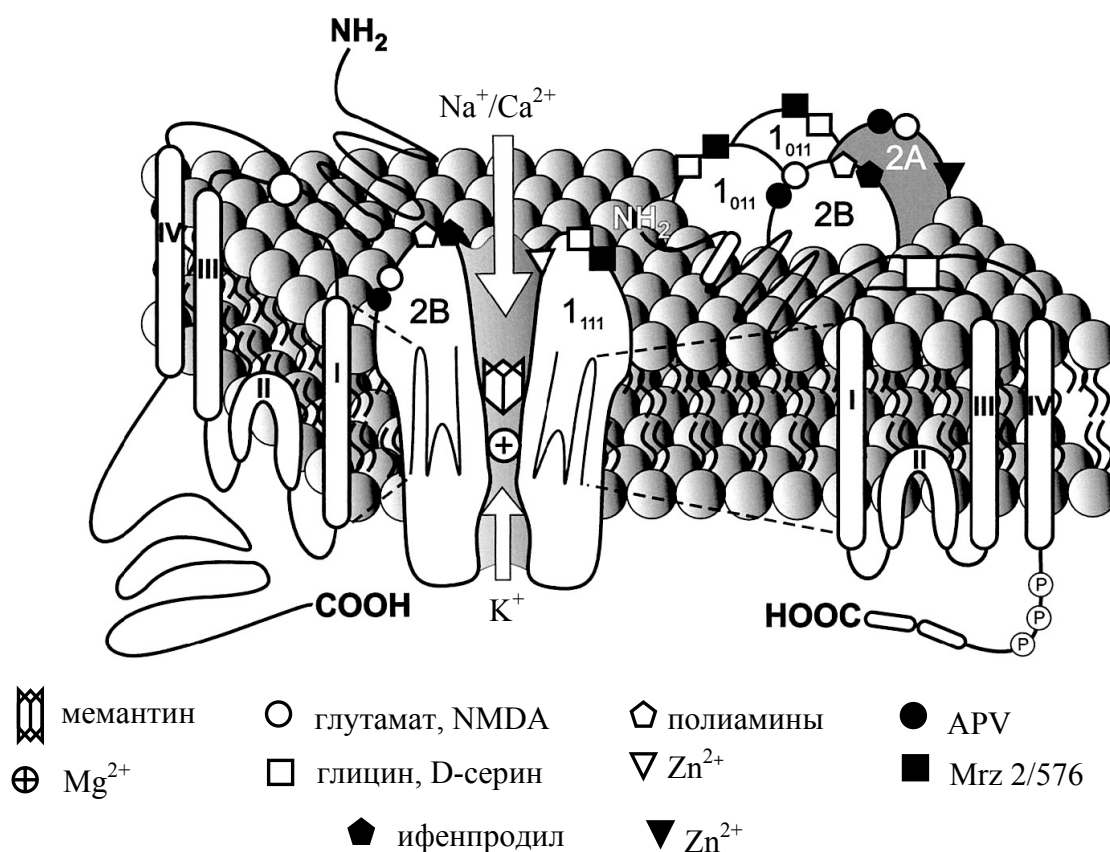


Рис. 90. Модель строения NMDA-рецептора (по W. Danysz, C. G. Parsons, 1998):
 темные фигуры – блокаторы рецептора, светлый круг – агонисты,
 светлый квадрат – коагонисты,
 светлые пятиугольник и треугольник – модуляторы рецептора.
 Мемантин и Mg^{2+} являются блокаторами ионного канала рецептора

2. AMPA-рецепторы – в качестве специфического агониста выступает α -амино-3-гидрокси-5-изоксазолпропионовая кислота. Многочисленны в нейронах неокортекса (слой V), миндалины, хвостатого и прилежащего ядер, молекулярного слоя мозжечка. Относятся к ионотропным рецепторам, образуя трансмембранный канал, проницаемый для Na^+ , K^+ . Считается, что при некоторых условиях ионный канал может быть проницаем и для Ca^{2+} . Методами молекулярного клонирования установлено наличие четырех типов AMPA-рецепторов: $GluR_{1(A)}$ – $GluR_{4(D)}$, состоящих из примерно 900 аминокислот, демонстрирующих 70 % гомологию друг с другом и 20–25 % гомологию с NMDA-рецепторами. Для каждого типа возможен альтернативный вариант сплайсинга, приводящий к возникновению изоформ «флип» и «флоп», определяющих физиологические свойства образуемого канала. AMPA-рецепторы могут существовать как в гетеро-, так и в гомомерной конфигурации, однако в последнем случае проводимость ионного канала значительно ниже.

3. Каинатные рецепторы – в качестве специфического агониста выступает каиновая кислота. Широко представлены в нейронах коры больших полушарий, гиппокампа, ядер ретикулярной формации промежуточного мозга. Данные рецепторы ассоциируются с формированием ионного канала, проницаемого для Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Представлены в гетеро- и гомомерной формах. В настоящее время выделяют два структурных класса субъединиц: 1) GluR_{5-7} , с 80 % гомологией в пределах группы и 40 % гомологией с субъединицами АМРА-рецептора и 2) KA_{1-2} . Гомология между классами менее 50 %. Каинатные рецепторы широко представлены на мембране пресинаптических терминалей, что предполагает их участие в контроле за выделением медиатора в синаптическую щель.

4. Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR) – селективным агонистом служит квискуалат (*quisqualate*). Их стимуляция приводит к активации различных G-белков, что выражается в ингибировании аденилатциклазы ($\text{mGluR}_{2-4, 6-8}$), стимуляции фосфолипазы ($\text{mGluR}_{1,5}$) и даже в прямом действии на ионные каналы (калиевые и кальциевые). Выделяют восемь подтипов мембранотропных глутаматных рецепторов (mGluR_{1-8}), образованных из 854–1179 аминокислот с гомологией 40 % и организованных в три группы на основании фармакологических свойств и используемого вторичного посредника. Они широко представлены среди структур мозга, располагаясь как на пост- (mGluR_1), так и на пресинаптической мембране (mGluR_2).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ

Глицин и ГАМК являются основными медиаторами, опосредующими торможение в ЦНС вследствие развития выраженной гиперполяризации постсинаптических клеток, обусловленной входом отрицательно заряженных ионов хлора внутрь клетки. Широко представленные на пресинаптических терминалях ГАМК_B-рецепторы выступают в качестве гетерорецепторов, контролирующих высвобождение медиатора из дофамин-, норадреналин-, серотонин- и глутаматергических нейронов. Активация ГАМК_A-рецепторов миндалины снимает состояние тревоги, а снижение их количества или блокада вызывает развитие судорожных состояний, наблюдаемых при эпилепсии. Давно известно судорожное действие блокатора глициновых рецепторов стрихнина (алкалоида *Strychnos nux vomica*) и столбнячного токсина бактерии *Clostridium tetani*, блокирующего выделение глицина из пресинаптических терминалей, реализуемых на уровне мотонейронов спинного мозга. Начиная с 1960-х гг. многие бензодиазепамы и барбитураты, т. е. вещества, способные модулировать ак-

тивность ГАМК_A-рецепторов, широко используются в качестве успокаивающих препаратов. Не исключена роль ГАМК-ергической системы мозга в процессах долговременной памяти и развитии некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Глутамат опосредует протекание как быстрых (деполяризация мембраны), так и медленных (долговременная потенция) синаптических процессов. Он участвует в регуляции выделения гормонов гипофиза, миграции нейронов в ходе индивидуального развития. Повышенное выделение глутамата и аспартата вследствие длительной стимуляции глутаматергических путей приводит к развитию эксайтотоксических (от англ. *excitotoxicity*) эффектов, наблюдаемых при ишемии, эпилептических состояниях, нейродегенеративных заболеваниях (болезни Альцгеймера и Паркинсона). Указанные эффекты обусловлены массивным входом Ca^{2+} в клетку и достижением его токсичных концентраций, запускающих механизм клеточной гибели.

ГЛАВА 11 НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОПЕПТИДОВ

Значительное число пептидов, синтезируемых в нейронах, выступает в качестве нейромодуляторов, т. е. веществ, способных существенно повлиять на характер действия «классических» сигнальных веществ (медиаторов). Крупные белковые молекулы неспособны из-за своих размеров накапливаться в синаптических пузырьках, высвободиться из пресинаптических терминалей и взаимодействовать с рецепторами постсинаптической клетки. Поэтому часто в ходе нормального развития от них случайным образом отщепляется цепочка из не более чем 30 аминокислот, именуемая теперь *нейропептидом*.

Пептидные гормоны были открыты еще в начале XX в. У. Бэйлисом и Э. Старлингом (W. Bayliss, E. Starling, 1902), но только по прошествии 60–70 лет идея о том, что подобные вещества могут синтезироваться и клетками мозга, а не только клетками кишечника, где они впервые были описаны, укрепилась окончательно. Этому способствовал факт установления пептидной природы гормонов гипоталамуса и гипофиза (середина 1950-х гг.), а также локализация различных нейропептидов в ЦНС посредством иммуногистохимических методов.

Согласно «нейропептидному» постулату Д. де Вида (D. de Wied, 1987), к нейропептидам относят вещества белковой природы, синтези-

руемые в нервных клетках и реализующие свое действие посредством активации рецепторов на нейронном уровне.

Основная проблема использования термина «нейропептид» в столь строгом смысле заключается в том, что многие из пептидов, будучи активными в ЦНС, вовлечены в регуляцию функций, напрямую не связанных с нервной деятельностью, – развитие и рост организма, поддержание гомеостаза, иммунный ответ и т. п.

Как уже отмечалось, нейропептиды образуются из крупных молекул предшественников, состоящих из примерно 300 аминокислот. В ходе созревания из одной молекулы предшественника могут образовываться несколько нейропептидов. В зависимости от способности представителей исходного семейства нейропептидов связываться с рецепторами постсинаптической мембраны их разделяют на две группы:

1) нейропептиды **общего происхождения**, активирующие **разные** рецепторы – так, вещество Р взаимодействует с NK₁-рецептором, а нейрокинины А с рецептором NK₂;

2) нейропептиды **общего происхождения**, активирующие **одинаковые** рецепторы – мет-энкефалин и лей-энкефалин взаимодействуют с одним и тем же δ-опиоидным рецептором.

На начало 2005 г. охарактеризовано свыше 50 нейропептидов (табл. 6), и число их продолжает увеличиваться.

Таблица 6

Наиболее известные нейропептиды

Семейство нейропептида	Предшественник	Активные пептиды
Ангиотензин	Ангиотензиноген	Ангиотензин
Соматостатин	Просоматостатин	Соматостатин
Бомбезин	Пробомбезин	Бомбезин
Производные I гена кальцитонина (CALC I)	Про-CALC I Про-CGRP I	Кальцитонин, относящийся к гену кальцитонина пептид (α-CGRP)
Производные II гена кальцитонина (CALC II)	Про-CGRP II	Относящийся к гену кальцитонина пептид (β-CGRP)
Производные гена вазопрессина	Провазопрессин	Вазопрессин, нейрофизин II
Производные гена окситоцина	Проокситоцин	Окситоцин, нейрофизин I
Производные гена меланин-концентрирующего гормона (MCH)	Про-MCH	MCH, нейропептиды Glu-Ile (NEI) и Gly-Glu (NGE)
Производные гена нейротензина	Пронейротензин	Нейротензин, нейромедин N
Производные гена препротакинина А (PPTA)	PPTA	Вещество Р, нейропептиды К и γ, нейрокинин А
Производные гена препротакинина В (PPTB)	PPTB	Нейрокинин В (нейромедин К)

Семейство нейропептида	Предшественник	Активные пептиды
Производные гена вазоактивного интестинального пептида (VIP)	ПроVIP	VIP
Производные гена динорфина	Продинорфин	Динорфины А и В, α и β неозндорфины
Производные проопиомеланокортина (ПОМС)	ПОМС	α - и β -Меланоцитстимулирующие гормоны, АКТГ, α -, β -, γ -эндорфины, β липопротеин
Производные гена энкефалина	Проэнкефалин	Met- и Leu-энкефалин
Холецистокинин (ССК)	Про-ССК	ССК ₈ , ССК ₃₃ , ССК ₅₈

Как правило, отмечается совместная локализация различных нейропептидов в одном нейроне, а также их колокализация с «классическими» нейромедиаторами.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА НЕЙРОПЕПТИДОВ

В отличие от синтеза нейромедиаторов, протекающего непосредственно в нервных окончаниях, образование нейропептидов происходит на рибосомах в теле клетки. Впоследствии молекула предшественника переносится в аппарат Гольджи, где она включается в состав крупных (100–200 нм) электронноплотных пузырьков, транспортируемых в нервные терминалы. В ходе этих стадий специфические эндопротеазы расщепляют белок-предшественник, а экзопептидазы устраняют концевые С-группы, преобразуя их в амидные.

Особую роль в переносе нейропептидов в нервные окончания играет **аксонный транспорт**. Это активный процесс, не опосредуемый обычной диффузией (см. далее). В зависимости от скорости перемещения внутриклеточных органелл различают:

1) медленный транспорт – посредством его перемещаются структурные белки, прежде всего *тубулин*, и белки нейрофиламентов. Скорость передвижения составляет 1–2 мм/сутки;

2) быстрый транспорт – в этом случае происходит перенос митохондрий и различных везикул, в том числе и синаптических пузырьков. Скорость передвижения может достигать 400 мм/сутки.

Первые указания на существование аксонного транспорта появились в 1948 г., когда было показано, что наложение лигатуры на периферические нервы вызывает их набухание выше места перевязки.

В зависимости от направления движения переносимых компонентов различают:

1) **антероградный** транспорт – движение по направлению к окончанию аксона;

2) **ретроградный** транспорт – движение по направлению к телу клетки.

Ретроградный транспорт дает возможность перемещать различные регуляторные молекулы, например фактор роста нервов, в тело клетки, где они и реализуют свое действие.

Основным звеном внутриклеточного транспорта веществ являются **микротрубочки** (рис. 91). Они начинаются от центросомы, образуя у эукариот гибкую систему трактов, опосредующих перенос различных компонентов внутри клетки.

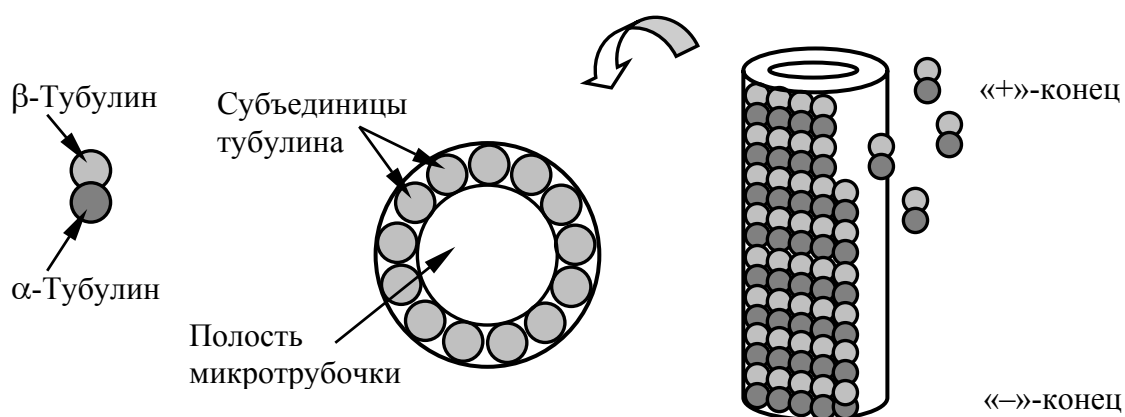


Рис. 91. Строение микротрубочки

Микротрубочки построены из многочисленных субъединиц, представленных молекулами тубулина, каждая из которых есть димер, состоящий из двух похожих глобулярных белков (α - и β - тубулина). Субъединицы тубулина организованы в *протофиламенты*, формирующие полый цилиндр (13 протофиламентов), который, собственно, и есть микротрубочка. Каждый протофиламент, а следовательно и микротрубочка, обладает выраженной полярностью. В зависимости от того, какой белок находится на конце микротрубочки, различают «+»-конец (β -тубулин) и «-»-конец (α -тубулин). Эта полярность имеет функциональное значение – со стороны «+»-конца рост микротрубочек при наличии избытка тубулина происходит интенсивнее. В клетке постоянно происходят процессы разрушения и образования микротрубочек и, как следствие, новых путей транспорта. Рост микротрубочек происходит от расположенной рядом с ядром центросомы, содержащей множество замкнутых кольцеобразных структур

(состоящих из γ -тубулина), к которым микротрубочки присоединяются своим «–»-концом, оставляя свободным «+»-конец. Важную роль в процессе роста микротрубочек играет ГТФ. ГТФ-связанные димеры тубулина обладают высокой способностью к полимеризации, что лежит в основе формирования ГТФ-колпачка на «+»-конце и роста микротрубочки. Напротив, гидролиз ГТФ до ГДФ приводит к уменьшению сродства молекул тубулина друг к другу и деполимеризации, т. е. разрушению микротрубочки. Заметим, что прикрепление некоторых «колпачковых» белков (*cap proteins*) к «+»-концу приводит к формированию стабильных микротрубочек, а следовательно, и путей транспорта веществ в клетке. Стабильные микротрубочки образуют и различные постоянные структуры клетки – цилии (волоски), жгутики и т. п.

Некоторые вещества (*колхицин*) предотвращают полимеризацию тубулина и образование микротрубочек, в то время как другие (*таксол*), напротив, препятствуют их распаду. В обоих случаях наблюдается нарушение протекания ряда субклеточных процессов, например деления.

Перемещение органелл и белков по сети микротрубочек осуществляется при помощи **двигательных белков** (*motor proteins*). Используя энергию гидролиза АТФ, они изменяют свою конформацию, что позволяет им перемещаться вдоль микротрубочки. Гидролиз одной молекулы АТФ обеспечивает «шаг» длиной приблизительно 8 нм, что соответствует расстоянию между двумя соседними димерами тубулина. В настоящее время известно о существовании более десятка таких белков, принадлежащих к двум семействам:

1) кинезина (*kinesins*) – белки этого семейства перемещаются в направлении «+»-конца, т. е. в сторону нервного окончания;

2) динеина (*dyneins*) – белки этого семейства перемещаются в направлении «–»-конца, т. е. в сторону тела нейрона.

Молекулы обоих семейств состоят из двух глобулярных АТФ-связывающих головок и хвоста, образованного тяжелыми и легкими цепями (рис. 92). При этом головки способны взаимодействовать с микротрубочками, а легкие цепи хвоста обеспечивают прикрепление предназначенных для транспортировки органелл и отдельных белков.

