

Потенціалкеровані кальцієві канали: класифікація та фармакологічні характеристики (частина I)

О.В. Єгорова¹, О.П. Максимюк^{1,2}, О.І. Фісюнов¹, О.О. Кришталь^{1,2}

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²Міжнародний Центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; email: am@deptcm.kiev.ua.

Вхід іонів кальцію через потенціалкеровані кальцієві канали опосередковує величезну кількість фізіологічних подій та клітинних відповідей. Численні наукові публікації показують, що кальцієві канали беруть участь в процесах синаптичної передачі, вивільнення медіаторів, регуляції експресії генів, скорочення, формування осциляцій мембранного потенціалу, пейсмейкерної активності, вивільнення секретованих речовин з нервових та секреторних клітин, активації кальційзалежних ензимів тощо. В огляді представлені сучасна класифікація, особливості молекулярної будови, фізіологічні і фармакологічні властивості потенціалкерованих кальцієвих каналів клітин ссавців.

Ключові слова: потенціалкеровані кальцієві канали, фармакологія, молекулярна будова.

ВСТУП

Іони кальцію відіграють важливу роль у функціонуванні збудливих клітинних систем. Їх валентність зумовлює здатність ефективно взаємодіяти з органічними молекулами і змінювати конформацію, запускаючи чи модулюючи таким чином перебіг основних внутрішньоклітинних життєвих процесів. Зміни їх внутрішньоклітинної концентрації ($[Ca^{2+}]_i$) регулюють такі фізіологічні та біохімічні процеси, як проліферація, секреція, електричне збудження та його розповсюдження, синтез білків тощо [1].

Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у нервових клітинах здійснюється за рахунок вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо і його входу ззовні. Потенціалкеровані кальцієві (ПКК) канали, розташовані в клітинній мембрані збудливих клітин, утворюють один із основних шляхів надходження Ca^{2+} всередину клітини. Відкриваючись у відповідь на деполаризацію і пропускаючи вхідний струм вони беруть участь у контролі трансмембранного потенціалу та значною мірою визначають характеристики потенціалу дії, що генерується

© О.В. Єгорова, О.П. Максимюк, О.І. Фісюнов, О.О. Кришталь

клітиною. Крім сигнальної функції кальцієві канали відіграють важливу роль у сполученні електричної активності плазматичної мембрани із різними рецепторними механізмами та внутрішньоклітинними процесами.

Відкриття кальцієвих каналів

Під час з'ясування механізмів регуляції іонної провідності мембрани збудливих клітин Ходжкін та Хакслі [2] вперше висунули припущення про іонний канал, яке полягало в тому, що проникність мембрани для різних іонів зумовлена молекулярними порами (каналами), через які вони можуть вільно проникати в клітину. Автори розробили модель потенціалу дії, що демонструвала наявність у клітинній мембрані натрієвих і калієвих потенціалкерованих каналів. Згодом це стало одним з основних досягнень у галузі вивчення клітинної збудливості.

Відкриття ПКК-каналів було відзначено експериментами Фетта і Катца [3], які, вивчаючи властивості м'язових волокон рака, уперше знайшли їхню здатність генерувати потенціали дії в безнатрієвому розчині. По-

яснюючи природу цих явищ Фетт і Гінсбург [4] уперше показали, що в їх основі лежить вхід Ca^{2+} у клітину. Після цього з'явилася ціла низка праць, що свідчила про існування кальцієвої провідності мембрани як універсальної властивості збудливих клітин.

Більш детально досліджуючи природу кальцієвого потенціалу дії Хагівара та співавт. [5] вперше встановили такі властивості кальцієвих каналів, як насичуваність ($K_D=20-40$ ммоль/л), конкурентне відкриття проникаючими катіонами (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) і блокування непроникаючими іонами (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). Для пояснення цих явищ автори постулювали наявність у каналі особливих місць адсорбції Ca^{2+} . Отримані дані дали змогу також уперше знайти ще одну важливу властивість кальцієвого потенціалу дії – його залежність від $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Наступний етап у вивченні кальцієвих каналів – експерименти Рейтера [6], котрий, використовуючи метод фіксації потенціалу і заміщення іонів у позаклітинних розчинах, уперше продемонстрував існування кальцієвої провідності мембрани волокон Пуркінє. Її наявність, мабуть, пов'язана з існуванням у мембрані клітини особливих ПКК-каналів, що відрізняються за своїми характеристиками від натрієвих каналів. Це згодом підтвердилося численними даними з заміщення іонів, а також фармакологічними експериментами [5, 7-11]. Була встановлена ще одна важлива особливість кальцієвих каналів: виявилось, що їхні характеристики модулюються іншими факторами крім мембранного потенціалу. Це вплив фізіологічно активних речовин – нейротрансмітерів та вторинних посередників (катехоламіни, серотонін, цАМФ) [9-11]. Також була виявлена неоднорідність популяції кальцієвих каналів.

