

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

на правах рукопису

УДК 577.352.5:612.822

ЛУК'ЯНЕЦЬ Олена Олександрівна

ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ КАЛЬЦІЄВИХ
КАНАЛІВ ВТОРИННИМИ ПОСЕРЕДНИКАМИ

Спеціальність 03.00.02 - Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ-1993

№ 26965

Робота виконана у Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця Академії наук України.

Науковий керівник: академік КОСТЮК П. Г.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук БУРДИГА Ф. В.
доктор біологічних наук МАЛИШЕВА М. К.

Провідна організація: Київський державний університет
ім. Т. Г. Шевченка

Захист дисертації відбудеться < _____ > 1993р.
о _____ год. на засіданні спеціалізованої ради Д 016.15.01
при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України за адресою
: 252024 Київ 24, вул. Богомольця, 4. тел. (044) 293-29-09, факс
(044) 293-34-31.

С дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту
фізіології ім. О. О. Богомольця Академії наук України.

Автореферат разісланий < _____ > 1993р.

Вчений секретар
спеціалізованої
ради, д. б. н.

СОРОКІНА-МАРИНА З. А.

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00814582 (S)

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ДВ-26.163

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Згідно з загально визначеною класичною концепцією мембранних іонних каналів, розробленою на основі досліджень нервових волокон, іонні канали розглядались як структури функціонально незалежні від внутрішньоклітинного метаболізму. Останньому відводилася лише роль підтримання необхідних трансмембранних іонних градієнтів. Однак, в міру переорієнтації напрямку досліджень в область вивчення іонних каналів соматичної мембрани, накопичувалась все більша кількість експериментальних фактів, вказуючих на можливість безпосередньої регуляції активності іонних каналів з боку внутрішньоклітинного метаболізму. В найбільшій мірі це виявилось справедливим по відношенню до потенціалозалежних Са каналів.

Одною з перших описаних експериментаторами властивостей кальцієвих каналів, яка не вкладалась в існуючі теоретичні уявлення була надзвичайно висока залежність протікаючого через кальцієві канали струму від внутрішньоклітинної концентрації переносимих іонів Са [Kostyuk, Krishtal, 1977]. Іони Са чинили суттєвий вплив як на величину переносимого струму, так і на селективність та потенціалозалежні параметри каналу (Kostyuk et al., 1983). Взагалі, така підвищена чутливість досліджуваного процесу до іонів Са асоціюється із високою спорідненістю зв'язування цих катіонів із білками-мішенями, що дало підставу припустити наявність структурної схожості між певними областями молекули кальцієвого каналу та відповідними функціональними доменами вже відомих Са²⁺-зв'язуючих білків (кальмодуліну). Такі уявлення підтверджуються сучасними даними про первинну структуру молекули Са каналу [Семи́н, Иванов, 1989].

З іншого боку, висока чутливість досліджуваного процесу до Са²⁺ може визначатись і активацією цим катіоном ряду Са²⁺-залежних ферментів, у тому числі і формуючих метаболічний ланцюг вторинних посередників циклічного 3'-5' аденозінмонофосфату (сАМР) або продуктів гідролізу поліфосфоінзитидів, зокрема діацилгліцеролу (DAG). По відношенню до обох згаданих систем у літературі існують свідчення про можливість участі фосфорилування, здійснюваного цими ферментними системами, у модуляції активності Са каналів [Doroshenko et al., 1984; DeRiemer et al., 1985; Levitan 1985; 1987]. Проте, із всієї сукупності отриманих даних, часто суперечливих, не можна зробити однозначного висновку про напрямок їх дії, оскільки в одних випадках ці системи активували, в інших - пригнічували Са струм

(I_{Ca}). Також залишається неясною і роль внутрішньоклітинного Ca²⁺ у здійсненні цими системами модуляторних впливів на Ca-провідність мембрани. Тому задача з'ясувати молекулярний механізм регуляції активності кальцієвих каналів вторинними посередниками, а також взаємовідношення останніх у здійснюваній ними регуляції являється вельми актуальною; її рішення буде сприяти формуванню уявлень про фундаментальні принципи функціонування нервової клітини.

Мета роботи: Метою цієї роботи стало дослідження мембранних та внутрішньоклітинних механізмів модуляції системами вторинних посередників (cAMP, DAG, Ca²⁺), а також фармакологічними агентами активності потенціалокерованих Ca каналів мембрани нейронів молюсків.