Таким образом, количество нейропептида, доступного для высвобождения и способного опосредовать тот или иной эффект, ограничено его количеством в терминалях нейрона, поскольку перенос вещества из тела клетки, где сосредоточен основной запас нейромодулятора, требует значительных временных затрат. Этому успешно противодействуют особенности постсинаптического действия нейропептидов – связывание с рецепторами при относительно низких (10^{-8} – 10^{-10} М), по сравнению с нейромедиато-

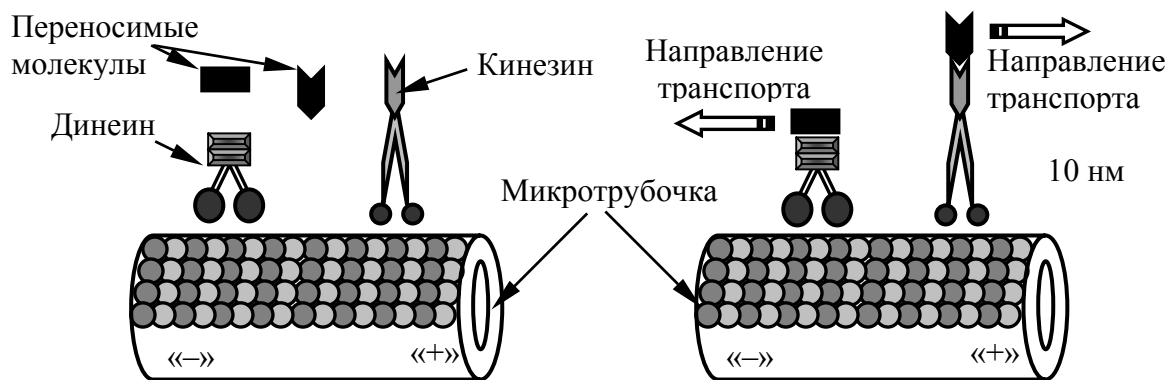


Рис. 92. Двигательные белки микротрубочек

рами (10^{-4} – 10^{-7} М), концентрациях, замедленное удаление из синаптической щели, усиление сигнала за счет активации системы вторичных посредников. Тем не менее усиление спайковой активности может привести к истощению внутриклеточных депо пептидергических нейронов. Кальций-зависимое выделение нейропептидов приводит к активации метаботропных рецепторов, связанных с G-белками, и обеспечивает протекание «медленных» синаптических процессов. Удаление избыточного количества нейропептида происходит путем его расщепления посредством мембранных *пептидаз* (металлопептидаз). Механизмы обратного захвата для них нехарактерны.

Насыщение мембранных пептидаз субстратом, т. е. нейропептидами, может приводить к тому, что часть неинaktivированных молекул пептидных нейромодуляторов может покинуть область синапса, оказывая паракринное действие на прилежащие участки ткани. В частности, подобный механизм описан при действии вещества Р и нейрокининов в ЦНС.

Наличие в одном нейроне двух и более нейропептидов и/или нейромедиаторов создает ряд возможностей по взаимодействию их друг с другом: усиление или ослабление постсинаптического действия каждого, усиление или ослабление процессов высвобождения и захвата.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ

Относительно крупные размеры большинства нейропептидов затрудняют их проникновение через гематоэнцефалический барьер, ограничивая действие указанных веществ областью головного и спинного мозга. Нестабильность пептидов во внеклеточном пространстве создает допол-

нительные трудности для функциональных исследований, требующих использования селективных агонистов и антагонистов небелковой природы. Задача по их поиску успешно решена лишь для некоторых нейропептидов.

Тахикинины и вещество Р. В настоящее время принято говорить о пяти представителях этого семейства (см. табл. 6) у млекопитающих, а еще три представителя (эледоизин, кассинин, фузаламин) выделены из тканей других организмов. Все они характеризуются наличием одинаковой аминокислотной последовательности на амидированном С-концевом участке: Gly-Leu-Met-NH₂:

Нейрокинин А: His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met

Нейрокинин В: Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met

Вещество Р: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met

Вещество Р (от англ. *preparation* – препарат) было описано У. Эйлером (U. Euler) и Дж. Гаддумом (J. Gaddum) в 1931 г., но его аминокислотная последовательность была установлена только спустя сорок лет (M. M. Chang et al., 1971). Другие представители семейства получили наименование тахикининов вследствие их способности вызывать сокращение гладкой мускулатуры, оказывая вазоактивное действие.

Выделяют три основных типа тахикининовых рецепторов: NK₁, NK₂ и NK₃, эндогенными агонистами которых выступают вещество Р (11 аминокислот), тахикинины А и В (состоят из 10 аминокислот каждый) соответственно. Все они относятся к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белками (G_q), и их стимуляция посредством активации IP₃/DAG-системы приводит к развитию медленной деполяризации, вызываемой закрытием K⁺-каналов.

Высокая концентрация тахикининов и вещества Р обнаружена в различных отделах ЦНС: спинном мозге, хвостатом и прилежащем ядрах, миндалине. Высокая концентрация вещества Р характерна для нейронов *substantia nigra*. Отмечена колокализация вещества Р и тахикининов (нейроны полосатого тела, сенсорные нейроны спинного мозга), вещества Р и ГАМК (некоторые интернейроны коры и гиппокампа).

Тахикинины и вещество Р интегрированы в нейронные сети, ответственные за восприятие болевых ощущений (ноцицепцию). Именно они выступают в качестве передатчика болевых сигналов на уровне спинного мозга (нейроны малого диаметра задних рогов), опосредуют протекание воспалительных процессов (стимулируют выделение гистамина тучными клетками). Развитие ряда нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера) ассоциируется с массовой потерей NK₁-рецепторов мозга.

Опиоидные пептиды. К данной группе относятся продукты нескольких генов – динорфина, проопиомеланокортина и энкефалина (см. табл. 6). Все они обладают способностью взаимодействовать с рецепторами, активируемыми экзогенной аппликацией морфина (алкалоид *Papaver somniferum*, выделенный Ф. Сёртурнером (F. Serturmer) еще в 1803 г.).

Открытие опиоидных пептидов приходится на середину 1970-х гг. Изначально исследования были нацелены на идентификацию в ЦНС рецепторов к морфину, и только после этого последовало открытие их эндогенных агонистов.

Первыми были открыты наиболее «короткие» представители данной группы, пентапептиды **мет-** и **лей-энкефалины**, различающиеся лишь последней аминокислотой (метионин или лейцин) карбоксильного конца. Основные производные проопиомеланокортина – **эндорфины** – характеризуются более длинной аминокислотной последовательностью:

Мет-энкефалин: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

Лей-энкефалин: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Динорфин А (1-17): Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln

β-Эндорфин: Н-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH

Ноцицептин: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln

Так, β-эндорфин состоит из 31 аминокислоты. Производные гена динорфина могут быть короткими пептидами – α- и β-неоэндорфин (10 и 9 аминокислот), средними – динорфины А (A₁₃, A₁₇) и В (B₁₃) и длинными – динорфин В (B₂₉). Их характерной особенностью является наличие в молекуле как минимум одной аминокислотной последовательности, идентичной таковой для лей-энкефалина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Нейроны, содержащие опиоидные пептиды, широко представлены в самых различных отделах головного и спинного мозга (рис. 93). Особенно велика их концентрация в нейронах промежуточного мозга (гипоталамические ядра и миндалины).

Все опиоидные рецепторы связаны с G_{ilo}-белками, а следовательно, реализуют свое действие посредством снижения активности аденилатциклазы и уменьшения концентрации цАМФ внутри клетки. В настоящее время выделяют три основных типа опиоидных рецепторов:

1) μ-рецепторы – основным эндогенным агонистом является β-эндорфин. Существует два подтипа: μ₁ и μ₂. Их стимуляция приводит к активации

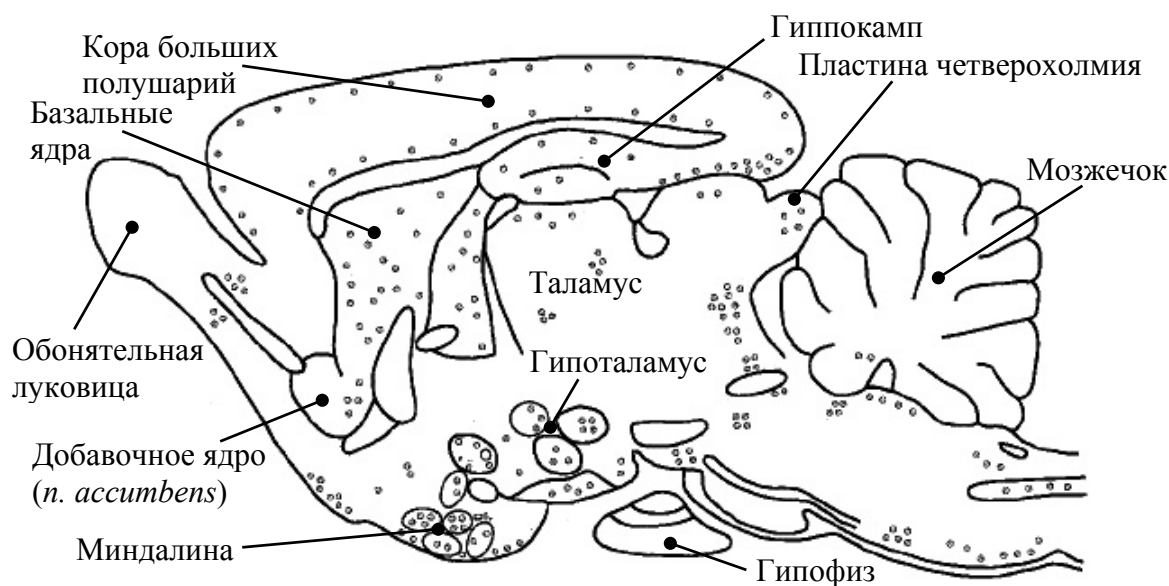


Рис. 93. Распределение клеток, экспрессирующих проэнкефалин в мозге крысы

ции кальций-зависимых K^+ -каналов, что уменьшает длительность потенциала действия и приводит к снижению возбудимости нейронной мембраны. На пресинаптическом уровне это вызывает снижение выброса нейромедиатора в синаптическую щель. В частности, высвобождение вещества Р чувствительными нейронами спинномозговых ганглиев блокируется при стимуляции опиоидных рецепторов, расположенных на мембране этих тахикининергических нейронов, что обуславливает анальгетический эффект опиоидных пептидов. Рецепторы данного типа широко представлены и в мозгу – неокортексе, гиппокампе и базальных ядрах;

2) δ -рецепторы – основными эндогенными агонистами являются энкефалины. Традиционно подразделяются на два подтипа – δ_1 (обеспечивают анальгетические эффекты в головном мозге) и δ_2 (ответственны за анальгетические эффекты на уровне спинного мозга). Механизм внутриклеточной трансформации внешнего сигнала для рецепторов этого подтипа сходен с таковым для μ -рецепторов;

3) κ -рецепторы – основными эндогенными агонистами являются ди-норфины. Об их существовании стало известно в 1993 г. на основании экспериментов по молекулярному клонированию (была получена кДНК, ответственная за образование белка, состоящего из 380 аминокислот). Результаты фармакологического тестирования позволили выделить ряд подтипов κ -рецепторов: κ_1 (изоформы А и В), κ_2 (изоформы А и В) и κ_3 .

Эти рецепторы также опосредуют анальгетические эффекты, препятствуя высвобождению медиатора боли, например АТФ, за счет инактивации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов пресинаптических терминалей таких нейронов.

Методы молекулярного клонирования позволили установить присутствие в ЦНС человека, крысы и мыши еще одного типа опиоидных рецепторов – человеческого опиоид-подобного рецептора 1 (**human Opioid Receptor-Like 1**, hORL₁). Его эндогенным агонистом выступает ноцицептин, а налоксон (универсальный блокатор опиоидных рецепторов) имеет относительно низкое сродство к рецептору данного типа.

Помимо контроля болевой чувствительности, опиоидная система вовлечена в реализацию дыхания, пищевого поведения, стресс-индуцированных поведенческих программ и т. д.

Действие опиоидов не ограничивается развитием тормозных процессов в ЦНС. В ряде случаев возбуждение обеспечивается непрямым образом, например в ходе *растормаживания*. В частности, угнетение работы некоторых тормозных элементов нервной системы под действием опиатов (ГАМК-ергических нейронов) приводит к синаптическому облегчению в нейронных сетях гиппокампа.

Галанин. Открытый в 1983 г., состоящий из 29 аминокислот, галанин относится к филогенетически древним пептидам, обнаруживаемым уже у беспозвоночных. В больших количествах он содержится в нейронах ядер гипоталамуса и миндалины. Предшественником галанина служит пре-прогаланин (123–124 аминокислот), ферментативное расщепление которого приводит к образованию различных многочисленных коротких форм нейропептида. Известно о существовании трех типов рецепторов к галанину: GAL_{(R)1}, GAL_{(R)2} и GAL_{(R)3} с 40–50 % гомологией по отношению друг к другу. Их стимуляция приводит к активации G_{o/i} (GAL_{(R)1,3})-или G_q (GAL_{(R)2})-белка. Галанин опосредует тормозные эффекты (уменьшение спайковой активности нейронов и высвобождения медиатора) в процессах обучения и памяти, а также при развитии болевых ощущений.

Нейротензин. Состоящий из 13 аминокислот, нейротензин представляет собой эволюционно консервативную молекулу, обнаруживаемую у многих «примитивных» организмов, вплоть до простейших: Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH.

Он встречается исключительно в нейронах, основная масса которых сосредоточена в гипоталамусе и миндалине. В меньших количествах они представлены среди клеток таламуса, *substantia nigra*, хвостатого ядра и

скорлупы, спинного мозга. Нейротензин часто локализован вместе с другими нейропептидами (энкефалины, холецистокинин) и нейромедиаторами (дофамин, норадреналин, ГАМК). Известно о существовании трех типов рецепторов к нейротензину: NT_{R1} , NT_{R2} и NT_{R3} . Первые два рецептора включают 424 и 416 аминокислот соответственно, демонстрируют 64 % гомологию друг с другом и состоят из семи трансмембранных сегментов, что позволяет отнести их к рецепторам, связанным с G-белками (G_q в отношении NT_{R1}). Рецептор NT_{R3} весьма необычен для своего типа, представляя собой белок (100 кДа), образующий лишь один трансмембранный домен. Показано участие нейротензина в терморегуляции (вызывает гипотермию), пищевом поведении (уменьшает потребление пищи), опосредовании анальгетических эффектов, во взаимодействии с дофаминергическими нигростриатальной и мезолимбической системами головного мозга. На периферии он расширяет кровеносные сосуды, вызывая падение артериального давления, повышает уровень сахара в крови (гипергликемия).

Нейропептид Y. Этот пептид, состоящий из 36 аминокислот, был изолирован в начале 80-х гг. XX в. (K. Tatemoto et al., 1981).

Аминокислота тирозин, принятое однобуквенное сокращение которой Y, является терминальной как на N-, так и на C-участке данного пептида, что и дало повод его так назвать.

Распределение нейронов, содержащих нейропептид Y в мозге, сильно не отличается от упомянутого ранее – концентрация в области гипоталамических ядер, миндалина и гиппокампа при полном отсутствии в мозжечке и лишь следовые количества в нижних отделах ствола мозга. Все типы рецепторов (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 , Y_6) относятся к метаботропным рецепторам, стимуляция которых вызывает угнетение продукции цАМФ или возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , т. е. они связаны с $G_{o/i}$ -и/или G_q -белком (существование Y_3 -рецептора не было подтверждено). Несмотря на примерно одинаковое количество аминокислот, образующих эти типы рецепторов (380 для Y_1 , 381 для Y_2), процент гомологии не очень высок – 31 % для приведенного примера. Нейропептид Y относится к наиболее распространенным нейропептидам в ЦНС. Он участвует в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, потребления пищи и пищеварения, в контроле циркадных ритмов, регулирует высвобождение половых гормонов, что лишний раз подчеркивает его древнее эволюционное происхождение. Кроме того, известно об участии нейропептида Y в механизмах обучения и памяти, формировании тревожных состояний.

НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ – ПРОИЗВОДНЫЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

К данной группе относятся **эйкозаноиды**, образующиеся из ненасыщенных C_{20} жирных кислот, содержащих от трех до пяти двойных связей. Основным источником эйкозаноидов выступает незаменимая арахидоновая (полностью *цис*-5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновая) кислота, синтезируемая практически во всех клетках организма.

Эйкозаноиды разделяются на две основные группы:

1) **простаноиды** – включают в себя *простагландины*, *простациклины* и *тромбоксаны*;

2) **лейкотриены**.

Особой группой эйкозаноидов является **анандамид**, связывающийся со специфическими (каннабиноидными) рецепторами мозга.

Эйкозаноиды. Первым шагом к синтезу эйкозаноидов является высвобождение арахидоновой кислоты из фосфолипидов под действием цитозольной *фосфолипазы* A_2 . Она может быть активирована специфическим белком, а также вследствие стимуляции некоторых видов рецепторов (NMDA или 5-HT₂). В дальнейшем из нее под действием *циклооксигеназы* образуются простагландины (PG_{A-E}) и тромбоксаны, а под действием *липоксигеназы* – лейкотриены (рис. 94).

Сама по себе арахидоновая кислота способна воздействовать на протеин-киназу C, а также напрямую изменять проводимость Ca^{2+} - и K^+ -каналов. Известно о существовании рецепторов к простагландинам (PGD_2 и PGE_2) в периферической и центральной (практически во всех отделах мозга) нервной системе. Роль тромбоксанов и лейкотриенов в ЦНС пока изучена слабо. Существует четыре изоформы PGE_2 рецептора: EP_1 , EP_2 , EP_3 и EP_4 , связанных с G_s - или G_i -белками.

Некоторые продукты липоксигеназного пути способны напрямую взаимодействовать с белком K^+ -каналов, увеличивая вероятность их нахождения в открытом состоянии, как это показано для нейронов *Aplysia*.

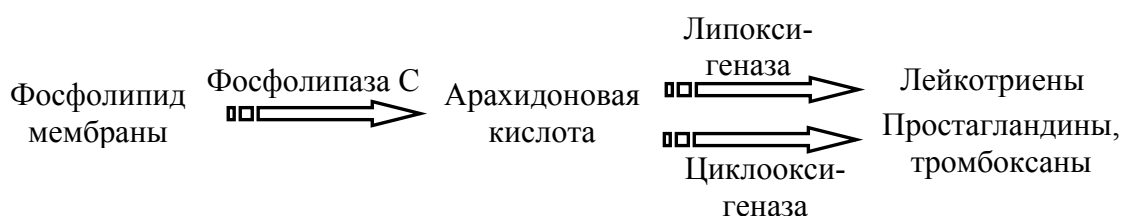


Рис. 94. Превращения арахидоновой кислоты

Эйкозаноиды вовлечены в регуляцию процессов воспаления, боли, лихорадки, кровяного давления. На клеточном уровне они способны модулировать работу лиганд-управляемых ионных каналов, ингибировать активность Na^+/K^+ -АТФазы и систем обратного захвата нейромедиаторов (арахидоновая кислота). Предполагается, что в механизмах долговременной потенциации в нейронах гиппокампа задействована арахидоновая кислота, высвобождение которой происходит при стимуляции NMDA-рецепторов.