Новий напрямок у вивченні потенціалкероаних каналів мембрани було пов'язано з розробкою Костюком та співробітниками методу внутрішньоклітинної перфузії ізольованих клітин [12]. Незважаючи на вже існуючу на той час методика перфузії гігантського аксона кальмара, застосування

її було сильно обмежене, оскільки такий підхід міг бути використаний тільки для досліджень досить великих об'єктів (наприклад, гігантських м'язових волокон). Метод внутрішньоклітинної перфузії дав змогу вивчати функціонування ізольованої клітини в умовах зміни її внутрішньоклітинного середовища. Використовуючи його автори вперше виділили кальцієвий струм у чистому вигляді із сумарного трансмембранного струму та провели детальний аналіз кінетичних характеристик. Виявилось, що на відміну від натрієвого й калієвого струмів, кінетика активації інтегрального кальцієвого струму описується квадратичним ступенем перемінної активації (m^2) моделі Ходжкіна-Хакслі [2], а хід інактивації – сумою принаймні двох експонент.

Костюком і Кришталь [13] також була вперше виявлена ще одна фундаментальна властивість кальцієвих каналів – це залежна від позаклітинної концентрації Ca^{2+} здатність трансформуватися в канал, що пропускає одновалентні катіони. Нарешті, застосування нового методичного підходу призвело до остаточного перегляду класичної концепції «метаболическої незалежності» функціонування іонних каналів. Можливість зміни внутрішньоклітинного середовища дала змогу виявити визначену залежність функціонування кальцієвих каналів від цитоплазматичних процесів: був виявлений феномен «вимивання» кальцієвого струму під час перфузії клітини, а також показана роль внутрішньоклітинного кальцію в пригніченні активності кальцієвих каналів і роль цАМФ-залежного фосфорилування в регуляції такої активності [14-16].

Найбільш значимим наслідком застосування внутрішньоклітинної перфузії було створення й розробка методу дослідження одиночних іонних каналів мембрани patch-clamp, суть якого полягає в можливості виміру трансмембранних струмів через мікроскопічно малі ділянки клітинної мембрани [17]. Цей метод виявився революційним у галузі дослідження іонних каналів, він дав

можливість реєструвати струми одиночних каналів амплітудою близько пікоампера. У результаті електрофізіологія вийшла на якісно новий рівень вивчення характеристик і властивостей іонних каналів, що у свою чергу призвело до значного розвитку теоретичних уявлень про механізми їхнього функціонування.

Молекулярна будова

Кальцієвий канал являє собою трансмембранний гетероолігомерний білковий комплекс із молекулярною масою близько 390 кДа, що складається з 4 субодиниць: α_1 , $\alpha_{2\delta}$, β і γ [18].

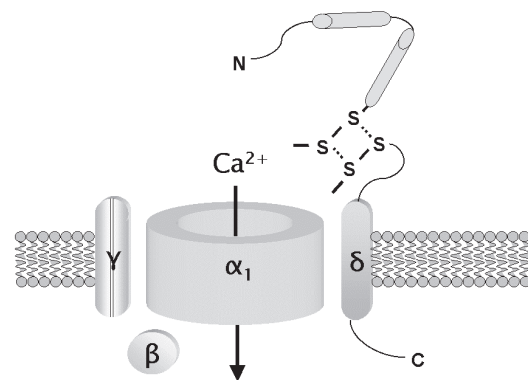
Молекулярне клонування ідентифікувало 10 генів α_1 -субодиниці кальцієвого каналу (α_{1A} – α_{1H} , α_{1L} та α_{1S}), 4 гени β -субодиниці (β_1 – β_4) та лише 1 ген $\alpha_{2\delta}$ та γ [8, 19, 20]. Власне іонний канал, тобто заповнену водою пору, що забезпечує трансмембранне проходження іонів, формує α_1 -субодиниця з молекулярною масою 190 кДа (рисунок) [21]. Вона містить спеціальну ділянку, котра пропускає Ca^{2+} (та деякі інші двовалентні катіони) і затримує одновалентні катіони (селективний фільтр). Субодиниця α_1 складається з 1873 амінокислот, що формують 24 трансмембранних α -спіральных сегменти, зібраних у 4 гомологічних домени.

Кальцієві канали різного типу мають неоднакові пороформуючі α_1 -субодиниці, зокрема, α_{1A} -субодиниця відповідає кальцієвому каналу P/Q-типу, α_{1B} – N-типу, α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} та α_{1S} кодують кальцієві канали L-типу, а α_{1E} складає новий R-тип кальцієвих каналів із властивостями подібними як до високо- так і низькопорогових каналів. Нещодавно було показано, що α_{1G} , α_{1H} та α_{1L} кодують різні ізоформи кальцієвих каналів T-типу [20]. Субодиниці $\alpha_{2\delta}$, β і γ кальцієвого каналу виконують регуляторні функції, забезпечуючи додаткові центри фосфорилування каналу, зв'язування з G-білками і т.п. [22].