Задачі:

1. Визначити природні зовнішньоклітинні ендogenous молекули, запускує cAMP- та DAG- залежне збільшення кальцієвої провідності мембрани нейронів молюску *Helix pomatia*.

2. З'ясувати участь процесів фосфорилування у індукваному різними зовнішньоклітинними сигналами збільшенні амплітуди кальцієвого струму.

3. Дослідити механізми взаємодії внутрішньоклітинних іонів кальцію із системами вторинних посередників (cAMP і DAG) у регуляції активності кальцієвих каналів мембрани.

4. Дослідити молекулярні механізми взаємодії антагоністів кальмодуліну з кальцієвими каналами клітинної мембрани.

5. Дослідити механізми змін у кінетиці інактивації кальцієвих струмів, індукованих фармакологічними агентами.

Наукова новизна: На підставі порівняльних досліджень ефектів 5-HT і cAMP показано, що участь cAMP-залежного фосфорилування у потенціалі кальцієвої провідності мембрани не є універсальною властивістю усіх нейронів мозку молюска *Helix pomatia* - cAMP-залежна регуляція I_{Ca} представлена тільки у частини нервових клітин. Встановлено, що нейрони, у яких проявляється cAMP-залежна позитивна модуляція кальцієвих каналів, локалізовані, головним чином, у педальних гангліях молюска. Показано, що наявність cAMP-залежної позитивної модуляції кальцієвих каналів корелює із присутністю у даного нейрону серотонінових рецепторів, фармакологічні характеристики яких відповідають властивостям підтипу 5-HT₁-подібних серотонінових рецепторів ссавців. Визначений молекулярний механізм пригнічуючої

дії внутрішньоклітинного Ca^{2+} на cAMP-залежно фосфорильовані кальцієві канали. Встановлено, що цей механізм лежить в основі десенситизації серотонінових рецепторів до дії агоністу у молюсків. Показано, що антагоністи кальмодуліну в значній мірі впливають на величину Іса. З'ясований характер цього впливу та запропонована модель взаємодії антагоністів кальмодуліну з кальцієвим каналом. Показано, що паратиреоїдний гормон (ПТГ) являється ендогенним активатором електронерованого транспорту Ca^{2+} у нервовій клітині. Встановлено, що цей гормон здійснює свою стимулюючу дію на кальцієву провідність мембрани молюска шляхом запуску ланцюга подій, включаючих активацію Ca^{2+} /фосфоліпід-залежної протеїнкінази.

Практична цінність. Отримані результати будуть сприяти розширенню уявлень про фундаментальні принципи функціонування нервової клітини. Результати досліджень представляють інтерес для біофізиків, біологів, фізіологів, фармакологів, ендокринологів, медиків, оскільки вони розширюють нашу уяву про механізми дії на нервові клітини гормонів та медіаторів, а також фармакологічних засобів, що застосовуються в медичній практиці.

Апробація роботи. Основні положення роботи були представлені на наукових семінарах секції «Молекулярна нейрофізіологія» Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН України (Київ, 1986-1992); III Радянсько-Німецькому симпозиумі «Excitable membranes» (Київ, 1987); II Всесоюзній конференції по нейронаукам (Київ, 1988); Німецько-Радянському симпозиумі «Membrane Physiology» (Heidelberg, 1989); конференціях молодих вчених м. Києва (Київ, 1989); Всесоюзній конференції «Механізми действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки» (Суздаль, 1989); Міжнародній конференції «64 Fyziologicke Dni» (Bratislava, 1990); II Радянсько-Іспанському симпозиумі по фізикохімічній біології «Biological membranes: structure and function» (Київ, 1990); III Всесоюзній конференції по нейронаукам (Київ, 1990); 2-ому Японо-Радянському спільному симпозиумі по структурі та функції рецепторів (Kyoto, 1991); Радянсько-Американському симпозиумі по молекулярній нейробіології (Київ, 1991); IV Радянсько-Німецькому симпозиумі «Excitable membranes» (Київ, 1991); Симпозиумі Країни Співдружності-США «Ionic channels and pumps» (Київ, 1992); 8 міжнародній конференції по вторинним посередникам та фосфопротеїнам (Glasgow, 1992).