Анандамид. Это эндогенное вещество было обнаружено в мозге (R. Mechoulam et al., 1992). Оно способно активировать *каннабиноидные* рецепторы в очень низких концентрациях.

В основе давно известного психотропного действия *Cannabis sativa* (каннабиноидов) лежит активация специфических эндогенных рецепторов мозга Δ^9 -тетрагидроканнабинолом, изолированным из *Cannabis sativa* еще в 1964 г.



Рис. 95. Метаболизм анандамида

Точные места синтеза анандамида в мозге пока неизвестны. Впервые такая возможность была показана для культивируемых в искусственных условиях нейронов мозга крыс. Синтез анандамида наблюдается при деполяризации клетки и демонстрирует сильную Ca^{2+} -зависимость. Он образуется из N-арахидонил-фосфатидилэтаноламина под действием фосфолипазы D (рис. 95).

Деполяризация нейронов приводит к выбросу анандамида во внеклеточное пространство, откуда его избыток может быть удален при помощи неидентифицированного транспортера по механизму обратного захвата. В дальнейшем анандамид превращается в 12- или 15-гидропероксианандамид (липоксигеназы) или в арахидоновую кислоту (гидролаза).

Существуют два типа рецепторов к каннабиноидам: CB_1 и CB_2 , различия между которыми основаны на фармакологических свойствах. Аминокислотная гомология составляет 44 %. Оба они связаны с G_{oli} -белками, и их стимуляция приводит к угнетению продукции цАМФ и мобилизации арахидоновой кислоты, что увеличивает внутриклеточную продукцию эйкозаноидов.

Рецепторы CB_1 обнаружены в коре больших полушарий, обонятельной луковице, гиппокампе, базальных ядрах и мозжечке (рис. 96), их стимуляция приводит к дезактивации кальциевых каналов N-типа.

Рецепторы CB_2 характерны для периферических тканей (макрофаги и тучные клетки) и не обнаружены в ЦНС.

Каннабиноиды вовлечены в регуляцию болевой чувствительности (антиноцицептивное действие), развитие гипотермии, угнетение спонтанной локомоторной активности.

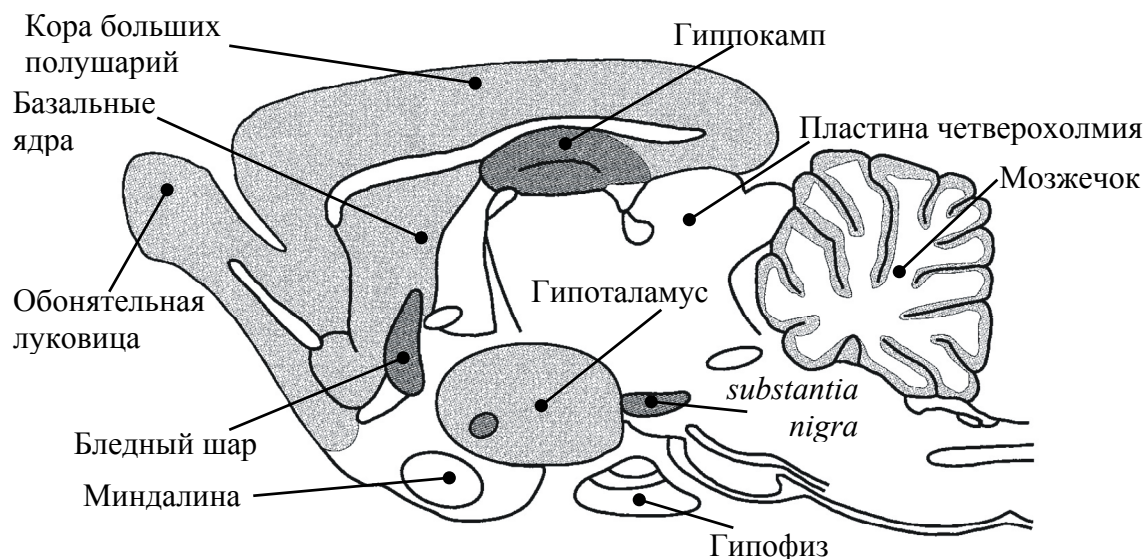


Рис. 96. Распределение CB_1 -рецепторов в мозге крысы:

■ высокая плотность; □ низкая плотность

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПУРИНЫ И ПИРИМИДИНЫ КАК НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ

Пурины (аденозин, АДФ и АТФ) и пиримидины (УДФ и УТФ) относятся к важнейшим сигнальным молекулам (рис. 97). С уверенностью можно говорить о том, что в отношении АТФ выполнены все условия, чтобы считать его нейромедиатором, хотя в отношении других веществ пуриновой и пуринергической природы это не столь очевидно.

Первые указания на сигнальную функцию пуринов (аденозин и АМФ) были получены А. Сцент-Дьорди (A. Szent-Györgyi, 1929) при изучении их действия на сердечно-сосудистую систему. Однако только в начале 70-х гг. XX в., благодаря работам Г. Бернстока (G. Burnstock), было показано, что АТФ является медиатором неадренергической, нехолинергической (NANC) передачи в автономной нервной системе.

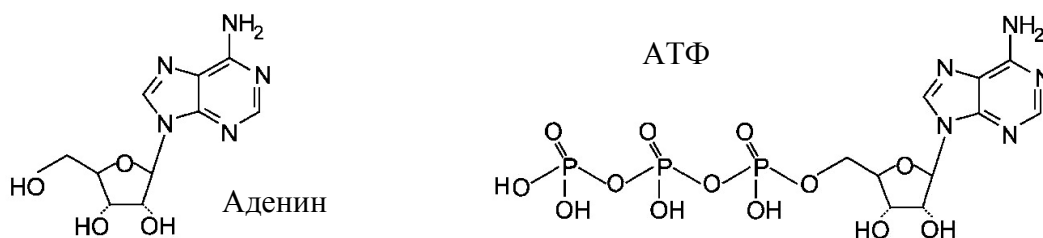


Рис. 97. Пурины

Как быстрый нейромедиатор АТФ работает в некоторых отделах головного мозга. Он также широко представлен в качестве ко-трансмиттера в норадренергических и холинергических синапсах. АТФ синтезируется в ходе метаболического превращения захваченной нервными терминалями глюкозы в митохондриях посредством окислительного фосфорилирования. Львиная его доля используется для поддержания работы Na^+/K^+ -насоса, других АТФаз. Тем не менее небольшая доля АТФ попадает и в синаптические пузырьки, выступая затем в качестве нейромедиатора.

Выделяемый АТФ метаболизируется посредством ферментов клеточной поверхности (экто-АТФазы). В конвертации АТФ участвуют:

- **экто-АТФаза**: гидролизует АТФ до АДФ;
- **экто-апиразы** преобразуют АТФ и АДФ в АМФ;
- **экто-5'-нуклеотидазы** конвертируют АМФ в аденозин.

Все промежуточные метаболиты АТФ способны активировать соответствующие рецепторы (см. далее). Внеклеточная концентрация аденозина регулируется посредством двойного механизма: двустороннего мемб-

ранного переноса и ферментативного расщепления (аденозиновые деаминаза и киназа).

В зависимости от того, какое вещество (вещества) выступает в качестве агониста, выделяют два типа пуринорецепторов:

1. P1-рецепторы – активируются аденозином. Относятся к метаботропным рецепторам, ассоциированным с G-белком. Состоят из 320–410 аминокислот и демонстрируют 90–95 % гомологию в пределах разных групп млекопитающих. Семь трансмембранных доменов (21–28 аминокислот в каждом) соединены тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями. С-концевой участок находится в цитозоле, а N-терминаль – во внеклеточном пространстве. На основании молекулярных, биологических и фармакологических свойств их подразделяют на следующие подтипы:

- **A₁**: связаны с G_{o/i}- или G_q-белками, реализуя свое действие благодаря снижению уровня цАМФ или активации IP3/DAG-системы в зависимости от места нахождения. Дальнейшее их разделение основано на способности к связыванию с агонистом – высокоаффинные A_{1A}- и низкоаффинные A_{1B}-рецепторы;

- **A₂**: связаны с G_s (A_{2A})-, G_{o/i}- и G_q (A_{2B})-белками. Также подразделяются на высокоаффинные A_{2A} и низкоаффинные A_{2B} рецепторы. Первые широко распространены в ЦНС – преимущественно в базальных ядрах, а также клетках глии, вторые представлены и в периферической нервной системе;

- **A₃**: один из самых малых рецепторов, состоящий всего из 316-320 аминокислот в зависимости от вида. Система активируемых вторичных посредников сходна с таковой для A₁-рецептора. Широко распространены по всему организму, однако в ткани мозга их представительство невелико.

2. P2-рецепторы – активируются АТФ (АДФ), УТФ (УДФ). Дальнейшее их разделение основано на принадлежности к ионо- или метаботропными рецепторам:

- **P2X-рецепторы** (ионотропные): образованы комбинацией нескольких субъединиц (вероятнее всего трех), каждая из которых представлена двумя трансмембранными сегментами, соединенными большой внеклеточной петлей, N- и С-участки находятся в цитоплазме (рис. 98).

Данная группа весьма гетерогенна – выделяют семь подтипов P2X-рецепторов (P2X₁₋₇), организованных в три группы. Рецепторы первой группы (P2X_{1, 3}) характеризуются высоким аффинитетом к АТФ, быстро активируются и десенситизируются. Рецепторы второй группы (P2X_{1, 4-6}) обладают низким аффинитетом к АТФ, относительно медленно активи-

руются и десенситизируются. Рецепторы третьей группы (P2X₇) обладают очень низким сродством к АТФ и почти не подвержены десенситизации, они не обнаружены в нервной ткани, а локализованы на мембране тучных клеток и макрофагов.

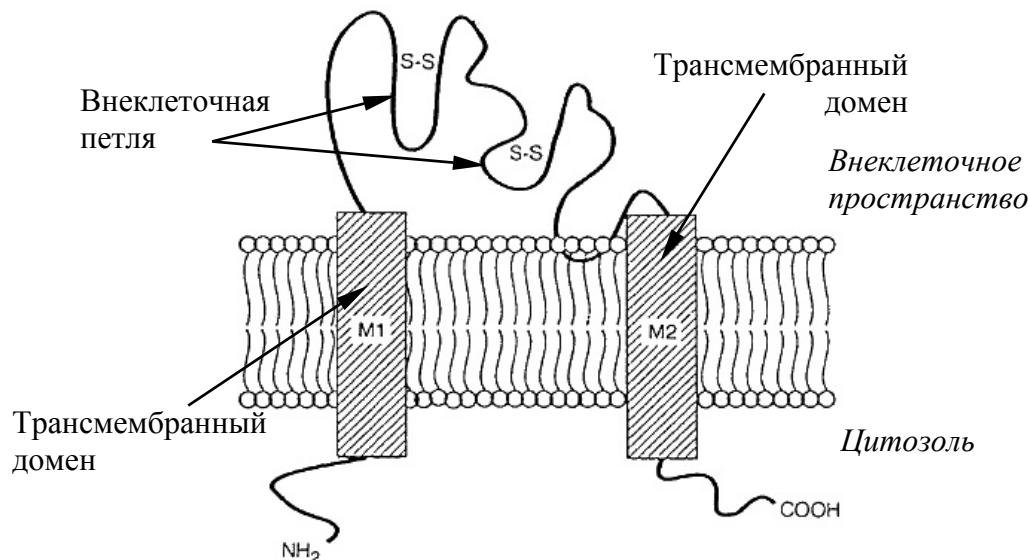


Рис. 98. Трансмембранная топология субъединицы P2X-рецептора (по G. Burnstock, V. Ralevic, 1998)

Все P2X-рецепторы формируют неселективную ионную пору, проницаемую для $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Быстрый (10 мс) перенос указанных ионов через мембрану вызывает деполяризацию и значительно увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция, как прямо, так и опосредованно за счет последующей активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Это особенно важно в случаях межнейронной передачи сигнала и при регуляции сокращения гладких мышц.

P2X-рецепторы подвержены различным модулирующим влияниям. Так, Zn^{2+} усиливает катионную проводимость, обусловленную действием АТФ, а защелачивание, напротив, ее снижает.

- **P2Y-рецепторы (метаботропные):** несмотря на то, что сообщалось о клонировании свыше десяти подобных рецепторов, только пять из них признаны истинными P2Y-рецепторами (P2Y₁, 2, 4, 6, 11). Они образованы гликопротеинами, состоящими из 308–377 аминокислот, связанными преимущественно с G_q-белками, а также G_i-белком (P2Y₁). В отличие от других подтипов (среди которых достаточно часто встречаются рецепторы с высоким сродством к пиримидинам), P2Y₁ широко представлены в ткани головного мозга.

Выделяют и так называемые P2Z-рецепторы, связывающие АТФ⁴⁻. Они относятся к лиганд-управляемым ионным каналам, но их присутствие в нервной ткани не установлено (2002 г.).

Несмотря на значительную роль, играемую пуринергической системой в регуляции деятельности внутренних органов, ее участие в работе ЦНС остается предметом интенсивного изучения. Так, повышенная внеклеточная концентрации АТФ приводит к гипервозбудимости клеток и усиливает восприятие боли (в этом случае именно АТФ, поступающий из разрушенных клеток, является одним из медиаторов боли). В гиппокампе подтверждено его вовлечение в процессы памяти и обучения. В отличие от АТФ, аденозин обладает преимущественно «успокаивающим» действием, снижая выброс многих нейромедиаторов (дофамин, ГАМК, глутамат, ацетилхолин, дофамин, серотонин, норадреналин) посредством активации пресинаптических A₁-рецепторов. Не исключена вовлеченность пуринергической передачи в контроль работы ряда нейронных генераторов ритма, в частности дыхательного.

ГЛАВА 12 ГАЗООБРАЗНЫЕ НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ И ОБЪЕМНАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

КОНЦЕПЦИИ ОБЪЕМНОЙ И ПРОВОДНИКОВОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Разделение процессов межклеточной коммуникации на основании особенностей распространения и восприятия передаваемого сигнала было впервые проведено Л. Агнати и соавторами (L. Agnati et al., 1986). Согласно высказанной ими концепции, выделяют следующие способы передачи сигнала (рис. 99):

1. Проводниковая передача сигнала (*wiring transmission*) – способ межклеточной коммуникации, опосредованный детерминированной цепочкой клеток. При этом наблюдается передача сигнала от одной клетки к другой с коэффициентом 1:1, т. е. на один источник сигнала (пресинаптическую клетку) приходится один приемник этого сигнала (постсинаптическая клетка). Представлена классической синаптической передачей, например в случаях простых рефлекторных дуг соматических рефлексов, хотя наличие в них вставочных нейронов несколько и не соответствует декларируемому коэффициенту 1:1.

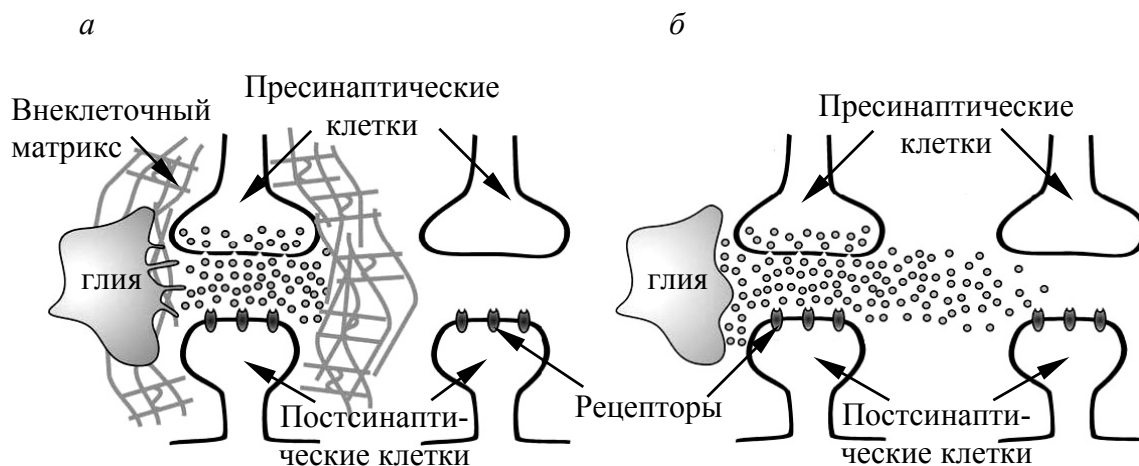


Рис. 99. Проводниковая (а) и объемная (б) передача сигнала (по Е. Sykova, 2004)

2. Объемная передача сигнала (volume transmission) – способ межклеточной коммуникации, основанный на распространении сигнала в пределах межклеточного пространства во всех направлениях. При этом расстояние, на которое такой сигнал распространяется, значительно превышает размеры синаптической щели. Во внеклеточном пространстве сигнал распространяется по пути, обеспечивающему наибольшую скорость диффузии сигнальной молекулы. Передача сигнала происходит с коэффициентом $1 : n$, где $n \gg 1$. Таким образом, количество приемников сигнала значительно превышает количество источников исходного сигнала.

Многие нейромедиаторы и нейромодуляторы способны выступать в качестве сигнальных молекул объемной передачи сигнала (рис. 100), однако со всей очевидностью эта роль наиболее характерна для газообразных нейромодуляторов (см. далее). Разумеется, что клетки-мишени объемной передачи сигнала обладают специфическими молекулами, способными воспринимать и распознавать исходный сигнал.

В современной нейробиологии уже не вызывает сомнений, что в мозге, помимо синаптической передачи, существует и другая, гормон-подобная передача сигнала. Основу такого **паракринного** (F. Murad, 1994) влияния составляет *генерализованное* действие того или иного вещества. При этом в ответную реакцию вовлекается целая *совокупность* клеток, расположенных на некотором расстоянии от клетки, источника сигнала.

Наряду с газообразными нейромодуляторами, многие нейропептиды, а также и белковые факторы роста относятся к паракринно действующим началам.