Класифікація

Спочатку були ідентифіковані два типи каль-

цієвих каналів: T (transient) і L (long-lasting), причому їхня класифікація ґрунтувалася на біофізичних властивостях (порозі активації й кінетиці інактивації) [12, 16, 23]. Незабаром у нервових клітинах за біофізичними параметрами був ідентифікований ще один високограничний компонент кальцієвого струму – N-струм (“ні T, ні L”) [17, 24, 25], і, відповідно, виділений N-тип кальцієвих каналів. Лише через кілька років стало можливим селективно виділяти інші компоненти кальцієвого струму, чому сприяло відкриття низки селективних блокаторів окремих типів кальцієвих каналів, головним чином, природних токсинів [26]. Так, спочатку був виявлений селективний блокатор каналів N-типу [24, 27, 28], а потім P-каналів (клітини Пуркінє) [29]. Порівняно недавно були фармакологічно розділені Q- і R-канали [28], і в більшості випадків R (residual) компонент кальцієвого струму визначається як залишковий. Таким чином, наразі кальцієві канали відповідно до фармакологічної класифікації розділяють на T, L, N, P, Q і R-типи [21]. З появою можливості провести молекулярне клонування було виділено і охарактеризовано 10 типів α_1 -субодиниць [21], що дало змогу їх розділити на 3 структурно і функціональ-



Структура потенціалкерваного кальцієвого каналу. Канал формують 4 субодиниці: α_1 , β , γ , $\alpha_{2\delta}$. Субодиниця α_1 формує каналну пору, α_1 , β мають центри фосфорилування для цАМФзалежної протеїнкінази, γ -субодиниця має центри гліколізації

Класифікація та функціональні характеристики потенціалкерованих кальцієвих каналів

Клас	Тип струму	Головна субодиниця	Тип	Блокатори	Експресія	Фізіологічні функції	Хвороби		
вископорові	L	α_{1S}	Ca _v 1.1	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , La ³⁺ , фенілакіламіни, бензотіазепіни, дигідропіридини	Скелетні м'язи	Генерація потенціалів дії, секреція гормонів і нейромедіаторів, синаптична передача у фоторецепторів та пресинаптична кальцієва сигналізація	М'язевий параліч, тимусний синдром, аутизм, куряча сліпота		
		α_{1C}	Ca _v 1.2		Міоцити судинної стінки, кардіоміоцити				
		α_{1D}	Ca _v 1.3		Ендокринні клітини, нейрони				
		α_{1F}	Ca _v 1.4		Палички та колбочки фоторецепторів				
	P	α_{1A}	Ca _v 2.1	токсин ω AgalVA, токсин ω STxMVIIIC	Нейрони, ендокринні клітини	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Мозочкова атаксія, геміплетічна мігрень		
					Нейрони, ендокринні клітини				
	N	α_{1B}	Ca _v 2.2	Cd ²⁺ , токсин ω STxGVIA, токсин ω STxMVIIIC	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Синдром дистонії–міоклонуса		
					Нейрони				
	R	α_{1E}	Ca _v 2.3	SNX-482, Cd ²⁺ і Ni ²⁺	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Розлади синаптичної передачі		
					Нейрони				
	низкопорові	T	α_{1G}	Ca _v 3.1	Ni ²⁺ , амілорид, фенітоїн, фленаризин	Нейрони	Формування осциляцій мембранного потенціалу, пейсмейкерна активність нейронів	Абсансна епілепсія	
						α_{1H}			Ca _v 3.2
α_{1L}						Ca _v 3.3			Нейрони

но споріднених родини (Ca_v1 , Ca_v2 і Ca_v3) [30, 31] та довершити сучасну класифікацію кальцієвих каналів (див. таблицю).

T-тип кальцієвих каналів

Низькопорогові потенціалкервані кальцієві канали (НПК) T-типу за особливостями молекулярної будови поділяються на 3 підтипи: $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, $\text{Ca}_v3.3$. Канал $\text{Ca}_v3.1$ сформований $\alpha1_G$ -субодиницею, він має найбільш швидкий час відновлення після інактивації, локалізується в клітинах мозку. Канал $\text{Ca}_v3.2$, сформований субодиницею $\alpha1_H$, має найбільш повільний час відновлення після інактивації, широко розповсюджений у печінці та нирках, а також у серці, в нервовій та ендокринній тканинах. Канали $\text{Ca}_v3.3$ сформовані $\alpha1_I$ -субодиницею, локалізуються у нейронах мозку і генерують T-струми, що сприяють підтриманню електричної активності нейронів, оскільки вони активуються внаслідок слабкої деполяризації. Кальцієві канали T-типу зустрічаються в м'язових, секреторних [32] і хромафінних клітинах [33]. У багатьох нейронах ці канали починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -60 мВ [12, 23, 34]. Активація T-каналів дуже швидка. Сигмоподібний тип активації підтверджує наявність 2 чи більше послідовних закритих станів каналу [35]. Деактивація (хвостовий струм) T-струму пов'язана із закриттям каналів і може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу близько мілісекунд [36, 37]. Постійна часу деактивації T-струму не залежить від тривалості попередньої деполяризації, ступеня інактивації кальцієвих каналів і типу проникаючого катіона [38].