Об'єм та структура дисертації. Дисертація складається із вступу, ог-

ладу літератури, опису методики, результатів власних досліджень та їх обговорення висновків та списку літератури, вміщеного 613 найменування. Робота викладена на 322 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 3 таблицями та 70 малюнками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури дисертації проведено аналіз даних про кальцієві потенціалокеровані канали збудливих мембран, їх властивості та метаболічну регуляцію, розглянуті деякі питання стосовно серотонінергічної сигнальної системи, а також регуляції Ca^{2+} гомеостазу ПТГ та ПТГ-спорідненим пептидом.

Методи досліджень.

Експерименти були виконані на нейронах підглоткового комплексу гангліїв виноградного слимака *Helix pomatia*. Наряду із використанням в дослідженнях неідентифікованих нейронів, в частині експериментів застосовувались ідентифіковані нервові клітини, прилеглі до групи вихідних нервів (VIII-X) педальних гангліїв (згідно схеми Kiliaas [1985]). Ідентифікування «педальних» нейронів робилось по наявності стимулюючої дії 5-HT на I_{Ca} у електрофізіологічному експерименті.

Для досліджень іонної провідності цитоплазматичної мембрани нейронів у всіх експериментах використовувався метод внутрішньоклітинної перфузії, який був вперше розроблений в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця (Костюк і соавт., 1975; 1981). Для аплікації досліджуваних сполук використовувалась методика, що забезпечує швидку зміну зовнішньоклітинного розчину за допомогою гідростатичного відсосу рідини. Система забезпечувала зміну омиваючого клітину розчину на протязі декількох секунд.

Склад використовуваних у роботі розчинів: для внутрішньоклітинної перфузії застосовували розчин, який містив (в ммоль/л): Трис-аспартат- 40, АТФ- 2, $MgCl_2$ - 3, $CaCl_2$ - 80, рН 7.3. Зовнішньоклітинний розчин включав: $CaCl_2$ - 20, $MgCl_2$ - 4, Трис- HCl - 100, рН 7.6. В окремих випадках до розчинів добавляли додаткові компоненти, вилучаючи при цьому відповідну кількість Трис-аспартату чи Трис-HCl. Для отримання всередині клітини фіксованої концентрації іонів Ca^{2+} застосовувався Ca^{2+} -EGTA буфер, розрахунок кількості $CaCl_2$ та буферної ємності розчинів (β) отримували із відповідних рівнянь, наведених у дисертації. В роботі був використаний цілий ряд фармакологічних сполук, перелік яких приведений у дисертації.

В експериментах використовувався метод фіксації мембранного

потенціалу за допомогою однієї піпетки. Величина послідовного опору складала 100-300кОМ. Для зменшення його впливу на якість фіксації мембранного потенціалу застосовувалась електронна компенсація послідовного опору. У всіх експериментах корекція лінійних компонентів струму збігу та струму перезаряду ємності мембрани здійснювалася шляхом сумачії срумів, викликаних одним деполяризуючим та двома слідуючими за ним гіперполяризуючими імпульсами рівними половинній амплітуді деполяризуючого зміщення (P/2 протокол). Дані фільтрувались активним фільтром нижніх частот (2 і 5кГц). Підсилений сигнал виміряного струму подавався на вхід оригінального аналогово-цифрового перетворювача, розробленого у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця (мінімальна швидкість оцифровки сигналу 20мкс, розрізнення перетворювання сигналу 12 біт). В якості програмуемого стимулятора, генеруючого імпульси потенціалу необхідної амплітуди тривалості і послідовності, а також для зберігання та обробки отриманої інформації служив персональний комп'ютер IBM PC/XT, оригінальне базове програмне забезпечення якого, керує роботою всього автоматизованого комплексу апаратури, було розроблено у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця. На основі цього забезпечення автором були створені специфічні більш досконалі програми (написані на мові Турбо Паскаль, версія 6.0 та на асемблері для операційної системи MS-DOS), які використовувались в експериментах, представлених у даній роботі.