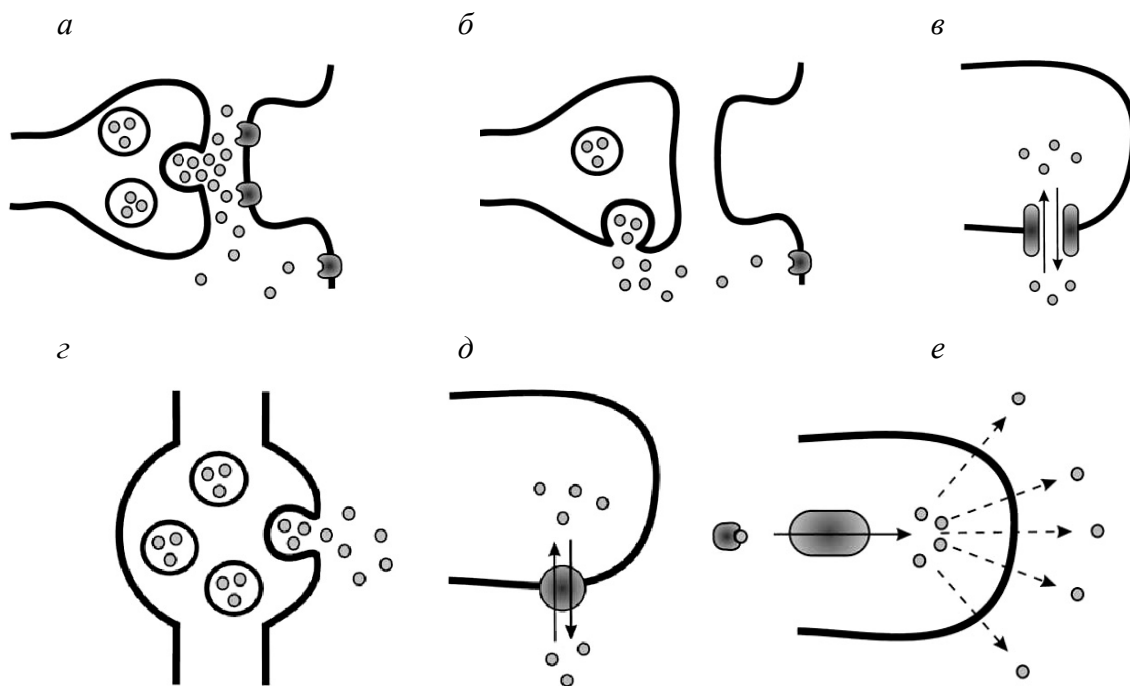


Рис. 100. Некоторые источники сигналов объемной передачи (по Е. Sykova, 2004):
a – избыточное выделение медиатора в синаптическую щель (аминокислоты);
б – внесинаптическое везикулярное выделение сигнальных молекул (неuropeптиды);
в – местные ионные потоки; *г* – варикозные расширения нервных волокон (катехоламины);
д – обратный перенос нейромедиаторов посредством обращения работы мембранных транспортеров (глутамат, ГАМК, дофамин); *е* – газообразные нейромодуляторы (NO, CO)

Помимо межклеточного пространства существует и другой путь, по которому сигналы могут распространяться от клетки к клетке по всем направлениям. Это внутриклеточное пространство расположенных рядом нейронов, соединенных посредством щелевого контакта. В отличие от первого (внеклеточного) пути, он представляет собой хорошо регулируемый путь, позволяющий координировать работу функционально однородных нейронов. Так, известно о том, что синтезируемый амакриновыми клетками сетчатки глицин может поступать в связанные с ними биполярные клетки через щелевой контакт.

КЛЕТочная ОРГАНИЗАЦИЯ МОЗГА

Несмотря на чрезвычайную сложность клеточной организации мозга, все разнообразие нейронных сетей можно свести к двум базовым схемам:

1. Иерархические системы – к ним относятся многочисленные проводящие пути спинного и головного мозга, контролирующие двигательную активность и чувствительность и состоящие из последовательно соединенных при помощи толстых, миелинизированных волокон различных клеток. Важной особенностью этой схемы является то, что повреждения, нанесенные на *любом* ее уровне, вызывают нарушение работы *всей* системы.

Иерархические системы состоят из клеток двух типов:

- **проекционные (релейные) нейроны:** будучи связанными посредством химического синапса, передают сигналы на большие расстояния в пределах организма.

Для них характерны крупные тела с многочисленными отростками вокруг (дендриты) и одним длинным отростком (аксон) для контакта с другими составляющими системы. Как правило, синапсы, образованные этими клетками, относятся к возбуждающим синапсам, часто использующим глутамат в качестве нейромедиатора;

- **вставочные (местные) нейроны:** они участвуют в образовании многочисленных синапсов с проекционными нейронами или друг с другом.

Тела этих клеток значительно мельче, аксоны мало выражены. Разнообразие синапсов (аксо-соматические, аксо-дендритные, аксо-сомальные и т. п.) позволяет реализовать различные виды межнейронных взаимодействий, прежде всего торможение – прямое, возвратное, латеральное и др.

Таким образом, большинство синапсов, образованных вставочными нейронами, – тормозные, предпочтительно использующие ГАМК и/или глицин в качестве нейромедиатора.

Несмотря на разнообразие синаптических связей, в подсистеме вставочных нейронов используется ограниченное количество нейромедиаторов. В результате, фармакологически воздействуя на них, можно существенно изменить общую возбудимость нервной системы, что и наблюдается, например, при действии стрихнина.

2. Диффузные (неспецифические) системы – к ним относятся нейронные сети ретикулярной формации мозга. При этом тела клеток входят в состав относительно немногочисленных (в мозге человека насчитывается около 40 ядер) компактных скоплений. Отростки нейронов ретикулярной формации тонкие, немиелинизированные, часто ветвятся и меняют направление, следуя как в восходящем, так и в нисходящем направлении. На нейронах ретикулярной формации конвергируют различные афферентные сигналы, в то же время ветви *одного* нейрона могут иннервировать *несколько функционально различных* частей ЦНС.

В качестве нейромедиаторов диффузные системы используют различные моноамины – норадреналин, серотонин и, главное, дофамин.

На протяжении аксонов моноаминергических нейронов существуют многочисленные расширения (аксоны *en passant*), содержащие большое количество синаптических пузырьков, обеспечивающих *диффузное* выделение нейромедиатора. Важным следствием подобной организации является то, что клеточные мишени действия медиатора определяются местоположением их рецепторов, а не источника их синтеза.

В связи с этим диффузные системы не могут и не являются передатчиками специфической топографической информации. Они опосредуют генерализованные восходящие тонические влияния (возбуждающие и тормозные), направленные на регуляцию активности коры больших полушарий, вовлечены в регуляцию процессов сна и бодрствования, эмоциональных состояний.

ТИПЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ

В развитие концепции объемной передачи сигнала было предложено разделить всю совокупность сигналов, воспринимаемых клетками нервной системы, на два класса (L. F. Agnati et al., 1994):

1. Специфические сигналы – для их распознавания в клетке должны существовать специальные структуры, взаимодействующие с ними за счет высокоаффинного связывания, т. е. рецепторы. В эту группу входят нейромедиаторы и нейромодуляторы, высвобождаемые ограниченным количеством групп нервных клеток.

2. Общедоступные сигналы – генерируются и распознаются (декодируются) всеми нервными клетками, например, электрические сигналы.

Заметим, что такие общебиологические факторы, как температура, вне- и внутриклеточная концентрация H^+ (pH), способны оказывать модулирующее влияние на процессы генерации сигнала и на процессы его восприятия и распознавания.

Более того, указанные физические и физико-химические начала с легкостью могут быть отнесены к группе общедоступных сигналов в самом широком понимании, поскольку практически любая клетка способна реагировать на изменение температуры или pH.

ГАЗООБРАЗНЫЕ НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ: МОНООКСИД АЗОТА (NO)

Монооксид азота (NO) – первое газообразное вещество, для которого было показано участие в процессах межклеточной коммуникации. Поскольку монооксид азота – это газ, который легко растворяется как в воде, так и в жирах, он не может накапливаться и храниться в синаптических пузырьках. Косвенным следствием этого является тот факт, что NO не высвобождается посредством Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза везикул, а просто диффундирует из цитозоля, где он синтезируется, во внеклеточное пространство. При этом выделение газа не привязано к какой-либо части нервной клетки.

В качестве паракринного передатчика сигнала монооксид азота впервые был охарактеризован в 1980 г. Р. Фернхот и Дж. Завадский (R. F. Furchgott, J. V. Zawadski, 1980) впервые показали, что т. н. эндотелиальный фактор, расслабляющий сосуды (**endothelium-derived relaxing factor, EDRF**), есть NO. Взаимодействие АХ с поверхностными рецепторами клеток эндотелия приводит к синтезу в них монооксида азота, диффундирующего к прилежащим гладкомышечным клеткам стенки сосуда, вызывая их расслабление, т. е. расширение кровеносного сосуда. Представления о роли NO как нейромодулятора сформировались только в конце 80-х гг. XX в. (J. Garthwaite et al., 1989), когда были получены доказательства его действия в нервной ткани.

Локализация NO-ергических нейронов в ЦНС. Существует целый ряд трудностей, наличие которых в течение длительного времени осложняло картирование NO-продуцирующих нейронов. Прежде всего, NO не хранится в синаптических пузырьках, он синтезируется «по мере надобности» в ответ на поступающие извне сигналы, его концентрация крайне мала, время жизни также невелико, что затрудняет уже прямое детектирование *in vivo*. В большинстве случаев в качестве маркера возможной продукции NO клетками выступает NADPH-диафораза, один из ко-факторов синтеза монооксида азота. Клонирование нейронной формы *NO-синтазы* (фермента, ответственного за выработку NO) позволило получить специфичные антитела к ней, а также использовать методику гибридизации РНК *in situ*. Кроме того, эффективным способом картирования NO-ергических нейронов является использование флуоресцентных красителей, способных специфически связываться с молекулой монооксида азота.

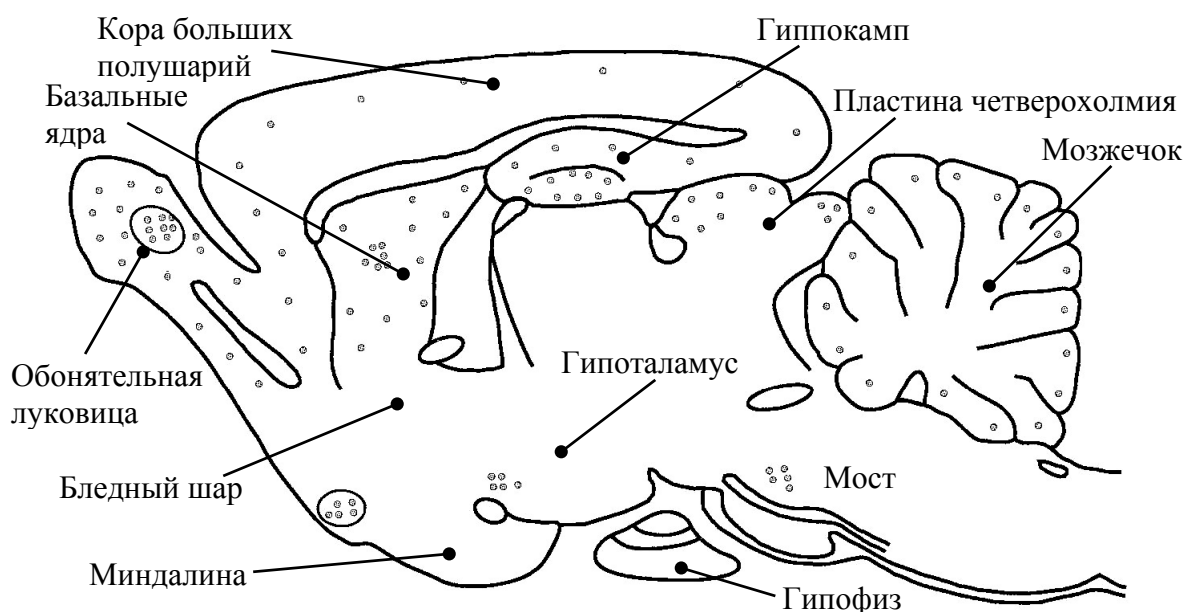


Рис. 101. Распределение нейронов с NO-синтазной активностью в мозге крысы

В ЦНС удается выявить все три формы NO-синтазы (см. далее). Нитергические клетки широко представлены среди нейронов обонятельной луковицы, гипоталамуса (супраоптическое ядро), а также в составе коры больших полушарий, гиппокампа, базальных ядер (хвостатое ядро и скорлупа), пластины четверохолмия среднего мозга, мозжечка и ядер ствола (рис. 101).

Имеются свидетельства о продукции NO клетками глии, а также его ко-локализации с ГАМК и нейропептидом Y.

Метаболизм NO. Монооксид азота образуется в результате двустадийного окисления гуанидинового атома азота в молекуле незаменимой аминокислоты L-аргинина. Промежуточным продуктом реакции является N-ω-гидрокси-L-аргинин, распадающийся с образованием одной молекулы цитруллина и монооксида азота (рис. 102).

Продукция NO в мозге не особенно интенсивна – пмоль/мин/мг общего белка. Протекание реакции синтеза обеспечивает фермент NO-синтаза (NOS).

Существует три основные изоформы данного фермента: нейронная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). При этом активность первых двух форм регулируется внутриклеточными ионами кальция. При повышении их концентрации происходит образование комплекса кальция с кальмодулином, который, взаимодействуя с NO-синтазой, переводит ее в активное состояние. Для нормального протекания реакции требуется также ряд кофакторов – NADPH и кислород. Снижение уровня кальция в клетке приводит к терминации синтеза монооксида азота в нейронах и эндотелии.

Индукцибельная форма NOS встречается в клетках периферической крови, выполняющих защитную функцию (макрофаги). Благодаря своим свободно-радикальным свойствам NO в данном случае выступает в роли цитотоксического агента.

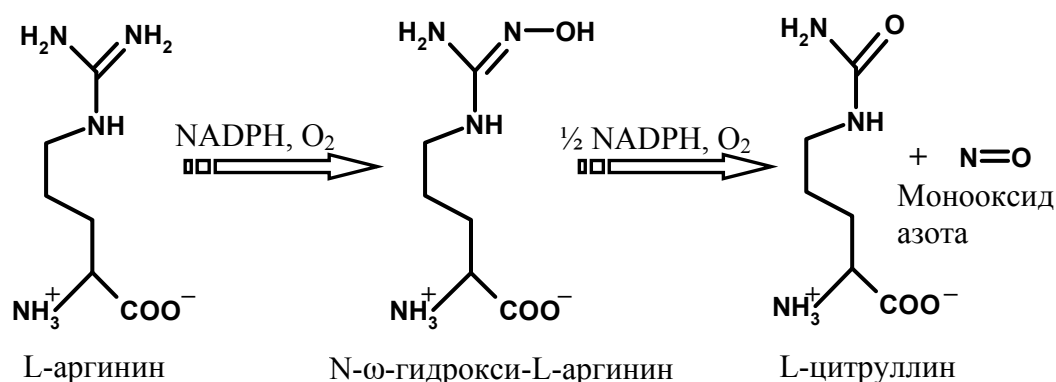


Рис. 102. Биосинтез монооксида азота

В мозге повышение внутриклеточной концентрации кальция происходит вследствие предварительной активации NMDA-рецепторов. Напротив, в клетках эндотелия реализуется механизм, связанный со стимуляцией фосфолипазы C и активацией IP_3 /DAG-пути. Выделяемый клеткой NO связывается со своими мишенями, а его избыток быстро инактивируется при взаимодействии с кислородом или супероксид-анионом – время жизни свободного NO исчисляется несколькими секундами. Монооксид азота способен образовывать комплексы с белками крови, в частности с гемоглобином, и это еще один путь его инактивации. Заметим, что для газообразных нейромодуляторов не существует специальной системы обратного захвата или распада.

|| Из NO может образовываться пероксинитрит – крайне реакционное соединение, способное индуцировать свободно-радикальные реакции и обладающее выраженными нейротоксическими свойствами.

Механизм внутриклеточной передачи сигнала. Монооксид азота легко проникает через мембраны любых клеток. Таким образом, он не связывается ни с какими рецепторами на поверхности клетки, а взаимодействует непосредственно с внутриклеточными белками. Основной мишенью действия NO в клетке является растворимая гуанилатциклаза, катализирующая образование цГМФ из ГТФ. Связывание монооксида азота с гемом гуанилатциклазы приводит к изменениям конформации последней, что и лежит в основе ее активации. Образующийся цГМФ, в свою очередь, стимулирует цГМФ-зависимую протеинкиназу, способную фосфорилировать многочисленные белки, в том числе белки ионных каналов.

|| В частности, в клетках гладких мышц фосфорилирование посредством цГМФ-зависимой протеинкиназы модулирует активность K^+ - и Ca^{2+} -каналов, а также кальциевых насосов, что приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция и опосредует расслабление мышцы.

Активность многих гем-содержащих ферментов, например циклооксигеназы I и II, липооксигеназы, модулируется при их взаимодействии с NO. Кроме того, регулирующим влиянием со стороны монооксида азота подвержены ферменты, содержащие Fe–S-кластеры: *цис*-аконитаза, комплексы I и II электронтранспортной цепи митохондрий. Монооксид азота также способен нитрировать и/или нитрозировать тиоловые компоненты белков, в том числе из состава различных внутриклеточных протеинов (аденилатциклаза, протеинкиназа C, белки SNAP) и рецепторов (NMDA-рецепторы).

Биологические эффекты монооксида азота. Благодаря своим особенностям NO является активным участником несинаптических взаимо-

действий, опосредуя передачу сигнала на большие, по сравнению с шириной синаптической щели, расстояния.

В пределах ЦНС монооксид азота участвует в регуляции мозгового кровообращения, высвобождении нейромедиаторов и нейромодуляторов, процессах нейрогенеза и синаптической пластичности. Особенно стоит отметить роль NO в развитии долговременной потенциации (ДВП) в нейронах коры больших полушарий и гиппокампа, а также долговременной депрессии (ДВД) в нейронах мозжечка. При этом монооксид азота выступает в роли ретроградного передатчика сигнала – выделяясь из постсинаптической клетки, он диффундирует по межклеточному пространству, в том числе и к пресинаптической терминали, поддерживая ДВП (ДВД) за счет влияния на процессы высвобождения нейромедиатора.

Помимо NO-зависимой формы ДВП существуют некоторые долговременные изменения синаптической передачи, которые не подвержены регуляторному влиянию монооксида азота (NO-независимая ДВП).

Известно и о нейропротекторных свойствах монооксида азота. Так, нейроны, содержащие NO-синтазу, устойчивее к нейротоксическому действию глутамата.

С другой стороны, гиперпродукция NO, например, при развитии кислородного голодания (ишемии) мозга, может вызывать повреждение расположенных рядом с источником его синтеза клеток.

ГАЗООБРАЗНЫЕ НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ: МОНООКСИД УГЛЕРОДА (CO) И СУЛЬФИД ВОДОРОДА (H₂S)

Роль других эндогенных газообразных веществ в регуляции процессов межклеточной коммуникации менее значима, нежели NO.