Інактивація T-струму розвивається моноекспоненційно за час близько 100 мс, виявляє строгу потенціалзалежність і не залежить від потоку Ca^{2+} , що проникають через канал [12, 23, 34]. При підтримуваних мембранних потенціалах більш позитивних ніж -50 мВ T-канали повністю стаціонарно інактивовані [12, 23, 34, 39]. Таким чином, ці дані вказують

на подібність кінетичних характеристик Na^+ , K^+ і Ca^{2+} -каналів, а так само і на можливість застосування кінетичних схем, що описують роботу Na^+ - та K^+ -каналів, для Ca^{2+} -каналів [35].

Селективні та провідні властивості кальцієвих каналів T-типу також характеризуються певними особливостями. По-перше, вони пропускають двовалентні катіони Ca^{2+} , Sr^{2+} і Ba^{2+} практично з однаковою ефективністю [34, 40], по-друге, провідність одиночних каналів досить низька $5 - 7$ пСм [41] і практично не залежить від типу проникаючого двовалентного катіона.

Кальцієві канали T-типу менш чутливі порівняно з L-каналами, до блокування Cd^{2+} [25]. Водночас вони більш чутливіші до блокування Ni^{2+} [42]. Дигідропіридини, так само як і інші органічні блокатори, мають низьку ефективність щодо T-каналів (виключення становлять T-канали гіпоталамічних і можливо інших центральних нейронів хребетних) [43]. Досить сильними блокаторами цих каналів є амілорид [44], антиконвульсант фенітоїн [45], флунаризин [43] і деякі складні вуглеводневі спирти [29]. Функціональний стан кальцієвих каналів T-типу практично не залежить від внутрішньоклітинних обмінних процесів, тому їхня активність протягом тривалого часу може підтримуватися в ізольованих від клітини мембранних фрагментах [41].

L-тип кальцієвих каналів

Високорогові потенціалкервані кальцієві канали (ВПК) L-типу переважно локалізовані в кардіоміоцитах і міоцитах судинної стінки. Цей тип каналів також широко представлений в нейрональних [46], м'язових [47] і секреторних клітинах [48–50]. У серцево-судинній системі вони беруть участь у підтримці електричної і механічної активності кардіоміоцитів і гладеньком'язових клітин судин. Канали L-типу за особливостями молекулярної будови поділяються на наступні 4 типи: $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.4$. $\text{Ca}_v1.1$ -канали локалізовані на T-трубочці поперечно-сму-

гастих і серцевого м'язів. $Ca_v1.2$ широко експресуються в гладеньких м'язах, клітинах підшлункової залози, фібробластах і нейронах. Експресія $Ca_v1.3$ -каналів переважає на внутрішніх волоскових клітинах завитка. Було показано, що видалення $Ca_v1.3$ -каналів викликає глухоту у мишей [51]. $Ca_v1.4$ -канали переважно експресуються в паличках і колбочках фоторецепторів. Інактивація $Ca_v1.4$ призводить до порушення синаптичної передачі фоторецепторів та пресинаптичної кальцієвої сигналізації і запобігає формуванню фоторецепторів. Мутації в $Ca_v1.4$ -каналі в організмі людини спричиняють курячу сліпоту [52, 53]. Кальцієві канали L-типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу від -30 до -20 мВ [54]. Час досягнення піка амплітудного значення струму монотонно зменшується зі збільшенням потенціалу, амплітуда струму зростає від -30 до 0 мВ і знову спадає при подальшому збільшенні тестуючого потенціалу. Деактивація (хвіст) L-струму може бути апроксимована однією експонентою з постійної часу 170 мкс для Ca^{2+} і 235 мкс для Va^{2+} [54].

Інактивація цих каналів розвивається дуже повільно і струм цілком не інактивується, якщо як основний проникаючий катіон використовуються Va^{2+} або внутрішньоклітинний розчин містить EGTA [12, 34, 55]. Це підтверджує той факт, що $[Ca^{2+}]_i$ відіграє важливу роль у контролі інактивації кальцієвих каналів [55].