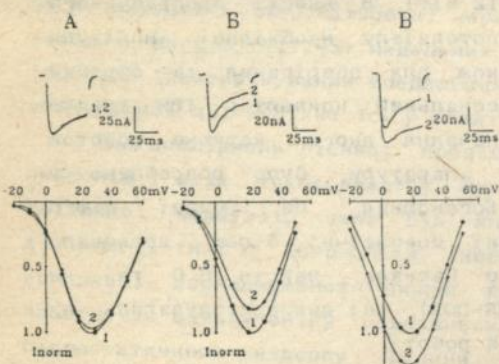
Кальцієвий вхідний струм (I_{Ca}) реєстрували при деполяризації мембрани від підтримуемого потенціалу $V_h = -50$ мВ до потенціалу мембрани, відповідаючого максимуму вольт-амперної характеристики (ВАХ) I_{Ca} , який у використовуваних експериментальних умовах звичайно складав $+10$ до $+30$ мВ, імпульсами тривалістю 50мс.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. МОДУЛЯЦІЯ 5-НТ КАЛЬЦІЄВОЇ ПРОВІДНОСТІ У РІЗНИХ НЕЙРОНІВ.

До вирішення поставлених задач ми підійшли з точки зору уявлення про cAMP як одного із компонентів певної сигнальної системи вторинних посередників. Виходячи із цього, в першу чергу необхідно було ідентифікувати зовнішній сигнал, активуючий cAMP каскад. Згідно до літературних даних, таким агентом у нейронів молюсків може служити серотонін. Дослідження впливу 5-НТ на I_{Ca} різних нейронів, як і очікувалось, показали, що різні нейрони по різному реагують на аплікацію

цього медіатору. По типу індукованих 5-НТ змін I_{Ca} їх можна було розділити на три групи: а) нейрони, у яких 5-НТ не здійснював помітного впливу на амплітуду I_{Ca} ; б) зворотно і частково блокував I_{Ca} ; в) збільшував I_{Ca} . Ступінь блокування I_{Ca} серотоніном у різних нейронів розрізнялась але не перевищувала 20%, тоді як величина стимулюючого ефекту 5-НТ мало відрізнялась від клітини до клітини і залежала від умов експерименту. В останньому випадку спостерігалось значне 5-НТ індуковане сповільнення інактивації I_{Ca} (див. криві I_{Ca} Мал. 1, В). У процентному відношенні із загального числа досліджуваних нейронів навкологлоткового кільця (114 клітин) вони складали а) 34%, б) 54%, в) 12% для нечутливих до 5-НТ нейронів, нейронів із блокувчим і стимулюючим ефектами відповідно. При використанні фрагментів із педальних гангліїв, співвідношення вказаних груп нейронів було іншим: а) 24%, б) 27%, в) 49%.



Мал. 1. Приклади трьох типів відповідей чутливості I_{Ca} до аплікації $10\mu\text{M}$ 5-НТ у 3 різних нейронів: А - клітина у якій I_{Ca} не змінювався, у якій спостерігалось зворотне зменшення I_{Ca} (Б) і зворотне збільшення I_{Ca} (В). Вольт-амперні криві нормалізовані до амплітуди струму у контрольних умовах. Криві струму відповідають максимумам ВАХ які були виміряні у контролі (1) і після аплікації 5-НТ (2).

1. 1. СТИМУЛЮЩИЙ ЕФЕКТ 5-НТ.

Дослідження концентраційної залежності стимулюючого ефекту 5-НТ показало, що поріг чутливості клітин до 5-НТ складав приблизно $0.1\mu\text{M}$, половинне збільшення I_{Ca} відбувалося при концентрації $0.6\mu\text{M}$ 5-НТ, а насичення ефекту наступало при $5\mu\text{M}$ 5-НТ. Для виключення можливого вкладу у стимулюючий ефект 5-НТ змін протилежно спрямованого струму іонів, у експериментах використовувались внутрішньоклітинні розчини, у яких іони K^+ були заміщені на непроникні через калієві канали іони Cs^+ . У ряді експериментів реєстрації проводились у присутності блокаторів калієвого і неспецифічного вихідних струмів (80 mM ТЭА і 10 mM 4-амінопіридину), при використуванні у якості носіїв вхідного струму іонів Ba^{2+} , а також при збільшенні внутрішньоклітинного рН від 7.4 до 7.9 (найбільш ефективний шлях усунення вихідного струму

[Doroshenko, et al., 1986]). У всіх вищезгаданих випадках стимулююча дія 5-НТ на I_{Ca} зберігалась. Крім того, дослідження показали, що 5-НТ практично не змінює величину затриманого калієвого струму соми педального нейрону. Стимулюючий ефект 5-НТ на I_{Ca} також не залежав від величини підтримуемого потенціалу.