Монооксид углерода. Образование CO катализируется гемоксидазой (HO), активирующейся при фосфорилировании протеинкиназой C. При этом монооксид углерода является побочным продуктом реакции распада гема до биливердина. Известно о существовании двух изоформ гемоксидазы:

- **эндотелиальная (HO₁):** индуцибельный фермент, ответственный за распад гема. Его экспрессия возрастает в ответ на аккумуляцию гема и при действии окислительного стресса;
- **нейронная (HO₂):** конститутивный фермент, встречается в мозге.

Как и NO, монооксид углерода легко проникает через клеточные мембраны, связывается с железом гема в гуанилатциклазе, активируя ее и

стимулируя продукцию цГМФ. Считается, что распределение NO_2 примерно соответствует таковому для NO-синтазы с максимальным присутствием в нейронах гиппокампа (пирамидные и гранулярные клетки). Кроме того, она присутствует в первичных сенсорных нейронах обонятельного эпителия.

|| Многие одоранты реализуют свое действие посредством CO-зависимого повышения уровня цГМФ.

Монооксид углерода выступает в качестве ретроградного передатчика при развитии ДВП. Он также модулирует работу глутаматергических систем мозга, участвует в регуляции хемосенсоров каротидных телец, вызывает вазодилатацию.

Сульфид водорода. Эндогенный H_2S образуется из аминокислоты цистеина под действием пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов: *цистатион β-синтазы* (CBS) и *цистатион γ-лиазы* (CSE).

|| В настоящее время нельзя с уверенностью сказать, в какой форме сульфид водорода активен в тканях: H_2S , HS^- или S^{2-} . Поэтому термин «сульфид водорода» одинаково применим ко всем формам. В физиологических растворах одна треть сульфида водорода существует в недиссоциированной форме (H_2S), а другие две трети приходятся на долю HS^- .

Относительно высокая экспрессия CBS наблюдается в нейронах гиппокампа и мозжечка по сравнению с клетками коры больших полушарий и ствола мозга. В то же время лишь ничтожные количества мРНК, кодирующей CSE (сам ген локализован у человека в 21 хромосоме), детектируются в ткани головного и спинного мозга, а сам фермент даже не обнаруживается при Northern-блот анализе.

Поступление цистеина в клетку опосредовано функционированием глутамат-цистеинового транспортера. Высокие внеклеточные концентрации глутамата блокируют его работу, а следовательно, снижают продукцию клеткой сульфида водорода. В норме продукция H_2S в гомогенатах мозга составляет около 20 нмоль/мин/G-белок. В результате эндогенная концентрация H_2S в мозге достигает уровня в 50–160 мкМ. В отличие от NO и CO, сульфид водорода не увеличивает уровень цГМФ, а напрямую взаимодействует с участками белков, содержащих дисульфидные связи, в частности, в NMDA-рецепторах, или свободные тиоловые группы.

Известно, что высокие концентрации H_2S (>320 мкМ) угнетают синаптическую передачу в гиппокампе. В то же время в физиологических концентрациях дисульфид водорода облегчает ДВП в гиппокампальных нейронах за счет усиления ответов, опосредованных активацией NMDA-рецепторов.

КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ РАВНОВЕСИЕ (pH) И ТЕМПЕРАТУРА КАК ФАКТОРЫ ОБЪЕМНОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА¹

В ЦНС тканевый ацидоз является одним из следствий ишемии мозга или развития различных воспалительных процессов (P. Lipton, 1999), а то, что даже малые сдвиги уровня pH способны вызвать выраженные изменения возбудимости нервных клеток, не вызывает сомнений (C. J. Schwiening, 2003).

|| В ходе тканевого ацидоза значение внеклеточного pH может снижаться более чем на две единицы по сравнению с исходным уровнем.

Помимо этого, сообщалось о модулирующем влиянии уровня pH на электрофизиологические характеристики Ca^{2+} -токов, а следовательно, и функционирование кальциевых каналов (M. Morad, 1988), натриевых каналов (S. Kellenberger, L. Schild, 2002), ГАМК-управляемых хлорных каналов (M. Pasternack et al., 1996) и др. Совершенно очевидно, что эти данные свидетельствуют о вовлеченности синаптических механизмов (пре- и постсинаптических составляющих) в ответную реакцию организма на сдвиги внеклеточного pH. В частности, падение pH выражено подавляет дофамин- и пептидергическую передачу в нервной системе беспозвоночных (рис. 103).

Изменение величины pH, а особенно закисление внеклеточной среды, приводит к активации открытых в начале 80-х гг. XX в. (O. A. Krishtal, V. I. Pidoplichko, 1980) кислоточувствительных ионных каналов (*acid-sensing ion channels*, ASIC), широко представленных в сенсорных нейронах спинно-мозговых ганглиев, нейронах ЦНС и клетках глии (олигодендроциты). Падение pH приводит к открытию этих неселективных катионных каналов ($\text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+$), изменяет возбудимость нейронной мембраны, что и опосредует реакцию соответствующей клетки.

Физиологическая роль ASIC остается до конца не выясненной, хотя не вызывает сомнений их вовлеченность в процессы, связанные с болевой чувствительностью (E. W. McCleskey, M. S. Gold, 1999). Возможно, сдвиги pH внутренней среды организма играют регуляторную роль, неодинаково модулируя работу функционально различных нейронных сетей и, как следствие, контролируемых ими форм поведенческой активности (A. V. Sidorov, 2003, 2006).

По-видимому, протон – это самый «простой» лиганд, вовлеченный в процессы межклеточной коммуникации, выступающий, по меньшей мере, в качестве нейромодулятора.

¹ В данный раздел включены результаты, полученные автором при выполнении работ по проектам, поддержанным БРФФИ (B02M-045, B02M-055).

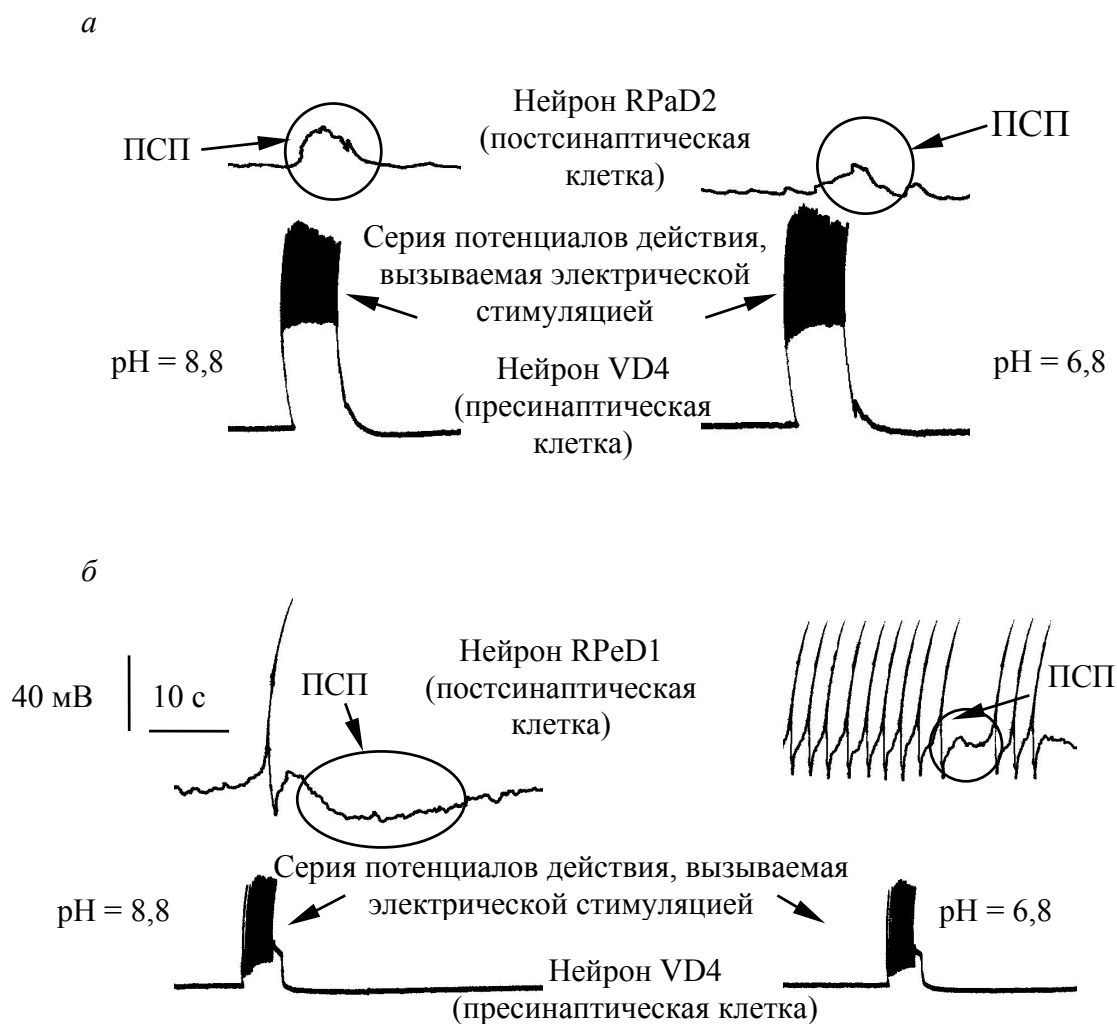


Рис. 103. Влияние pH на пептидергическую (FMRF-амид) моносинаптическую передачу в нервной системе моллюска *Lymnaea stagnalis*:
a – между нейронами VD4 и RPaD2; *б* – между нейронами VD4 и RPeD1.
 Деполяризационное направление ПСП (*a*) объясняется диффузией Cl^- из микроэлектрода и, как следствие, изменением потенциала инверсии для хлора

Абиотические внешние факторы, например температура, также способны радикально изменить протекание процессов межклеточной коммуникации, прежде всего синаптической передачи. Очевидно, что любой из этапов химической передачи сигнала подвержен модулирующему влиянию температуры.

В то же время различные нейромедиаторные системы демонстрируют неодинаковую температурную зависимость эффективности синаптической передачи (рис. 104).

Проницаемость щелевых контактов также подвержена действию температурного фактора (см. гл. 6).

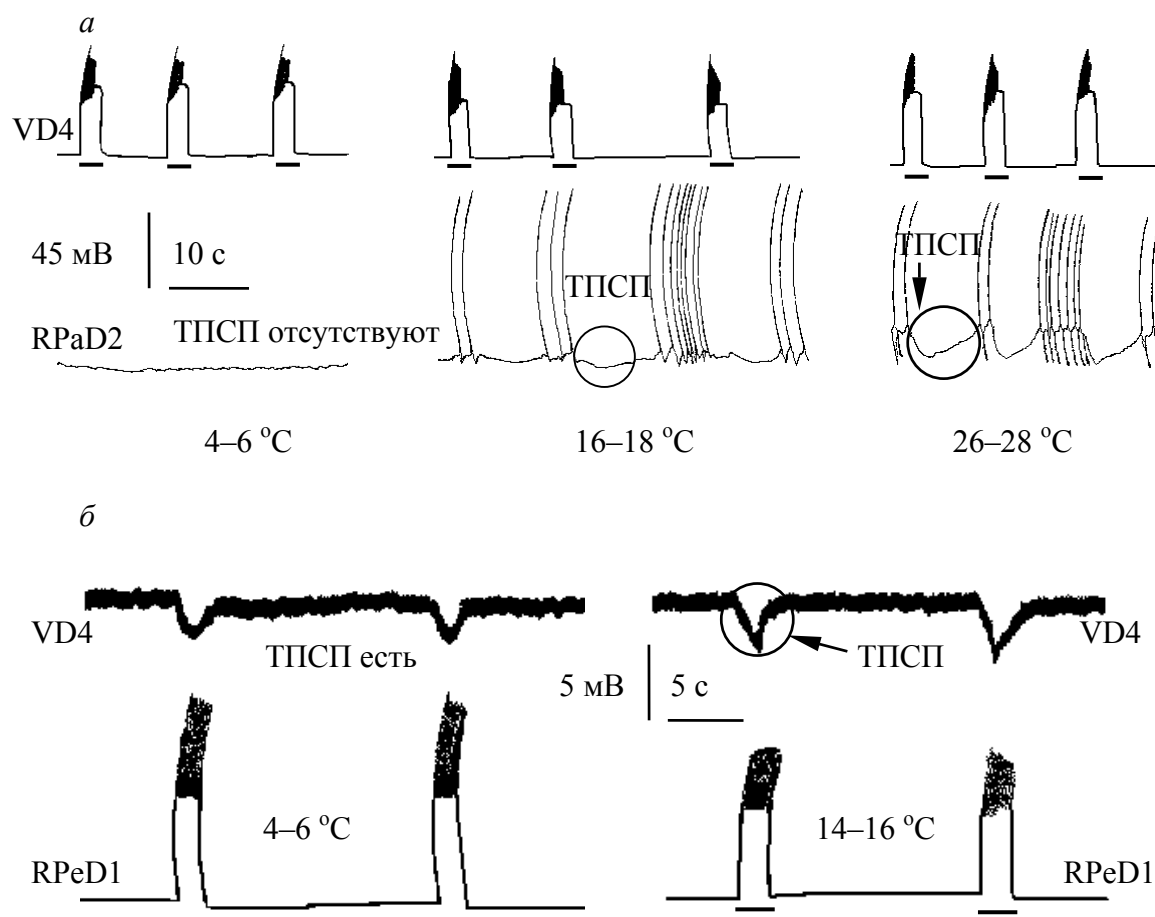


Рис. 104. Влияние температуры на пептидергическую (а) и дофаминергическую (б) моносинаптическую передачу в нервной системе моллюска *Lymnaea stagnalis* (по А. V. Sidorov, 2002). Деполаризирующий импульс тока в пресинаптический нейрон отмечен чертой

Таким образом, генерализованные влияния факторов объемной передачи сигнала реализуются посредством одномоментного вовлечения в ответную реакцию множества компонентов нейронных сетей.

ПОСЛЕСЛОВИЕ

По-прежнему остается неясным, почему в пределах нервной системы, даже на самых простых уровнях ее организации, имеется такое количество медиаторов в составе обособленных нейронных сетей. В равной степени этот вопрос распространяется и на другие системы, вовлеченные в процессы межклеточной коммуникации.

Очевидно, что первичная функция любой сигнальной молекулы – это передача возбуждения или торможение активности той или иной клетки, мишени ее действия. Этого можно с успехом достичь, используя только два или даже один медиатор. Ответ на этот вопрос может дать гипотеза **полигенеза нервной ткани** (Д. А. Сахаров, 1974), согласно которой предполагается множественное и независимое происхождение нейронов от различных клеточных линий, каждая со своими специфическими медиаторами.

Дальнейшие исследования физиологии межклеточных взаимодействий и роли сигнальных молекул позволят объяснить работу множественных клеточных ансамблей, в частности, нейронных сетей, обеспечивающих реализацию различных форм жизнедеятельности. При этом значительно возрастает роль сравнительно-нейрофизиологических исследований, поскольку именно появление в ходе эволюции оригинальных способов объединения клеток в систему лежит в основе появления новых форм нервной деятельности.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

Николс, Дж. Г. От нейрона к мозгу / Дж. Г. Николс [и др.]. М. : Едиториал УРСС, 2003. 672 с.

Bohlen und Halbach von, O. Neurotransmitters and neuromodulators / O. von Bohlen und Halbach, R. Dermietzel. Darmstadt : Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim, 2002. 285 p.

Neurotransmitters, drugs and brain function / ed. R. A. Webster. Chichester : J. Wiley and Sons Ltd., 2001. 520 p.

Дополнительная

Базисная и клиническая фармакология : в 2 т. / под ред. Б. Г. Катцунг. М.; СПб. : Бином-Невский диалект, 2000. Т. 1. 608 с.

Катц, Б. Нерв, мышца и синапс / Б. Катц. М. : Мир, 1969. 220 с.

Костюк, П. Г. Микроэлектродная техника / П. Г. Костюк. Киев : Наук. думка, 1960. 126 с.

Костюк, П. Г. Механизмы электрической возбудимости нервной ткани / П. Г. Костюк, О. А. Крышталь. М. : Наука, 1981. 204 с.

Кэндел, Э. Клеточные основы поведения / Э. Кэндел. М. : Мир, 1980. 599 с.

Марри, Р. Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. Т. 1. 384 с.

Магура, И. С. Проблема электрической возбудимости нейрональной мембраны / И. С. Магура. Киев : Наук. думка, 1981. 208 с.

Пёрвис, Р. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза / Р. Пёрвис. М. : Мир, 1983. 208 с.

Сахаров, Д. А. Генеалогия нейронов / Д. А. Сахаров. М. : Наука, 1973. 183 с.

Физиология человека : в 3 т. / под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. М. : Мир, 1996. Т. 1. 323 с.

Ходжкин, А. Нервный импульс / А. Ходжкин. М. : Мир, 1965. 108 с.

Хухо, Ф. Нейрохимия : основы и принципы / Ф. Хухо. М. : Мир, 1990. 384 с.

Шмидт-Ниельсен, К. Физиология животных. Приспособление и среда : в 2 кн. / К. Шмидт-Ниельсен. М. : Мир, 1982. Кн. 2. 384 с.

Экклс, Дж. Физиология нервных клеток / Дж. Экклс. М. : Изд-во иностр. лит., 1959. 299 с.

Экклс, Дж. Физиология синапсов / Дж. Экклс. М. : Мир, 1966. 395 с.

Экклс, Дж. Тормозные пути центральной нервной системы / Дж. Экклс. М. : Мир, 1971. 168 с.

Alberts, B. Essential cell biology / B. Alberts [et al.]. New York and London : Garland Publishing Inc., 1998. 740 p.

Hille, B. Ionic channels of excitable membranes / B. Hille. Sunderland, Mass. : Sinauer Assoc., 1992. 607 p.

Kandel, E. R. Principles of neural science / E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessel. New York : Prentice Hall, 2000. 1414 p.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Глава 1. Строение межклеточных контактов

Костюк, П. Г. Основные нервные процессы как фундамент эволюции нервной деятельности // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1979. Т. 15, № 3. С. 222–226.

Bruzzone, R., Ressot, C. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system // Eur. J. Neurosci. 1997. Vol. 9. P. 1–6.

De Lorenzo, A. J. The fine structure of synapses in the ciliary ganglion of the chick // J. Biophysic and Biochem. Cytol. 1960. Vol. 7. P. 31–36.

Gray, E. G. Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord // J. Anat. (L.) 1963. Vol. 97. P. 101–106.

Hamlyn, L. H. The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit // J. Anat. (L.) 1962. Vol. 96. P. 112–120.

Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C. et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions // Physiol. Rev. 2003. Vol. 83. P. 1359–1400.

Palade, G. E., Palay, S. L. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses // Anat. Rec. 1954. Vol. 118. P. 335.