Кальцієві канали L-типу, разом із Ca^{2+} здатні ефективно пропускати Va^{2+} і Sr^{2+} . Ряд максимальної амплітуди струмів виглядає: $I_{Ba} > I_{Sr} > I_{Ca}$ [34, 36, 39, 56]. Така послідовність характерна як для макрострумів від цілої клітини, так і для струмів через одиночні канали. Одиночні L-канали відрізняються досить значною провідністю 2025 пСм при концентрації Va^{2+} близько 100 ммоль/л [25].

L-тип кальцієвих каналів характеризується високою чутливістю до неорганічних іонів (Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+}) [57] та органічних блокаторів трьох класів – фенілалкіла-

мінів (верапаміл, D600), бензотіазепінів (дилтіазем) і дигідропіридинів (ніфедипін, нітрендипін, нізолдипін, німодипін) [58]. Стосовно каналів цього типу висока ефективність властива також кальцієвим агоністам з групи дигідропіридинів – $VaK8644$ і CGP28392 [25, 59].

Особливістю кальцієвих каналів L-типу всіх збудливих клітин є залежність їхнього функціонального стану від внутрішньоклітинного метаболізму [35, 60]. Це, у свою чергу, визначає їх схильність до різноманітних регуляторних впливів, котрі модулюють їх активність за допомогою широкого набору нейротрансмітерів і гормонів за участю різних внутрішньоклітинних систем [47].

N-тип кальцієвих каналів

Наявність каналів N-типу ($Ca_v2.2$) одночасно з кальцієвими каналами інших типів було показано в основному для клітин нейрональної природи [61-63]. Крім нейронів спінальних гангліїв, ембріонів курчати й миші, до таких клітин відносяться нейрони тригемінальних гангліїв [64], клітини клубочкової зони кори наднирникових залоз щура [56] і нейросекреторні клітини [33]. Співіснування N і L-каналів було показано на симпатичних нейронах щура [65]. Як і в разі інших підтипів потенціалкерованих кальцієвих каналів, $\alpha 1$ -субодиниця утворює пори, через які кальцій проникає в клітину і визначає більшу частину властивостей каналу $Ca_v2.2$ [66].

Кальцієві канали N-типу за своєю потенціалзалежністю займають проміжне положення між T і L-каналами. Поріг їхньої активації перевищує такий для T-каналів і лежить у діапазоні від -40 до -30 мВ. Максимум вольт-амперної характеристики припадає на потенціали в ділянці 0 мВ [39]. Під час триваючої деполяризації кальцієві канали N-типу досить швидко інактивуються (постійна часу 50–80 мс), потенціал їх повної стаціонарної інактивації становить приблизно -30 мВ. Провідність одиночних каналів N-типу становить близько 13 пСм (110 ммоль/л Va^{2+}) [25]. У більш пізніх дослідженнях було

встановлено, що провідність одиночних N-каналів близько 18 пСм [67].

Серед особливостей фармакології N-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування Cd^{2+} і токсином ω -CTx-GVIA, а також стійкість до Ni^{2+} і дигідропіридинів [39, 68, 69].

P-тип кальцієвих каналів

ВПК канали P-типу ($\text{Ca}_v2.1$) поширені у багатьох структурах ЦНС, периферичній нервовій системі, серцевому та скелетних м'язях [29, 70]. На молекулярному рівні вони складаються з основної пороформуєчої $\alpha 1$, допоміжних $\alpha 2$ -та β -субодиниць і факультативних субодиниць, як наприклад γ , у кальцієвих каналах скелетних м'язів [71]. Канали цього типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -55 мВ, а максимум їх вольт-амперної характеристики знаходиться близько -20 мВ [72]. Деактивація (хвіст) струму через P-тип кальцієвих каналів може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу 180 мкс. Інактивація цього струму розвивається дуже повільно (кілька секунд) і залежить від мембранного потенціалу. Характерною рисою P-типу кальцієвих каналів є широкий діапазон перекриття (від -50 до 0 мВ) кривих стаціонарної активації й інактивації [72]. Дослідження провідності одиночних каналів ізольованих клітин Пуркінє дорослих тварин показали наявність 3 різних рівнів провідності (9-10, 13-14, 18-19 пСм), кожний з яких блокується очищеною отрутою токсину австралійського павука-тенетника (FTX від англ. funnel spider toxin) [73]. Серед особливостей фармакології P-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування за допомогою токсину ω -Aga-IVA, а також стійкість до дигідропіридинів і ω -CTx-GVIA [72].

Q-тип кальцієвих каналів

Цей тип каналів вперше був виявлений у нейронах мозку [74], гранулярних клітинах

мозочка [75] та у клітинах серцевої тканини [22]. Їх характеристики схожі на ПКК-канали P-типу, більше того, ці канали мають однакову пороформуєчу субодиницю (α_{1A}) і відповідно належать до родини $\text{Ca}_v2.1$ [21]. На підставі значень порогу активації (близько -40 мВ) і максимуму вольт-амперної характеристики (0-10 мВ) Q-тип каналів був віднесений до ВПК-каналів. Вони мають більш швидку кінетику інактивації, ніж P-канали, а також більш низьке значення потенціалу половинної інактивації, близько -45 мВ [22]. Проникність Q-каналів однакова як для іонів кальцію, так і барію [76].