1.2. ФАРМАКОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5-НТ РЕЦЕПТОРІВ.

Особливий інтерес становило визначення типу 5-НТ рецепторів педальних нейронів. З цією метою були застосовані селективні антагоністи і агоністи 5-НТ рецепторів ссавців [Bradley et al., 1986]. Дослідження показали, що антагоністи 5-НТ₂ рецепторів - ципрогептадин (10+50 μ М) або нетансерін (10+60 μ М), а також 5-НТ₃ типу - кокаїн (5+25 μ М і ІС₃ 205-930 (10+50 μ М) не пригнічували стимулюючу дію 5-НТ, у той же час антагоніст 5-НТ₁ і 5-НТ₂ рецепторів метіотепін (10+50 μ М) в таких самих концентраціях повністю усував стимулюючу дію 5-НТ на I_{Ca} . Пригнічення було практично повним при потенціалах, відповідаючих максимуму ВАХ, але було не повним при більш від'ємних потенціалах мембрани. В той же час, специфічні агоністи 5-НТ₁ рецепторів (25 μ М іпсапірон або 10 μ М 8-ОН-DPAT) не були ефективними в імітації дії 5-НТ. Аналогічні якості проявляв частковий агоніст 5-НТ₁ рецепторів - 10 μ М 5-хлортриптамін, а також сполуки - алкалоїд ергометрин (1 μ М), та нейролептик флуфеназін (10 μ М). В той же час, допамін у концентрації 10 μ М індукував збільшення I_{Ca} у педальних нейронах на ~40%, що в 2 рази перевищувало ефект, спричиняемий такими ж концентраціями 5-НТ. Експерименти показали, що ці два медіатори, мабуть зв'язуються з різними рецепторами. Так, антагоніст допамінових рецепторів ергометрин у концентрації 1 μ М повністю усував стимулюючу дію допаміна на I_{Ca} , але не спричиняв впливу на збільшення струму, викликане 5-НТ. Також селективно пригнічували ефект допаміну, не впливаючи на дію 5-НТ, 5-хлортриптамін (10 μ М) і флуфеназін (10 μ М), хоча останній був менш ефективним. В той же час, збільшення I_{Ca} , викликане спільною дією цих двох медіаторів (5-НТ і допаміну), не було адитивним. Виявилось, що допамін міг чинити стимулюючий вплив на I_{Ca} тільки у тих же нейронів, що і 5-НТ (педальних). У інших нейронів - не чутливих до 5-НТ або клітин з блокуючою дією 5-НТ на I_{Ca} - не спостерігалось синергічності дії медіаторів. Результати цих дослідів свідчать, що обидва медіатори, певно, діють на I_{Ca} через одну і ту ж систему внутрішньоклітинних посередників, однак через активацію різних рецепторів.

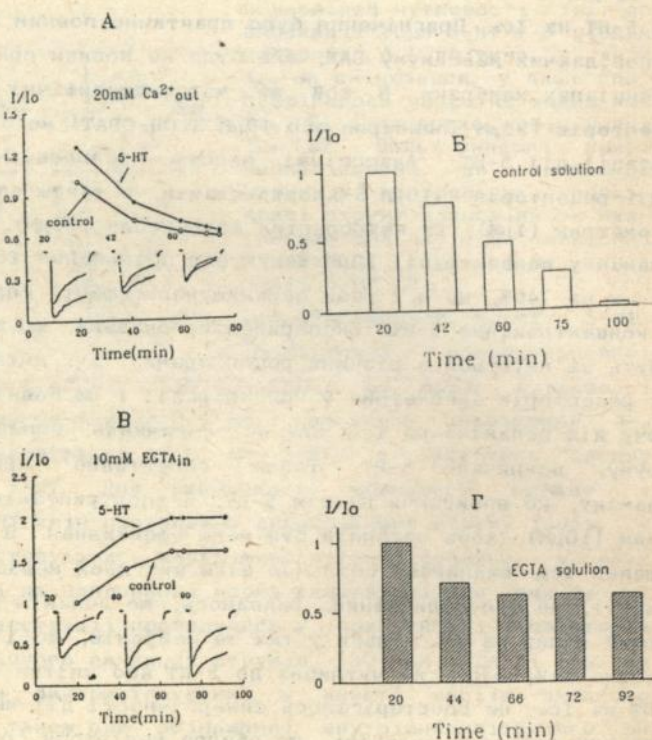
1.3. УЧАСТЬ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ПРОЯВІ 5-НТ ЕФЕКТУ.