Peters, A., Palay, S. L. The morphology of synapses // J. Neurocytol. 1996. Vol. 25. P. 687–700.

Глава 2. Транспорт веществ через мембрану

Aggarwal, S. K., MacKinnon, R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K1 channel // Neuron. 1996. Vol. 16. P. 1169–1177.

Aldrich, R. W. Voltage dependent gating of sodium channels: towards an integrating approach // Trends Neurosci. 1986. Vol. 9. P. 82–86.

Armstrong, C. M., Bezanilla, F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels // *Nature*. 1973. Vol. 242. P. 459–461.

Barry, D. M., Nerbonne, J. M. Myocardial potassium channels: Electrophysiological and molecular diversity // *Ann. Rev. Physiol.* 1996. Vol. 58. P. 363–394.

Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels // *Physiol. Rev.* 2000. Vol. 80. P. 555–592.

Catterall, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels // *Ann. Rev. Biochem.* 1995. Vol. 65. P. 493–531.

Catterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000. Vol. 16. P. 521–555.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction and selectivity // *Science*. 1998. Vol. 280. P. 69–76.

Edry-Schiller, J., Ginsburg, S., Rahamimoff, R. A chloride channel in isolated fused synaptosomes from *Torpedo* electric organ // *J. Physiol. (L.)*. 1991. Vol. 438. P. 627–647.

Edwards, G. Potassium channel modulation: What next? // *Curr. Res. Ion Channel Modulators*. 1998. Vol. 3. P. 163–164.

Favre, I., Moczydlowski, E., Schild, L. On the structural basis for ionic selectivity among Na^{+} , K^{+} , and Ca^{2+} in the voltagegated sodium channel // *Biophys. J.* 1996. Vol. 71. P. 3110–3125.

Hodgkin, A. L., Keynes, R. D. Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo* // *J. Physiol. (L.)*. 1955. Vol. 128. P. 28–42.

Hofmann, F., Biel, M., Flockerzi, V. Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity // *Ann. Rev. Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 399–418.

Lauger, P. Ionic channels with conformational substrates // *Biophys. J.* 1985. Vol. 47. P. 581–590.

Marban, E., Yamagishi, T., Tomaselli, G. Structure and function of voltage-gated sodium channels // *J. Physiol.* 1998. Vol. 508 (3). P. 647–657.

MacKinnon, R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltageactivated potassium channel // *Nature*. 1991. Vol. 350. P. 232–235.

MacKinnon, R. Pore loops: An emerging theme in ion channel structure // *Neuron*. 1995. Vol. 14. P. 889–892.

Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A. et al. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. P. 1019–1088.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T. et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence // *Nature*. 1984. Vol. 312. P. 121–127.

Shieh, C-C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., Gopalakrishnam, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities // Pharmacol. Rev. 2000. Vol. 52. P. 557–593.

Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // Biochim. Biophys. Acta. 1957. Vol. 23. P. 394–401.

Skou, J. C. The Na, K pump // Methods Enzymol. 1988. Vol. 156. P. 1–25.

Spafford, J. D., Zamponi, G. W. Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery // Curr. Opin. Neurobiol. 2003. Vol. 13. P. 308–314.

Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H. et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel // Nature. 1989. Vol. 339. P. 597–603.

Westenbroek, R. E., Hoskins, L., Catterall, W. A. Localization of Ca^{2+} channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals // J. Neurosci. 1998. Vol. 18. P. 6319–6330.

Yamagishi, T., Li, R.A., Hsu, K., Marban E., Tomaselli, G. F. Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: Functional evidence for α helices in the pore // J. Gen. Physiol. 2001. Vol. 118. P. 171–181.

Yang, N., George, A., Horn, R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels // Neuron. 1996. Vol. 16. P. 113–122.

Глава 3. Электрические сигналы клеток

Curtis, H. J., Cole, K.S. Membrane resting and action potentials from the squid giant axon // J. Cell. Comp. Physiol. 1942. Vol. 19. P. 135–144.

Gasser, H. S., Grundfest, H. Axon diameters in relation to the spike dimension and the conduction velocity in mammalian A-fibres // Am. J. Physiol. 1939. Vol. 137. P. 393.

Graham, J., Gerard, R. W. Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibres // J. Cell. Comp. Physiol. 1946. Vol. 28. P. 99–117.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. Action potentials recorded from inside a nerve fibre // Nature. 1939. Vol. 144. P. 710–711.

Hodgkin, A. L., Rushton, W. A. H. The electrical constants of crustacean nerve fibre // Proc. Roy. Soc. B. 1946. Vol. 133. P. 444.

Huxley, A. F., Stampfli, R. Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres // J. Physiol. (L.). 1949. Vol. 108. P. 315.

Katz, B. Electrical properties of the muscle fibre membrane // Proc. Roy. Soc. B. 1948. Vol. 135. P. 506.

Глава 4. Ионные механизмы формирования мембранного потенциала и потенциала действия

Cole, K. S., Curtis, H. J. Electric impedance of the squid giant axon during activity // J. Gen. Physiol. 1939. Vol. 22. P. 649–670.

Cole, K. S., Hodgkin, A. L. Membrane and protoplasmic resistance in the squid giant axon // J. Gen. Physiol. 1939. Vol. 22. P. 671–687.

Baker, P. F., Hodgkin, A. L., Shaw, T. I. Replacement of the axoplasm of the giant nerve fibres with artificial solutions // *J. Physiol. (L.)*. 1952b. Vol. 164. P. 330–354.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol. (L.)*. 1952a. Vol. 116. P. 449–472.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol. (L.)*. 1952b. Vol. 116. P. 473–496.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol. (L.)*. 1952c. Vol. 116. P. 497–506.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *J. Physiol. (L.)*. 1952d. Vol. 117. P. 500–544.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B. Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol. (L.)*. 1952. Vol. 116. P. 424–448.

Hodgkin, A. L., Katz, B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid // *J. Physiol. (L.)*. 1949. Vol. 108. P. 37–77.

Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J. H. The extracellular patch clamp: A novel method of resolving currents through individual open channels biological membranes // *Pflugers Arch.* 1978. Vol. 375. P. 219–228.

Глава 5. Пресинаптические механизмы передачи сигнала

Attwell, D., Barbour, B., Szatkowski, M. Nonvesicular release of neurotransmitter // *Neuron*. 1993. Vol. 11. P. 401–407.

Augustine, G. J. How does calcium trigger neurotransmitter release? // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001. Vol. 11. P. 320–326.

Benfanati, F., Onofri, F., Giovedi, S. Protein-protein interactions and proteins modules in the control of transmitter release // *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 1999. Vol. 354. P. 243–257.

Bennett, M. K., Calakos, N., Scheller, R. H. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones // *Science*. 1992. Vol. 257. P. 255–259.

Bergsman, J.B., Tsien, R. W. Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1 // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20. P. 4368–4378.

Calakos, N., Scheller, R. H. Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description // *Physiol. Rev.* 1996. Vol. 76. P. 1–29.

Del Castillo, J., Katz, B. The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings // *J. Physiol. (L.)*. 1954a. Vol. 124. P. 553–559.

Del Castillo, J., Katz, B. Quantal components of the end-plate potential // *J. Physiol. (L.)*. 1954b. Vol. 124. P. 560–573.

Del Castillo, J., Katz, B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression // *J. Physiol. (L.)*. 1954c. Vol. 124. P. 574–585.

Del Castillo, J., Katz, B. Changes in end-plate activity produced by pre-synaptic polarization // J. Physiol. (L.). 1954d. Vol. 124. P. 586–604.

Eccles, J. C., Katz, B., Kuffler, S. W. Nature of the «end-plate potentials» in curarized muscle // J. Neurophysiol. 1941. Vol. 4. P. 362–387.

Fatt, P., Katz, B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode // J. Physiol. (L.). 1951. Vol. 115. P. 320–370.

Fatt, P., Katz, B. Spontaneous subthreshold potentials at motor nerve endings // J. Physiol. (L.). 1952. Vol. 117. P. 109–128.

Fatt, P., Katz, B. The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean nerve fibre // J. Physiol. (L.). 1953. Vol. 121. P. 374–389.

Heuser, J. M., Reese, T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction // J. Cell. Biol. 1973. Vol. 57. P. 315–314.

Heuser, J. M., Reese, T. S., Dennis, M. J. et al. Synaptic vesicle exocytosis capture by quick freezing and correlated with quantal transmitter release // J. Cell. Biol. 1979. Vol. 81. P. 275–300.

Hosaka, M., Sudhof, T. C. Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca^{2+} // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 13371–13374.

Hurlbut, W. P., Ceccarelli, B. Transmitter release and recycling of synaptic vesicle membrane at the neuromuscular junction // Advances in Cytopharmacol. 1974. Vol. 2. P. 141–154.

Katz, B., Miledi, R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission // J. Physiol. (L.). 1967. Vol. 189. P. 535–544.

Katz, B., Miledi, R. The release of acetylcholine from nerve endings by graded pulses // Proc. R. Soc. (L.). 1967. Vol. 167. P. 23–38.

Katz, B., Miledi, R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses // J. Physiol. (L.). 1967. Vol. 192. P. 407–436.

Katz, B., Miledi, R. Tetrodotoxin-resistant electric activity in presynaptic terminals // J. Physiol. (L.). 1969. Vol. 203. P. 459–487.

Katz, B., Miledi, R. The effects of divalent cations on transmission in the squid giant synapse // Pubbl. Sin. Zool. Napoli. 1969. Vol. 37. P. 303–310.

Katz, B., Miledi, R. Further study of the role of calcium in synaptic transmission // J. Physiol. (L.). 1970. Vol. 207. P. 789–801.

Katz, B., Miledi, R. Further observations on acetylcholine noise // Nature New Biol. 1971. Vol. 232. P. 124–126.

Katz, B., Miledi, R. The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components // J. Physiol. (L.). 1972. Vol. 224. P. 665–699.

Kelly, R. B., Grote, E. Protein targeting in neurons // Ann. Rev. Physiol. 1993. Vol. 16. P. 95–127.

Littleton, J. T., Bellen, H. J. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in Ca^{2+} dependent manner // Trends Neurosci. 1995. Vol. 18. P. 117–183.

Llinas, R., Nicholson, C. Calcium role in depolarization-secretion coupling: An aequorin study in squid giant synapse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72. P. 187–190.

Ringer, S. Role of calcium in the contraction of isolated rat hearts // *J. Physiol. (L.).* 1883. Vol. 4. P. 29–43.

Pieribone, V. A., Shupliakov, O., Brodin, L. et al. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release // *Nature.* 1995. Vol. 375. P. 493–497.

Sollner, T., Rothman, J.E. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse // *Trends Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 344–348.

Valtorna, F., Benfenati, F., Greengard, P. Structure and function of the synapsins // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 7195–7198.

Werning, A. Changes in statistical parameters during facilitation at the crayfish neuromuscular junctions // *J. Physiol. (L.).* 1972. Vol. 226. P. 751–759.

Zucker, R. S. Changes in the statistics of transmitter release during facilitation // *J. Physiol. (L.).* 1973. Vol. 229. P. 787–810.

Глава 6. Постсинаптические механизмы передачи сигнала

Barrionuevo, G., Brown, T. H. Associative long-term potentiation in hippocampal slices // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. Vol. 80. P. 7347–7351.

Bliss, T.V.P., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path // *J. Physiol. (L.).* 1973. Vol. 232. P. 331–356.

Castellucci, V., Kandel, E.R. Quantal analysis of heterosynaptic facilitation underlying dishabituation in *Aplysia* // *Fed. Proc.* 1975. Vol. 34. P. 418.

Dudel, J., Kuffler, S.W. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction // *J. Physiol. (L.).* 1961. Vol. 155. P. 543–562.

Dudel, J. The mechanism of presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction // *Pflugers Arch.* 1965. Vol. 248. P. 66–80.

Eccles, J. C., Jaeger, J. C. The relationship between the mode of operation and the dimensions of the junctional region at synapses and motor end-organs // *Proc. R. Soc. B.* 1958. Vol. 148. P. 38–56.

Furshpan, E. J., Potter, D. D. Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish // *Nature.* 1957. Vol. 180. P. 342–343.

Furshpan, E. J., Potter, D. D. Transmission at the giant synapses of the crayfish // *J. Physiol. (L.).* 1959. Vol. 145. P. 289–325.

Furucawa, T., Furshpan, E. J. Two inhibitory mechanisms in the Mauthner neurons of goldfish // *J. Neurophysiol.* 1963. Vol. 26. P. 140–176.

Katz, B., Miledi, R. The role of calcium in neuromuscular facilitation // *J. Physiol. (L.).* 1968. Vol. 195. P. 481–491.

Linden, D. J., Conner, J. A. Long-term synaptic depression // *Ann. Rev. Neurosci.* 1995. Vol. 18. P. 319–357.

Magleby, K. L., Zengel, J. E. Long term changes in augmentation, potentiation, and depression of transmitter release as a function of repeated synaptic activity at the frog neuromuscular junction // *J. Physiol. (L.)*. 1976. Vol. 257. P. 447–470.

Magleby, K. L., Zengel, J. E. A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction // *J. Gen. Physiol.* 1982. Vol. 80. P. 613–638.

Martin, A. R., Pilar, G. Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion // *J. Physiol. (L.)*. 1963. Vol. 168. P. 443–463.

Martin, A. R., Pilar, G. Transmission through the ciliary ganglion of the chick // *J. Physiol. (L.)*. 1963. Vol. 168. P. 464–475.

Redman, R. S., Silinsky, E. M. ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings // *J. Physiol. (L.)*. 1994. Vol. 477. P. 117–127.

Sidorov, A. V., Kazakevich, V. B. Electrical coupling between identified *Lymnaea neurons*: Nitric monoxide and temperature action // *Protein Modules in Cellular Signalling. NATO Science Series: Life Sciences*. 2001. Vol. 318. P. 150–153.

Takeuchi, A., Takeuchi, N. Active phase of frog's end-plate potential // *J. Neurophysiol.* 1959. Vol. 22. P. 395–411.

Takeuchi, A., Takeuchi, N. On the permeability of the end-plate membrane during the action of transmitter // *J. Physiol. (L.)*. 1960. Vol. 154. P. 52–67.

Takeuchi, A., Takeuchi, N. Further analysis of relationship between end-plate potential and end-plate current // *J. Neurophysiol.* 1960. Vol. 23. P. 397–402.

Takeuchi, A., Takeuchi, N. Changes in potassium concentration around motor nerve terminals, produced by current flow, and their effects on neuromuscular transmission // *J. Physiol. (L.)*. 1961. Vol. 155. P. 46–58.

Takeuchi, A., Takeuchi, N. Electrical changes in pre- and post-synaptic axons of the giant synapse of *Loligo* // *J. Gen. Physiol.* 1962. Vol. 45. P. 1181–1193.

Weight, F. E., Votava, J. Slow synaptic excitation in sympathetic ganglion cells: Evidence for synaptic inactivation of potassium conductance // *Science*. 1970. Vol. 170. P. 755–758.

Weinrich, D. Ionic mechanisms of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog // *J. Physiol. (L.)*. 1970. Vol. 212. P. 431–446.

Глава 7. Сигнальные механизмы действия веществ

Baidwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G-protein-coupled receptors // *EMBO J.* Vol. 12. P. 1693–1703.

Berridge, M. J. Neuronal calcium signalling // *Neuron*. 1998. Vol. 21. P. 13–315.

Berridge, M. J. Inositol triphosphate and calcium signaling // *Nature*. 1993. Vol. 362. P. 361–315.

Cooper, D. M. F., Schell, M. J., Thorn, P., Irvine, R. F. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 27703–27707.

Ehrlich, P. Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results // *Lancet*. 1913. Vol. 2. P. 445–451.

Ghosh, A., Greenberg, M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences // *Science*. 1995. Vol. 268. P. 239–247.

Gilman, A. G. G proteins: Transducers of receptor-generated signals // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56. P. 615–649.

Hamm, H. E. The many faces of G protein signaling // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 669–672.

Hille, B. Modulation of ion channel function by G protein-coupled receptors // *Trends Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 531–536.

Ikeda, S. R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G protein $\beta\gamma$ subunits // *Nature*. 1996. Vol. 380. P. 255–258.

Ji, T. H., Grossmann, M., Ji, I. G protein-coupled receptors // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 17299–17302.

Kurachi, Y. G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel // *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 269. P. C821–C830.

Langley, J. N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari // *J. Physiol. (L.)*. 1905. Vol. 33. P. 374–413.

Lucas, K. A., Pitary, G. M., Kazerounian, S. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP // *Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52. P. 375–413.

Mons, N., Cooper, D. M. F. Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling // *Trends Neurosci.* 1995. Vol. 18. P. 536–542.

Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U. et al. Receptors for dopamine and somatostatin : formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity // *Science*. 2000. Vol. 288. P. 154–157

Sakmann, B., Noma, A., Trautwein, W. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart // *Nature*. 1983. Vol. 303. P. 250–253.

Simon, M. I., Strathmann, M. P., Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction // *Science*. 1991. Vol. 252. P. 802–808.

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. Small GTP-binding proteins // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. P. 153–208.

Wess, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity // *Pharmacol. Ther.* 1998. Vol. 80. P. 231–264.

Yamada, M., Inanobe, A., Kurachi, Y. G protein regulation of potassium ion channels // *Pharmacol. Rev.* 1998. Vol. 50. P. 723–757.

Глава 8. Нейромедиаторы и нейромодуляторы (общий обзор)

Асратян, Э. А. Рефлекторная теория высшей нервной деятельности / Э. А. Асратян. М., 1983.

Павлов, И. П. Полное собрание трудов. М. ; Л. 1949.

Bullock, G. R. Techniques in immunocytochemistry / G. R. Bullock, P. Petrusz. NY., 1982.