При аналізі фармакологічних властивостей Q-типу кальцієвих каналів гранулярних клітин мозочка було встановлено, що вони не чутливі до дигідропіридинів та токсину ω -CTx-GVIA, але можуть бути цілком заблоковані токсином ω -CTx-MVІІС у мікромолярних концентраціях і на 60% токсином ω -Aga-IVA у концентрації 1 мкмоль/л [74]. Незважаючи на те, що токсин ω -CTx-MVІІС блокує як Q- так і N-тип кальцієвих каналів, N-струм пригнічується набагато швидше, ніж струм Q-типу. Аплікація 5 мкмоль/л токсину ω -CTx-MVІІС призводить до повного блокування N-типу кальцієвих каналів уже через 10 с, водночас для повного блокування каналів Q-типу потрібно близько 50 с [77]. Селективних блокаторів для цього типу каналів поки не виявлено.

R-тип кальцієвих каналів

Уперше кальцієві канали R-типу були виявлені у гранулярних нейронах мозочка [76, 78]. Як і для інших ПКК-каналів, $\alpha 1$ -субодиниця утворює пору, через яку іони кальцію проникають у клітину, і визначає більшу частину властивостей каналу. За будовою $\alpha 1$ -субодиниці, цей тип каналів також відомий як $\text{Ca}_v2.3$, і експресується в основному у корі головного мозку, дендритах пірамідальних клітин гіпокампа, стріатумі, мигдалині і міжніжкових ядрах [79], також, разом з каналами Q-типу, описані в гранулярних клітинах мозочка [80].

Ці канали мають високий поріг (близько -50 мВ) та відносно повільну кінетику активації струму. Максимальна амплітуда R-струму спостерігається при потенціалі 0 мВ (причому як у кальцієвому розчині, так і в розчині, що містить 5 ммоль/л Ba^{2+}). Під час триваючої деполяризації відбувається швидка інактивація цього струму (постійна часу 20–30 мс). Потенціал половинної інактивації R-типу кальцієвих каналів за даними різних авторів різний: Жанг і співавт. [76] наводять значення -62 мВ, а Долфін [22] – -15 мВ. Таким чином, за своїми активаційними і інактиваційними характеристиками T і R-канали дуже схожі між собою. Проте деактивація R-струму відбувається значно швидше T-струму і може бути апроксимованою однією експонентою з постійної часу близько 300 мкс [81]. Провідність одиночних кальцієвих каналів, утворених α_{1E} -субодиницею, так само досить висока і становить приблизно 14 пСм [82].

Серед фармакологічних особливостей R-типу кальцієвих каналів (як і для T-типу) слід зазначити низьку чутливість до цілої низки відомих блокаторів: дигідропіридинів, фенілалкіламінів, конотоксинів та FTX [78, 83]. За даними Еллінора та співавт. [78], струм через R-канали блокується Cd^{2+} і Ni^{2+} з $\text{IC}_{50}=1,2$ мкмоль/л і $\text{IC}_{50}=66$ мкмоль/л відповідно. Селективним блокатором для цього типу кальцієвих каналів є синтетична речовина SNX-482 [21].

Фізіологічні функції

Результати численних досліджень показали, що кальцієві канали різних типів розподілені в мозку неоднорідно і що кожний з них, швидше за все, виконує деяку специфічну функцію. З іншого боку, було встановлено, що кілька типів кальцієвих каналів можуть у визначеній пропорції одночасно експресуватися в одній і тій самій клітині, крім того, канали різних типів нерівномірно локалізовані й у межах самої клітини. Так, L-канали розташовуються в основному на сомі, P, Q

та R – на сомі та дендритах, N-канали – головним чином на синаптичних закінченнях [62, 84].

Нині ще немає повного уявлення про функцію кожного типу кальцієвих каналів. Передбачається, що T-канали беруть участь у формуванні осциляцій мембранного потенціалу і пейсмейкерної активності нейронів; L-канали відіграють роль у генерації потенціалу дії і задіяні у процесі вивільнення речовин, що секретируются з нервових і секреторних клітин, а N, P, і Q-канали регулюють вивільнення нейротрансмітерів у синаптичних сполученнях, причому функціональні розходження між трьома останніми типами каналів наразі не зовсім зрозумілі (див. таблицю). Проте окремі дані вказують, що ці канали задіяні до процесів вивільнення визначеного виду медіаторів або ж є специфічними для того чи іншого типу клітин [21, 85-87].