При проведенні тривалих експериментів, у яких проводилась багаторазова аплікація медіатора і електрична стимуляція мембрани, спостерігалась десенситизація до потенціюючої дії 5-НТ. З Мал. 2 видно, що найбільш ефективним способом усунення десенситизації виявилось використання EGTA (10mM), Мал. 2, В-Г. Останнє свідчить про участь Ca^{2+} у десенситизації 5-НТ ефекту. Досліди показали малу ефективність заміщення зовнішньоклітинних іонів Ca^{2+} на іони Ba^{2+} у запобіганні десенситизації. Для встановлення можливого залучення циклічних нуклеотидів у досліджуваний ефект 5-НТ був протестований вплив двох селективних блокторів фосфодіестерази циклічних нуклеотидів (FDE) - теофіліну (5mM) та ізобутилметилксантину (IBMX, 100-500 μ M) на величину ефекту 5-НТ. Із цих експериментів з'ясувалось, що в той час як теофілін сам по собі слабо збільшував

Мал. 2. Зміни у часі піку I_{Ca} (нормалізованого до його величини на початку експерименту у контролі) у двох клітинах. Виміри величини струму (А) та величини ефекту 5-НТ (Б) отримані в контрольних умовах та при додаванні в перфузат 10mM EGTA (В, Г). Пік I_{Ca} у контролі позначений світлим і в присутності 10 μ M 5-НТ - темними кружками і відповідає верхній та нижній кривим струму відповідно. Біля кривих позначено час реєстрації I_{Ca} . $V_{test} = 20mV$.

I_{Ca} , він сильно потенціював стимулюючу дію 5-НТ в його присутності ефект 5-НТ складав 40-50%. Менш виразно

була дія IBMX. Використання форсколіну (10-50 μ M) - специфічного



вже через декілька хвилин перфузії 5-НТ губив здатність стимулювати Іса. Ці результати виключають прямий вплив 5-НТ на Са канали через G_s-зв'язування, внаслідок на участь тільки процесу cAMP-залежного фосфорилування у підтримці стаціонарної величини 5-НТ ефекту.

Теоретичні передумови про механізм дії Ca²⁺. Особливістю Са блокади ефекту 5-НТ виявилось те, що експериментальні точки, представлені на Мал. 4. не могли бути задовільно описані ізотермами Ленгмюра як для моно-, так і для полімолекулярного зв'язування Ca²⁺. В той же час, вони могли бути точно апроксимовані кривою, що мала незвичайну біфазну форму (Мал. 4), рівняння якої має вигляд:

$$Y = c(1 + X^4/Kd_1^4)^{-1} + p(1 + X^4/Kd_2^4)^{-1}; \quad (1)$$

Наведене рівняння складається із суми двох подібних компонентів, кожен із яких описує криву Ленгмюра для тетрамолекулярного зв'язування. Розрізняються ці компоненти тільки значеннями констант. Емпірично підібрані величини констант (рі-ня 1), відповідають значенням Kd₁=1μM; Kd₂=0.063μM; c=0.6; p=0.4. Якщо розглядати кальцієву блокаду ефекту 5-НТ як звичайний ферментативний Са-залежний процес, то рівняння передбачає участь двох ферментів у досліджуваному процесі. Змінні в даному випадку становлять собою Y - величину ефекту 5-НТ (I/I₀); X = [Ca²⁺]_i; а Kd₁ і Kd₂ - константи дисоціації для двох ферментів; с і р - коефіцієнти пропорційності. Отже, доля участі в досліджуваному процесі компоненту с Kd₁ складає 60%, а з Kd₂ - відповідно 40% сумарного Са-залежного пригнічення Іса (с/р=1.5). Можна припустити, що два компоненти рівняння описують активацію Ca²⁺/кальмодулін (СМ) залежних ферментів, поскільки саме для цих ферментів характерна висока кооперативність, що дозволяє здійснювати різьку активацію/інактивацію ферментів в дуже вузькому діапазоні змін концентрації Ca²⁺. Відомий ряд ферментів, володіючих такими властивостями [Weiss, Drummond, 1985; Walsh, 1985].