- Carlsson, A., Falck, B., Hillarp, N. A., Torp, A.* Histochemical localization at the cellular level of hypothalamic noradrenaline // *Acta Physiol. Scand.* 1962. Vol. 54. P. 385–386.
- Cajal, S., Ramon, Y.* Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. T. I, II. 1909–1911. Malorie, Paris.
- Coghlan, J. P., Aldred, P., Haralambidis, J. et al.* Hybridization histochemistry // *Anal. Biochem.* 1985. Vol. 149. P. 1–28.
- Curtis, D. R.* The pharmacology of central and peripheral inhibition // *Pharmacol. Rev.* 1963. Vol. 15. P. 333–363.
- Dale, H. H.* Pharmacology of nerve-endings // *Proc. R. Soc. Med.* 1935. Vol. 28. P. 319–322.
- Davenport, A. P., Hill, R. G., Hughes, J.* Quantitative analysis of autoradiograms // *Experimentia.* 1989. Vol. 56. P. 137–153.
- Dingledine, R.* Brain slices. NY.: Plenum Press, 1983.
- Goldsmith, S. J.* Radioimmunoassay: review of basic principles // *Semin. Nucl. Med.* 1975. Vol. 5. P. 125–152.
- Humpel, C., Ebendal, T., Olson, L.* Microdialysis: a way to study *in vivo* release of neurotropic bioactivity: a critical summary // *J. Mol. Med.* 1996. Vol. 74. P. 523–526.
- Kawata, M., Yuri, K., Sano, Y.* Localization and regulation of mRNAs in the nervous tissue as revealed by *in situ* hybridization // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1991. Vol. 98. P. 41–50.
- Mackintosh, N. J.* Conditioning and associative learning. Oxford: Clarendon, 1983.
- McDonald, A. J.* Neuroanatomical labeling with biocytin: a review // *NeuroReport.* 1992. Vol. 3. P. 821–827.
- McLennan, H.* Synaptic transmission. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1963.
- Molleman, A.* Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. Chichester: J. Wiley & Sons Ltd., 2003.
- Parson, L. H., Justice, J. B.* Quantitative approaches to *in vivo* brain microdialysis // *Crit. Rev. Neurobiol.* 1994. Vol. 8. P. 189–220.
- Paton, W. D. M.* Central and synaptic transmission in the nervous system (Pharmacological aspects) // *Ann. Rev. Physiol.* 1958. Vol. 20. P. 431–470.
- Quirion, R.* Bioassays in modern peptide research // *Peptides.* 1982. Vol. 3. P. 223–230.
- Sakman, B., Neher, E.* Single-channel recording. NY: Plenum Press, 1995.
- Simpson, R. C., Brown, P. R.* High-performance liquid chromatographic profiling of nuclei acid components in physiological samples // *J. Chromatogr.* 1986. Vol. 379. P. 269–311.
- Stumpf, W. E.* Localization of hormones by autoradiography and other histochemical techniques. A critical review // *J. Histochem. Cytochem.* 1970. Vol. 18. P. 21–29.
- Swanson, P. E.* Foundation of immunohistochemistry. A practical review // *Am. J. Clin. Pathol.* 1988. Vol. 90. P. 333–339.

Wachtel, H., Kandel, E. R. A direct synaptic connection mediating both excitation and inhibition // Science. 1967. Vol. 158. P. 1206–1208.

Zimmerman, R. P. Specific neuronal staining by *in vitro* uptake of Lucifer yellow // Brain. Res. 1986. Vol. 383. P. 287–298.

Глава 9. Нейромедиаторы: ацетилхолин, гистамин и серотонин

Aghajanian, G. K. Serotonin and the action of LSD in the brain // Psychiat. Ann. 1994. Vol. 24. P. 137–141.

Barnes, N.M., Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function // Neuropharmacol. 1999. Vol. 38. P. 1083–1152.

Birks, R., MacIntosh, F. Acetylcholine metabolism at nerve-endings // Brit. Med. Bull. 1957. Vol. 13. P. 157–161.

Birks, R., MacIntosh, F. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion // Canad. J. Biochem. 1961. Vol. 39. P. 787–827.

Boadle-Biber, M. C. Regulation of serotonin synthesis // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1993. Vol. 60. P. 1–15.

Boess, F. G., Martin, I. I. Molecular biology of 5-HT receptors // Neuropharmacol. 1994. Vol. 33. P. 275–317.

Caulfield, M. P., Birdsall, N. J. M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors // Pharmacol. Rev. 1998. Vol. 50. P. 279–290.

Chang, H., Gaddum, J. H. Choline esters in tissue extracts // J. Physiol. 1933. Vol. 79. P. 255–285.

9. Changeux, J. P., Bertrand, D., Corringer, P. J. et al. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement // Brain. Res. Rev. 1998. Vol. 26. P. 198–216.

Eglen, R. M., Watson, N. Selective muscarinic receptor agonists and antagonists // Pharmacol. Toxicol. 1996. Vol. 78. P. 59–78.

Gillman, P.K. The serotonin syndrome and its treatment // J. Psychopharmacol. 1999. Vol. 13. P. 100–109.

Hill, S. J. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor // Pharmacol. Rev. 1990. Vol. 42. P. 45–83.

Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H. et al. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors // Pharmacol. Rev. Vol. 49. P. 253–278.

Hulme, E. C., Birdsall, N. J. M., Buckley, N. J. Muscarinic receptor subtypes // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1990. Vol. 30. P. 633–673.

Jacobs, B. L., Azmitia, E.C. Structure and function of the brain serotonin system // Physiol. Rev. 1992. Vol. 72. P. 165–229.

Jones, R. S. G. Trace biogenic amines: a possible functional role in the CNS // Trends Pharmacol. Sci. 1983. Vol. 4. P. 426–429.

Jones, S., Sudweeks, S., Yakel, J. L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function // Trends Neurosci. 1999. Vol. 22. P. 555–562.

- Leibowitz, S. F., Alexander, J. T.* Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight // *Biol. Psychiatry*. 1998. Vol. 44. P. 851–864.
- Lindstrom, J. M.* Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease // *Mol. Neurobiol.* 1997. Vol. 15. P. 193–222.
- Loewi, O.* Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung // *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 1921. Vol. 187. P. 239–242.
- Loewi, O., Navratil, E.* Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung // *Pflügers Arch.* 1926. Vol. 214. P. 689–696.
- Maeda, T., Fujimiya, M., Kitahama, K. et al.* Serotonin neurons and their physiological roles // *Arch. Histol. Cytol.* 1989. Vol. 52. P. 113–120.
- Miyazawa, A., Fujioshi, Y., Unwin, N.* Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore // *Nature*. 2003. Vol. 423. P. 949–955.
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S., Airaksinen, M. S.* Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain // *Neuroscience*. 1989. Vol. 28. P. 585–610.
- Peroutka, S. J.* Molecular biology of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes // *Synapse*. 1994. Vol. 18. P. 241–260.
- Role, L. W., Berg, D. K.* Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses // *Neuron* 1998. Vol. 16. P. 1077–1085.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M. et al.* Histaminergic transmission in the mammalian brain // *Physiol. Rev.* 1991. Vol. 71. P. 1–51.
- Unwin, N.* Acetylcholine receptor channel imaged in the open state // *Nature*. 1995. Vol. 373. P. 37–43.
- Uphouse, L.* Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997. Vol. 21. P. 679–698.
- Venter, J. C.* Muscarinic cholinergic receptor structure // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 4842–4848.
- Wannacott, S.* Presynaptic nicotinic ACh receptors // *Trends Neurosci.* 1997. Vol. 20. P. 92–98.
- Watanabe, T., Wada, H.* Histaminergic neurons: morphology and function. 1991. CRC Press. Boca Raton.
- Wess, J.* Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors // *Crit. Rev. Neurobiol.* 1996. Vol. 10. P. 69–99.
- Woolf, N.J.* Cholinergic systems in mammalian brain and spinal chord // *Prog. Neurobiol.* 1991. Vol. 37. P. 475–524.
- Zifa, E., Fillion, G.* 5-Hydroxytryptamine receptors // *Pharmacol. Rev.* 1992. Vol. 44. P. 401–458.

Глава 10. Нейромедиаторы: катехоламины и аминокислоты

Катехоламины

- Ahlquist, R. P.* A study of the adrenotropic receptors // *Amer. J. Physiol.* 1948. Vol. 153. P. 586–600.
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Heible, J. P. et al.* IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of adrenoreceptors // *Pharmacol. Rev.* 1994. Vol. 46. P. 121–136.

Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. Catecholamine receptors: structure, function and regulation // *Recent Prog. Hormone Res.* 1993. Vol. 48. P. 277–290.

Cheramy, A., Leviel, V., Glowinski, J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra // *Nature.* 1981. Vol. 289. P. 537–542.

Dahlström, A., Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons // *Acta Physiol. Scand.* Vol. 62. P. 1–55.

Docherty, J. R. Subtypes of functional α_1 and α_2 -adrenoceptors // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 361. P. 1–15.

Foote, S. L., Bloom, F. E., Aston-Jones, G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity // *Physiol. Rev.* 1983. Vol. 63. P. 844–914.

Giros, B., Caron, M. G. Molecular characterization of the dopamine transporter // *Trends Pharmacol. Sci.* 1993. Vol. 14. P. 43–49.

Givelli, O., Bunzow, J. R., Grandy, D. K. Molecular diversity of dopamine receptors // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993. Vol. 32. P. 281–307.

Hadcock, J. R., Malbon, C. C. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors // *Ann. Rev. Neurosci.* 1993. Vol. 15. P. 87–114.

Hornykiewicz, O. Parkinson's disease and the adaptive capability of the nigrostriatal dopamine system // *Adv. Neurol.* 1993. Vol. 60. P. 140–147.

Kebabian, J. W., Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine // *Nature.* 1979. Vol. 277. P. 93–96.

McCormic, D. A., Pape, H. C., Williamson, A. Action of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system // *Prog. Brain Res.* 1991. Vol. 88. P. 293–305.

Milligan, G., Svoboda, P., Brown, C.M. Why are there so many adrenoceptor subtypes? // *Biochem. Pharmacol.* 1994. Vol. 48. P. 1059–1071.

Moore, R. Y., Bloom, F. E. Central catecholamine neuron systems, anatomy and physiology of the dopamine system // *Ann. Rev. Neurosci.* 1978. Vol. 1. P. 129–169.

Moore, R. Y., Bloom, F. E. Central catecholamine neuron system: anatomy and physiology // *Ann. Rev. Neurol.* 1979. Vol. 2. P. 113–168.

17. *Neff, N. H., Costa, E.* The influence of monoamine oxidase inhibition on catecholamine synthesis // *Life Sci.* 1966. Vol. 5. P. 951–959.

Papadopoulos, G. C., Parnavelas, J. C. Monoamine system in the cerebral cortex: evidence for anatomical specificity // *Prog. Neurobiol.* 1991. Vol. 36. P. 195–200.

Reith, M. E. A., Xu, C., Chen, N.-H. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter // *Eur. J. Pharmacol.* 1997. Vol. 324. P. 1–10.

Ruffolo, R. J., Hieble, J. P. α -Adrenoceptors // *Pharmac. Ther.* 1994. Vol. 61. P. 1–64.

Seeman, P., Van Tol, H. H. M. Dopamine receptor pharmacology // *Trends Pharmacol. Sci.* 1994. Vol. 15. P. 264–270.

Sibley, D. R., Monsma, F. J. Molecular biology of dopamine receptors // Trends Pharmacol. Sci. 1992. Vol. 17. P. 61–67.

Smith, R. P., Steinbusch, H. W., Mulder, A. H. Distribution of dopamine-immunoreactive cell bodies in the guinea-pig brain // J. Chem. Neuroanat. 1990. Vol. 3. P. 101–123.

Sokoloff, P., Schwartz, J. C. Novel dopamine receptors half a decade later // Trends Pharmacol. Sci. 1995. Vol. 16. P. 270–274.

Stanford, S. C. Central noradrenergic neurones and stress // Pharmac. Ther. 1995. Vol. 68. P. 297–342.

Starke, K. Presynaptic α -autoreceptors // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1987. Vol. 107. P. 73–146.

Strange, P. G. Dopamine receptors: studies on structure and function // Adv. Drug Res. 1996. Vol. 28. P. 313–351.

Strosberg, A. D. Structural and functional diversity of β -adrenergic receptors // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1995. Vol. 758. P. 253–260.

Возбуждающие и тормозные аминокислоты

Aizenman, E., Hartnett, K. A., Reynolds, I. J. Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site // Neuron. 1990. Vol. 5. P. 841–846.

Angers, S., Salahpour, A., Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G-protein-coupled receptor ontogeny and function // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2002. Vol. 42. P. 409–435.

Aprison, M. H., Daly, E. C. Biochemical aspects of transmission at inhibitory synapses: the role of glycine // Adv. Neurochem. 1978. Vol. 3. P. 203–294.

Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W. et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function // Pharmacol. Rev. 1998. Vol. 50. P. 291–313.

Bazemore, A. W., Elliott, K. A. C., Florey, E. Factor I and gamma-amino-butyric acid // Nature. 1956. Vol. 178. P. 1052–1053.

Benes, F. M., Berretta, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder // Neuropsychopharmacology. 2001. Vol. 25. P. 1–27.

Bernstein, E. M., Quick, M. W. Regulation of γ -aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 889–895.

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., Gassmann, M. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors // Physiol. Rev. 2004. Vol. 84. P. 835–867.

Betz, H. Biology and structure of the mammalian glycine receptor // Trends Neurosci. 1987. Vol. 10. P. 113–117.

Betz, H. Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily // Neuron. 1990. Vol. 5. P. 383–392.

Bormann, J., Hamill, O. P., Sakmann, B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones // *J. Physiol.* 1987. Vol. 385. P. 243–286.

Bowery, N. G. GABA_B receptor pharmacology // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993. Vol. 33. P. 109–147.

Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W. et al. International Union of Pharmacology XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid B receptors: structure and function // *Pharmacol. Rev.* 2002. Vol. 54. P. 247–264.

Buller, A. L., Larson, H. C., Schneider, B.E., et al. The molecular basis of NMDA-receptors subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 5471–5484.

Burnashev, N. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. Vol. 6. P. 311–317.

Conn, P. J., Pin, J-P. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors // *Ann. Rev. Pharmacol.* 1997. Vol. 37. P. 205–237.

Danysz, W., Parsons, C. G. Glycine and N-Methyl-D-Aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications // *Pharmacol. Rev.* 1998. Vol. 50. P. 597–664.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels // *Pharmacol. Rev.* 1999. Vol. 51. P. 7–61.

Gupta, A., Wang, Y., Markman, H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex // *Science.* 2000. Vol. 287. P. 273–278.

Hollmann, M., Heinemann, S. Cloned glutamate receptors // *Ann. Rev. Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 31–108.

Jessen, K. R. GABA and the enteric nervous system. A neurotransmitter function? // *Mol. Cell. Biochem.* 1981. Vol. 38. P. 69–76.

Jingami, H., Nakanishi, S., Morikawa, K. Structure of the metabotropic glutamate receptor // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003. Vol. 13. P. 271–278.

Johnson, G. A. GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? // *Trends Pharmacol. Sci.* 1996. Vol. 17. P. 319–323.

Jonas, P., Bischofberger, J., Sandkuhler, J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 419–424.

Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A. et al. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2 // *Nature.* 1998. Vol. 396. P. 674–679.

Kaila, K. Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system // *Prog. Neurobiol.* 1994. Vol. 42. P. 489–537.

Kemp, J. A., Leeson, P. D. The glycine site of the NMDA receptor – five years on // *Trends Pharmacol. Sci.* 1993. Vol. 14. P. 20–25.

Kerr, D. I., Ong, J. GABA_B receptors // *Pharmacol. Ther.* 1995. Vol. 67. P. 187–246.

Kneussel, M., Betz, H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations // *J. Physiol.* 2000. Vol. 525. P. 1–9.

Kubo, Y., Miyashita, T., Murata, Y. Structural basis for a Ca^{2+} -sensing function of the metabotropic glutamate receptors // *Science*. 1998. Vol. 279. P. 1722–1725.

Levitan, E. S., Schofield, P.R., Burt, D.R., et al. Structural and functional basis for GABA A receptor heterogeneity // *Nature*. Vol. 355. P. 76–79.

Lynch, J. W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel // *Physiol. Rev.* 2004. Vol. 84. P. 1051–1095.

MacDonald, R. L., Olsen, R. W. GABA receptor channels // *Ann. Rev. Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 569–602.

Malenka, R. C., Nicoll, R. A. Long-term potentiation – a decade of progress? // *Science*. 1999. Vol. 285. P. 1870–1874.

Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K. et al. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor // *Nature*. 1991. Vol. 349. P. 760–765.

McGaugh, J. L., Izquierdo, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation // *Trends Pharm. Sci.* 2000. Vol. 21. P. 208–210.

Monyer, H., Seeburg, P. H., Wisden, W. Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing // *Neuron*. 1991. Vol. 6. P. 779–810.

Moss, S. J., Smart, T. G. Constructing inhibitory synapses // *Nat. Rev. Neurosci.* 2001. Vol. 2. P. 240–250.

Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 597–603.

O'Brien, J. A., Berger, A. J. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons // *J. Neurophysiol.* 1999. Vol. 82. P. 1638–1641.

Olsen, W. O., Tobin, A. J. Molecular biology of GABA-A receptors // *FASEB J.* 1990. Vol. 4. P. 1469–1480.

Pin, J.-P., Duvoisin, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions // *Neuropharmacol.* 1995. Vol. 34. P. 1–26.

Rajendra, S., Lynch, J. W., Schofield, P. R. The glycine receptor // *Pharmacol. Ther.* 1997. Vol. 73. P. 121–146.

Rudolph, U., Crestani, F., Mohler, H. GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions // *Trends Pharmacol. Sci.* 2001. Vol. 22. P. 188–194.

Semyanov, A. V. GABA-ergic inhibition in the CNS: types of GABA receptors and mechanisms of tonic GABA-mediated inhibitory action // *Neirofiziologiya*. 2002. Vol. 34. P. 82–92.

Treking, M., Nicoll, R. A. Synaptic kainate receptors // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. Vol. 10. P. 342–351.

Turecek, R., Trusell, L. O. Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse // *Nature*. 2001. Vol. 411. P. 587–590.

Vannier, C., Triller, A. Biology of the postsynaptic glycine receptor // *Int. Rev. Cytol.* 1997. Vol. 176. P. 201–244.

Werman, R., Davidoff, R. A., Aprison, M. H. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine // *Nature*. 1967. Vol. 214. P. 681–683.

Глава 11. Нейромодуляторы

Производные арахидоновой кислоты

Brink, C., Dahlen, S.-E., Drazen, J. et al. International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the Oxoeicosanoid Receptor // *Pharmacol. Rev.* 2004. Vol. 56. P. 149–157.

Carlson, R. O., Levitan, I. B. Regulation of intracellular free arachidonic acid in *Aplysia* nervous system // *J. Membrane Biol.* 1990. Vol. 116. P. 249–260.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R. et al. Determination and the characterization of a cannabinoid receptor in the rat brain // *Mol. Pharmacol.* 1988. Vol. 34. P. 605–613.

Dewey, W. L. Cannabinoid pharmacology // *Pharmacol. Rev.* 1986. Vol. 38. P. 151–178.

DiMarzo, V., Fontana, A., Cades, H. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons // *Nature*. 1994. Vol. 372. P. 686–691.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study // *J. Neurosci.* 1991. Vol. 11. P. 563–583.

Howlett, A.C. Pharmacology of cannabinoid receptors // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995. Vol. 35. P. 607–634.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner T. I. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors // *Pharmacol. Rev.* 2002. Vol. 54. P. 161–202.