**Е.В. Єгорова¹, А.П. Максимюк^{1,2},
А.І. Фісюнов¹, О.А. Кришталь^{1,2}**

ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ Кальциевые КАНАЛЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА (ЧАСТЬ I)

Вход ионов кальция через потенциалуправляемые кальциевые каналы опосредует огромное количество физиологических событий и клеточных ответов. Многочисленные научные публикации показывают, что кальциевые каналы участвуют в процессах синаптической передачи, высвобождении медиаторов, регуляции экспрессии генов, сокращения, формирования осциллирующей мембранного потенциала, пейсмейкерной активности, высвобождение секретиремых веществ из нервных и секреторных клеток, активации кальцийзависимых ферментов и др. В данном обзоре представлены современная классификация, особенности молекулярного строения, физиологические и фармакологические свойства потенциалуправляемых кальциевых каналов клеток млекопитающих.

Ключевые слова: потенциалуправляемые кальциевые каналы; фармакология; молекулярное строение.

¹Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

²Международный Центр молекулярной физиологии НАН Украины, Киев

O. Iegorova¹, O. Maximyuk^{1,2}, A. Fisyunov¹,
O. Krishtal^{1,2}

VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS: CLASSIFICATION AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES (PART I)

Calcium influx through voltage-gated calcium channels mediate a huge amount of physiological events and cellular responses. Numerous scientific reports indicate that calcium channels are involved in synaptic transmission, neurotransmitter release, regulation of gene expression, cellular membrane voltage oscillations, pacemaker activity, secretion of specific substances from nerve and secretory cells, morphological differentiation, activation of calcium-dependent enzymes, etc. This review represents the modern classification, molecular structure, physiological and pharmacological properties of voltage-gated calcium channels expressed in mammalian cells.

Key words: voltage-gated calcium channels, pharmacology, molecular structure.

¹*Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

²*International Center for Molecular Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Kostyuk P. Calcium ions in nerve cell function. Oxford: Oxford University Press; 1992.
2. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117(4):500-44.
3. Fatt P, Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1953;120(1-2):171-204.
4. Fatt P, Ginsborg BL. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1958;142(3):516-43.
5. Hagiwara S, Nakajima S. Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle. *J Gen Physiol.* 1966;49(4):807-18.
6. Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* 1967;192(2):479-92.
7. Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol.* 1973;26:1-43.
8. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, et al. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 1994;13(3):505-6.
9. Kostyuk PG, Krishtal OA, Doroshenko PA. Calcium currents in snail neurones. I. Identification of calcium current. *Pflugers Arch.* 1974;348(2):83-93.
10. Trautwein W, McDonald TF, Tripathi O. Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. *Pflugers Arch.* 1975;354(1):55-74.
11. Doroshenko PA, Kostyuk PG, Kryshtal OA. [Action of calcium on the somatic membrane of the giant neurons of molluscs]. *Neirofiziolohiia.* 1973;5(6):621-7. [Article in Russian]
12. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Intracellular perfusion. *J Neurosci Methods.* 1981;4(3):201-10.
13. Kostyuk PG, Krishtal OA, Shakhvalov YA. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J Physiol.* 1977;270(3):545-68.
14. Reuter H. Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 1974;242(2):429-51.
15. Tsien RW. Adrenaline-like effects of intracellular iontophoresis of cyclic AMP in cardiac Purkinje fibres. *Nat New Biol.* 1973;245(143):120-2.
16. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP. *Brain Res.* 1981;214(1):210-4.
17. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260(5554):799-802.
18. Hosey MM, Chang FC, O'Callahan CM, Ptasienski J. L-type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. Purification and phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;560:27-38.
19. Stea A, Soong TW, Snutch TP. The voltage-gated calcium channels. In: North R, editor. *Handbook of Receptors and Channels; Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.; 1995. p. 113-52.
20. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 1998;391(6670):896-900.
21. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8).
22. Dolphin AC. The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G-proteins. *Exp Physiol.* 1995;80(1):1-36.
23. Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J.* 1984;46(3):413-8.
24. Kostyuk PG, Shuba Ya M, Savchenko AN. Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflugers Arch.* 1988;411(6):661-9.
25. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 1985;316(6027):440-3.
26. Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science.* 1985;230(4732):1338-43.
27. Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and