Hunter, S. A., Burstein, S. H. Receptor mediation in cannabinoid stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis // *Life Sci.* 1997. Vol. 60. P. 1563–1573.

Martin, B.R. Cellular effects of cannabinoids // *Pharmacol. Rev.* 1986. Vol. 38. P. 45–74.

Negishi, M., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Prostanoid receptors and their biological action // *Prog. Lipid Res.* 1993. Vol. 32. P. 417–434.

Ordway, R. W., Singer, J. J., Walsh, J. V. Direct regulation of ion channels by fatty acids // *Trends Neurosci.* 1991. Vol. 14. P. 96–100.

Piomelli, D., Greengard, P. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signaling // *Trends Pharmacol. Sci.* 1990. Vol. 11. P. 367–373.

Piomelli, D. Eicosanoids in synaptic transmission // *Crit. Rev. Neurobiol.* 1994. Vol. 8. P. 65–83.

Shimizu, T., Wolfe, L.S. Arachidonic acid cascade and signal transduction // J. Neurochem. 1990. Vol. 55. P. 1–15.

Venance, L., Piomelli, D., Glowinski, J., Giaume, C. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes // Nature. 1995. Vol. 376. P. 590–594.

Wolfe, C. S. Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids // J. Neurochem. 1982. Vol. 38. P. 1–9.

Нейропептиды

Adachi, D. K., Kalivas, P. W., Schenk, J. O. Neurotensin binding to dopamine // J. Neurochem. 1990. Vol. 54. P. 1321–1328.

Adrian, T. E., Allen, J. M., Bloom, S. R. et al. Neuropeptide Y distribution in human brain // Nature. 1983. Vol. 306. P. 584–586.

Allen, J. M., Adrian, T. E., Tatemoto, K. et al. Neuropeptide Y distribution in the rat brain // Science. 1983. Vol. 221. P. 877–879.

Atweh, S., Kuhar, M. Autoradiographic localization of opiate receptors in the brain // Brain Res. 1977. Vol. 129. P. 1–12.

Bach, F. W. Beta-endorphin in the brain. A role in nociception // Acta Anaesthesiol. Scand. 1997. Vol. 41. P. 133–140.

Bedecs, K., Berthold, M., Bartfai, T. Galanin – 10 years with a neuroendocrine peptide // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1995. Vol. 27. P. 337–349.

Belluzzi, J. D., Grant, N., Garsky, V. et al. Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat // Nature. 1976. Vol. 260. P. 625–626.

Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., Walker, M. W. Galanin receptor subtypes // Trends Pharmacol. Sci. 2000. Vol. 21. P. 109–117.

Chang, M. M., Leeman, S. E., Nial, H. D. Amino-acid sequence of substance P // Nat. New Biol. 1971. Vol. 232. P. 86–87.

Colmers, W., Bleakman, D. The effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons // Trends Neurosci. 1994. Vol. 17. P. 373–379.

Danks, J. A., Rothman, R. B., Cascieri, M. A. et al. A comparative autoradiographic study of the distribution of substance P and edoisin binding sites in rat brain // Brain Res. 1986. Vol. 385. P. 273–281.

Darlison, M. G., Richter, D. Multiple genes for neuropeptides and their receptors: co-evolution and physiology // Trends Neurosci. 1999. Vol. 22. P. 81–88.

de Wied, D. The neuropeptide concept // Prog. Brain Res. 1987. Vol. 72. P. 93–108.

Eide, R., Arvidsson, U., Vulchanova, L. et al. Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1995. Vol. 757. P. 390–404.

Evans, C. J., Keith, D. F., Morrison, H. et al. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression // Science. 1992. Vol. 258. P. 1952–1955.

Fallon, J. H., Leslie, F. M. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain // J. Comp. Neurol. 1986. Vol. 249. P. 293–336.

Guard, S., Watson, S. P. Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms // *Neurochem. Int.* 1991. Vol. 18. P. 149–165.

Henry, J. L. Electrophysiological studies on the neuroactive properties of neurotensin // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982. Vol. 440. P. 216–227.

Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. O. et al. Neuropeptides – an overview // *Neuropharmacol.* 2000. Vol. 39. P. 1337–1356.

Hokfelt, T., Bartfai, T., Bloom, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery // *Lancet Neurol.* 2003. Vol. 2. P. 463–472.

Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W. et al. Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity // *Nature.* 1975. Vol. 258. P. 577–579.

Iritani, S., Fujii, M., Satoh, K. The distribution of substance P in the cerebral cortex and hippocampal formation: an immunohistochemical study in the monkey and rat // *Brain. Res.* 1989. Vol. 22. P. 295–303.

Karelson, E., Langel, U. Galaninergic signalling and adenylate cyclase // *Neuropeptides.* 1998. Vol. 32. P. 197–210.

Kitabgi, P., Checler, F., Mazella, J., Vincent, J. P. Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors // *Rev. Clin. Basic. Pharm.* 1985. Vol. 5. P. 397–486.

Maggi, C. A. The mammalian tachykinin receptors // *Gen. Pharmacol.* 1995. Vol. 26. P. 911–944.

Maggio, J. E. Tachykinins // *Ann. Rev. Neurosci.* 1988. Vol. 11. P. 13–28.

Merchenthaler, I., Lopez, F. J., Negro-Vilar, A. Anatomy and physiology of central glanin-containing neurons // *Prog. Neurobiol.* 1993. Vol. 40. P. 769–771.

Michel, M. C. Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers // *Trends Neurosci.* 1991. Vol. 12. P. 389–394.

Michel, M. C., Beck-Sickiger, A., Cox, H. XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors // *Pharmacol. Rev.* 1998. Vol. 50. P. 143–150.

Millan, M. J. κ -Opioid receptors and analgesia // *Trends Biochem.* 1990. Vol. 11. P. 70–76.

Otsuka, M., Yoshioka, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins // *Physiol. Rev.* 1993. Vol. 73. P. 229–267.

Pernow, B. Substance P // *Pharmacol. Rev.* 1983. Vol. 35. P. 85–141.

Rossier, J., Bloom, F. Central neuropharmacology of endorphins // *Adv. Biochem. Physiolpharmacol.* 1979. Vol. 20. P. 165–185.

Smith, A. P., Lee, N. N. Pharmacology of dynorphin // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1988. Vol. 28. P. 123–140.

Tanaka, K., Masu, M., Nakanislu, S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor // *Neuron.* 1990. Vol. 4. P. 847–854.

Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide // *Nature.* 1981. Vol. 296. P. 659–660.

Van Ree, J. M., Gerrits, M. A., Vanderschuren L. J. Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine // *Pharmacol. Rev.* 1999. Vol. 51. P. 341–356.

Vincent, J. P., Mazella, J., Kitabgi, P. Neurotensin and neurotensin receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* 1999. Vol. 20. P. 302–309.

Vrontakis, M. E., Torsello, A., Friesen, H. G. Galanin // *J. Endocrinol. Invest.* 1991. Vol. 14. P. 785–794.

Пурины

Brundage, J. M., Dunwiddie, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system // *Adv. Pharm.* 1997. Vol. 39. P. 353–391.

Burnstock, G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain // *Lancet.* 1996. Vol. 347. P. 1604–1605.

Burnstock, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules // *Neuropharmacology.* 1997. Vol. 36. P. 1127–1139.

Edwards, F. A., Gibb, A. J., Colquhoun, D. ATP receptor mediated synaptic currents in the central nervous system // *Nature.* 1992. Vol. 359. P. 144–147.

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G. et al. Nomenclature and classification of purinoreceptors // *Pharmacol. Rev.* 1994. Vol. 46. P. 143–156.

Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N., Spyer, K.M. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system // *Nature.* 2005. Vol. 436. P. 108–111.

Gourine, A. V. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP // *J. Physiol.* 2005. Vol. 568.3. P. 715–724.

Illes, P., Norenberg, W. Neuronal ATP receptors and their mechanism of action // *Trends Pharmacol. Sci.* 1993. Vol. 14. P. 50–54.

Inoue, K., Koizumi, S., Ueno, S. Implication of ATP receptors in brain functions // *Prog. Neurobiol.* 1996. Vol. 50. P. 483–492.

Moreau, J. L., Huber, G. Central adenosine A (A₂) receptors: an overview // *Brain Res. Rev.* 1999. Vol. 31. P. 65–82.

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 1013–1067.

Ralevic, V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rev.* 1998. Vol. 50. P. 413–492.

Глава 12. Газообразные нейромодуляторы и объемная передача сигнала

Газообразные нейромодуляторы

Abe, K., Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16. P. 1066–1071.

Arancio, O., Kiebler, M., Lee, C. J. et al. Nitric oxide acts directly in the pre-synaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons // *Cell.* 1996. Vol. 87. P. 1025–1035.

Bredt, D. S., Snyder, H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger // *Neuron*. 1992. Vol. 8. P. 3–11.

Bredt, D. S., Snyder, H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule // *Trends Biochem. Sci.* 1994. Vol. 63. P. 175–195.

Dawson, T. M., Snyder, S. H. Gases as biologic messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 5147–5159.

Furchgott, R. F. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor // *Acta Physiol. Scand.* 1990. Vol. 139. P. 257–270.

Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature*. 1980. Vol. 288. P. 373–376.

Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system // *Trends Neurosci.* 1991. Vol. 14. P. 60–67.

Griffith, O., Stuehr, D. NO synthases: properties and catalytic mechanisms // *Ann. Rev. Physiol.* 1995. Vol. 57. P. 707–736.

Ignarro, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990. Vol. 30. P. 535–560.

Ignarro, L. J. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism // *Blood Vessels*. 1991. Vol. 28. P. 67–73.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. P. 9265–9269.

Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 927–930.

Moncada, S., Higgs, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway // *N. Engl. J. Med.* 1993. Vol. 329. P. 2002–2012.

Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research // *Pharmacol. Rev.* 1997. Vol. 49. P. 137–142.

Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication // *Biochem. Pharmacol.* 1989. Vol. 38. P. 1709–1715.

Murad, F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase // *Neurotransmissions*. 1994. Vol. 10. P. 1–4.

Murad, F., Ishii, K., Orstermann, F. et al. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells // *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1990. Vol. 24. P. 441–448.

Snyder, S. H., Bredt, D. S. Biological roles of nitric oxide // *Sci. Am.* 1992. Vol. 266. P. 68–71.

Vincent, S. R., Hope, B. T. Neurons that say NO // *Trends Neurosci.* 1991. Vol. 15. P. 108–113.

Объемная передача сигнала (volume transmission)

Agnati, L. F., Cortelli, P., Biagini, G. et al. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves // *NeuroReport*. 1994. Vol. 6. P. 9–12.

Agnati, L. F., Fuxe, K., Zoli, M. et al. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old mice rats. Evidence for existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission // *Acta Physiol. Scand.* 1986. Vol. 128. P. 201–207.

Agnati, L. F., Zoli, M., Stromberg, I., Fuxe, K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission // *Neuroscience*. 1995. Vol. 69. P. 711–726.

Chesler, M. Regulation and modulation of pH in the brain // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. P. 1183–1221.

Dermietzel, R. Gap junction wiring: a new principle in cell-to-cell communication in the nervous system // *Brain Res. Rev.* 1998. Vol. 26. P. 176–183.

Kellenberger, S., Schild, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of function for a shared structure // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 735–767.

Krishtal, O. A., Pidoplichko, V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane // *Neuroscience*. 1980. Vol. 5 P. 2325–2327.

Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. P. 1431–1568.

McCleskey, E. W., Gold, M. S. Ion channels of nociception // *Ann. Rev. Physiol.* 1999. Vol. 61. P. 835–856.

Morad, M. Proton-induced transformation in gating and selectivity of the calcium channel in neurons // *Ciba Found. Symp.* 1988. Vol. 139. P. 187–200.

Pasternack, M., Smirnov, S., Kaila, K. Proton modulation of functionally distinct GABA_A receptors in acutely isolated pyramidal neurons of rat hippocampus // *Neuropharmacology*. 1996. Vol. 35. P. 1279–1288.

Schwiening, C. J. pH phantoms – a physiological phenomenon? // *Physiol. News*. 2003. Vol. 50. P.15–18.

Schwiening, C. J., Kennedy, H. J., Thomas, R. C. Calcium-hydrogen exchange by the plasma membrane Ca-ATPase of voltageclamped snail neurons // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1993. Vol. 253. P. 285–289.

Sidorov, A. V. Effect of temperature on synaptic transmission between identified neurones of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // *Neurosci. Lett.* 2002. Vol. 333. P. 1–4.

Sidorov, A. V., Polyagina, I. P. Acid-base balance modulates respiratory and

alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. Vol. 39. P. 555–561.

Sidorov, A. V. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH) // J. Evol. Biochem. Physiol. 2006. Vol. 42. P. 43–48.

Sykova, E. Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space // Neuroscience. 2004. Vol. 129. P. 861–876.

Sykova, E., Chvatal, A. Glial cells and volume transmission in the CNS // Neurochem. Int. 2000. Vol. 36. P. 397–409.

Vaney, D. I., Nelson, J. C., Pow, D. V. Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina // J. Neurosci. 1998. Vol. 18. P. 10594–10602.

Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F. et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // Nature. 1997. Vol. 386. P. 173–177.

Waldmann, R., Lazdunski, M. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels // Curr. Opin. Neurobiol. 1998. Vol. 8. P. 418–424.

Zoli, M., Torri, C., Ferrari, R. et al. The emergence of the volume transmission concept // Brain Res. Rev. 1998. Vol. 26. P. 136–147.

Zoli, M., Jansson, A., Sykova, E. et al. Intercellular communication in the central nervous system: the emergence of the volume transmission concept and its relevance for neuropsychopharmacology // Trends Pharmacol. Sci. 1999. Vol. 20. P. 142–150.

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ АВТОРА.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
 Глава 1. СТРОЕНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ	
Типы межклеточных контактов	7
Щелевые контакты	9
Синапсы.....	10
 Глава 2. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ	
Характеристика транспортных свойств мембраны.....	15
Различие ионных концентраций по разные стороны мембраны..	17
Виды транспорта	18
Перенос веществ посредством транспортных белков	19
Системы активного транспорта веществ	21
Принципы классификации ионных каналов.....	24
Основные ионные каналы возбудимых мембран.....	27
 Глава 3. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ КЛЕТОК	
Типы электрических сигналов	34
Электрические свойства мембран нейронов	39
Нейронная интеграция и взаимодействие синапсов	46
 Глава 4. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА И ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ	
Мембранный потенциал	48
Потенциал действия	51
Ионные токи при развитии потенциала действия.....	52
Экспериментальная проверка ионной гипотезы	56
Ионные токи, проходящие через одиночные каналы	57
Распространение потенциала действия.....	58

Глава 5. ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Деполаризация нервного окончания	59
Роль Ca^{2+} при деполяризации	61
Квантовый характер высвобождения медиатора	63
Морфологические корреляты квантового выхода медиатора	68
Молекулярные основы выделения медиатора	70

Глава 6. ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Синаптические потенциалы, связанные с изменением проводимости мембраны	72
Эквивалентные электрические схемы прямой и непрямой синаптической передачи	77
Электротонические синапсы	79
Электрохимические (смешанные) синапсы	82
Эффективность синаптической передачи	85

Глава 7. СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ

Принципы межклеточной передачи сигнала	89
Пути передачи внеклеточных сигналов через мембрану	91
Рецепторы, связанные с G-белками	95
Системы вторичных посредников	99
Общая характеристика рецепторов	102
Десенситизация рецепторов	105

Глава 8. НЕЙРОМЕДИАТОРЫ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ (общий обзор)

Действие веществ синаптической направленности	106
Некоторые методы, применяемые при изучении нейромедиаторов и нейромодуляторов	107
Критерии идентификации нейромедиаторов и нейромодуляторов	114
Классификация нейромедиаторов и нейромодуляторов	116

Глава 9. НЕЙРОМЕДИАТОРЫ: АЦЕТИЛХОЛИН, ГИСТАМИН И СЕРОТОНИН

Ацетилхолин: локализация в центральной нервной системе млекопитающих	118
Метаболизм ацетилхолина	120
Ацетилхолин: рецепторы и передача сигнала внутрь клетки	123
Биологические эффекты ацетилхолина	127
Гистамин: локализация в организме млекопитающих	129
Метаболизм гистамина	130
Гистамин: рецепторы и передача сигнала внутрь клетки	131
Биологические эффекты гистамина	132
Серотонин: локализация в центральной нервной системе млекопитающих	133
Метаболизм серотонина	134
Серотонин: рецепторы и передача сигнала внутрь клетки	135
Биологические эффекты серотонина	137

Глава 10. НЕЙРОМЕДИАТОРЫ: КАТЕХОЛАМИНЫ И АМИНОКИСЛОТЫ	
Катехоламины: локализация в центральной нервной системе млекопитающих	138
Метаболизм катехоламинов	141
Катехоламины: рецепторы и передача сигнала внутрь клетки.....	144
Биологические эффекты катехоламинов.....	146
Аминокислоты: локализация в центральной нервной системе млекопитающих	147
Метаболизм возбуждающих и тормозных аминокислот.....	149
Возбуждающие и тормозные аминокислоты: рецепторы и передача сигнала внутри клетки	152
Биологические эффекты аминокислотных нейромедиаторов	158
Глава 11. НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ	
Общая характеристика нейропептидов	159
Особенности метаболизма нейропептидов.....	161
Краткая характеристика некоторых нейропептидов	164
Нейромодуляторы – производные жирных кислот.....	170
Внеклеточные пурины и пиримидины как нейромодуляторы	173
Глава 12. ГАЗООБРАЗНЫЕ НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ И ОБЪЕМНАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА	
Концепции объемной и проводниковой передачи сигнала.....	176
Клеточная организация мозга	178
Типы межклеточных сигналов.....	180
Газообразные нейромодуляторы: монооксид азота (NO)	180
Газообразные нейромодуляторы: монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H ₂ S).....	184
Кислотно-основное равновесие (pH) и температура как факторы объемной передачи сигнала	186
ПОСЛЕСЛОВИЕ	189
ЛИТЕРАТУРА	190

Учебное издание

Сидоров Александр Викторович

**ФИЗИОЛОГИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ
КОММУНИКАЦИИ**

Учебное пособие

Редактор *Г. В. Лозовская*

Художник обложки *Т. Ю Таран*

Технический редактор *Т. К. Раманович*

Корректор *Л. С. Лис*

Компьютерная верстка *А. А. Микулевича*

Подписано в печать 28.12.2007. Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,55. Уч.-изд. л. 13,41. Тираж 200 экз. Зак. 91.

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0056804 от 02.03.2004.
220030, Минск, проспект Независимости, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика.
Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
ЛП № 02330/0056850 от 30.04.2004.
220030, Минск, ул. Красноармейская, 6.