- ω -conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.* 1989;414(2):150-6.
28. Ferroni A, Mancinelli E, Camagni S, Wanke E. Two high voltage-activated calcium currents are present in isolation in adult rat spinal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(2):379-84.
 29. Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(5):1689-93.
 30. Snutch TP, Reiner PB. Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 1992;2(3):247-53.
 31. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 2000;25(3):533-5.
 32. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(9):349-54.
 33. Albillos A, Artalejo AR, Lopez MG, Gandia L, Garcia AG, Carbone E. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol.* 1994;477(Pt 2):197-213.
 34. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1985;359:431-46.
 35. Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1982; 331:599-635.
 36. Carbone E, Lux HD. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol.* 1987;386:547-70.
 37. Matteson DR, Armstrong CM. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol.* 1986;87(1):161-82.
 38. Lux HD, Carbone E, Zucker H. Na⁺ currents through low-voltage-activated Ca²⁺ channels of chick sensory neurones: block by external Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Physiol.* 1990;430:159-88.
 39. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol.* 1987;394:149-72.
 40. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1985;86(1):1-30.
 41. Carbone E, Lux HD. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J Physiol.* 1987;386:571-601.
 42. Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J Physiol.* 1987;383:231-49.
 43. Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuk YV. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol.* 1989;412:181-95.
 44. Tang CM, Presser F, Morad M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science.* 1988;240(4849):213-5.
 45. Yaari Y, Hamon B, Lux HD. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science.* 1987;235(4789):680-2.
 46. Carbone E, Swandulla D. Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Mol Biol.* 1989;54(1):31-58.
 47. Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:367-84.
 48. Lopez MG, Villarroya M, Lara B, Martinez Sierra R, Albillos A, Garcia AG, et al. Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 1994;349(3):331-7.
 49. Plant TD. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1988;404:731-47.
 50. Madison DV, Nicoll RA. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol.* 1984;354:319-31.
 51. Platzter J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, et al. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell.* 2000;102(1):89-97.
 52. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998;19(3):264-7.
 53. Striessnig J, Bolz HJ, Koschak A. Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):361-74.
 54. Swandulla D, Armstrong CM. Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons. *J Gen Physiol.* 1988;92(2):197-218.
 55. Eckert R, Chad JE. Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 1984;44(3):215-67.
 56. Durroux T, Gallo-Payet N, Payet MD. Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J Physiol.* 1988;404:713-29.
 57. Konnerth A, Dressen J, Augustine GJ. Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7051-5.
 58. Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature.* 1983;302(5911):790-4.
 59. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurones. *J Physiol.* 1981;310:403-21.
 60. Kostyuk PG. Calcium channels in the neuronal membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1981;650(2-3):128-50.
 61. Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, et al. Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science.* 1988;239(4835):57-61.
 62. Regan LJ, Sah DW, Bean BP. Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron.* 1991;6(2):269-80.

63. Carbone E, Sher E, Clementi F. Ca currents in human neuroblastoma IMR32 cells: kinetics, permeability and pharmacology. *Pflugers Arch.* 1990; 416(1-2):170-9.
64. Dupont JL, Bossu JL, Feltz A. Effect of internal calcium concentration on calcium currents in rat sensory neurones. *Pflugers Arch.* 1986; 406(4):433-5.
65. Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(12):4313-7.
66. Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, et al. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron.* 1992;8(1):71-84.
67. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron.* 1989;2(5):1453-63.
68. McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, et al. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(12):4327-31.
69. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 1988;11(10):431-8.
70. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 1992;9(1):85-95.
71. Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, et al. Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J Biol Chem.* 1998; 273(52):34857-67.
72. Regan LJ. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J Neurosci.* 1991;11(7):2259-69.
73. Usowicz MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinas R. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron.* 1992;9(6):1185-99.
74. Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunits. *Neuron.* 1993;11(2):291-303.
75. Randall A, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 1995;15(4):2995-3012.
76. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology.* 1993;32(11):1075-88.
77. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994;264(5155):107-11.
78. Ellinor PT, Zhang JF, Randall AD, Zhou M, Schwarz TL, Tsien RW, et al. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature.* 1993;363(6428):455-8.
79. Toro-Castillo C, Thapliyal A, Gonzalez-Ochoa H, Adams BA, Meza U. Muscarinic modulation of Cav2.3 (R-type) calcium channels is antagonized by RGS3 and RGS3T. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C573-80.
80. Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology.* 1997;36(7):879-93.
81. Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, et al. Structure and functional characterization of neuronal α_{1E} calcium channel subtypes. *J Biol Chem.* 1994;269(35):22347-57.
82. Schneider T, Wei X, Olcese R, Costantin JL, Neely A, Palade P, et al. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel alpha 1 subunit. *Recept Channels.* 1994;2(4):255-70.
83. Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science.* 1993;260(5111):1133-6.
84. Day NC, Shaw PJ, McCormack AL, Craig PJ, Smith W, Beattie R, et al. Distribution of α_{1A} , α_{1B} and α_{1E} voltage-dependent calcium channel subunits in the human hippocampus and parahippocampal gyrus. *Neuroscience.* 1996;71(4):1013-24.
85. Elliott EM, Malouf AT, Catterall WA. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci.* 1995;15(10):6433-44.
86. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.* 1996;380(6571):255-8.
87. Martin-Moutot N, Charvin N, Leveque C, Sato K, Nishiki T, Kozaki S, et al. Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6567-70.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.11.2015*