Участь кальмодуліну. Кожний із ферментів-претендентів має свої специфічні особливості, але загальною для всіх є їх залежність від СМ. Тому у наступній серії експериментів були використані антагоністи СМ із класу фенотіазинів - трифторперазин (TFP) та хлорпропімазін (CPZ). Розчин з pCa_i=5 розділяли на дві частини; перша із них служила контролем, у другу добавляли 50μM TFP. Тестування обох розчинів проводили в одному й тому ж експерименті по черзі на різних клітинах. В контрольному розчині з pCa_i=5 у всіх досліджуваних

клітинах ($n=11$) вже на протязі декількох хвилин наступала повна і незворотня десенситизація до дії 5-НТ. Якщо ж використовувався TFR-розчин ($pCa=5$), то повної десенситизації не наступало, а величина ефекту 5-НТ складала 77% по відношенню до контролю. Таким чином, в присутності TFR у клітині збільшення кальцієвої провідності мембрани, викликане 5-НТ, ставало малочутливим навіть до $10\mu M$ внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Схожою «протикальцієвою» властивістю володів і інший антагоніст кальмодуліну - хлорпромазин. Ці результати однозначно свідчили про CM-залежну природу процесу кальцієвої блокади.

Участь кальмодулін-активуваних ферментів. Експериментальні умови виключали участь Ca^{2+} -CM-залежної форми аденілатциклази, оскільки в досліджуваному діапазоні ($[Ca^{2+}]_i=0.1-10\mu M$) відбувається її активування [Weiss, Drummond, 1985, Lazo et al., 1985]. Зважаючи на особливості інших можливих ферментів, найбільш придатними на роль учасників в досліджуваному нами феномені виявились Ca^{2+} /CM-залежні фосфодіестераза (PDE) та протеїнфосфатаза-2B (кальцінеїнрин, CN). Так, відомо, що Kd PDE лежить в області $0.1-0.2\mu M$ [Kramer и др., 1988; Sharma, Wang, 1986], що близько до значення, отриманного нами $Kd_2=0.063\mu M$ ($\sim 0.1\mu M$), а Kd CN ($\sim 1\mu M$) [Stewart et al., 1982; Stewart et al., 1983] співпадає з отриманою нами величиною $Kd_1=1\mu M$. Для обох ферментів Ca ізотерми зв'язування, отримані у біохімічних експериментах відповідають тетрамолекулярному зв'язуванню [Kramer et al., 1988; Sharma, Wang, 1986; Stewart et al., 1982]. Крім того, був показаний значний вміст цих ферментів у нервовій тканині, у тому числі і в нервовій тканині молюсків- Ca/CM фосфодіестерази [Kramer et al., 1988] і CN в мозку молюску *Aplysia* [Saitoh, Schwartz, 1983; Endo et al., 1992]. Накінець, різними авторами була показана участь окремо як одного, так і іншого із цих ферментів в run-down Ica у молюсків [Дорошенко, Мартинюк, 1982; Chad, Eckert, 1985; Chad, Eckert, 1986]. Тому в наступних дослідженнях використовувався ряд хімічних агентів, селективно блокуючих активність цих двох ферментів.

Експериментальний доказ теорії. Серія досліджень була поставлена з метою експериментального розділення на два компоненти сумарного кальцієвого блокування 5-НТ ефекту. Для цього були зняті ізотерми для Ca^{2+} зв'язування в присутності досліджуваних блокаторів. Антагоністи кальмодуліну не спричиняли вибіркового інгібування ні одного із ферментів, вони ефективно відвертали дію Ca^{2+} у всьому діапазоні змін $[Ca^{2+}]_i$. Останнє свідчило про те, що їх дія

направлена, головним чином, на інактивацію CM.

При дослідженні дії блокаторів PDE для нас виявився непередбаченим той експериментальний факт, що теофілін був неефективним у відношенні до блокування Ca^{2+} -залежної PDE. В його присутності проходила лише потенціація ефекту 5-НТ, в результаті чого контрольна ізотерма (рі-ння (1)) майже не зміючись зсувалось вгору:

$$I/I_0 = 6.66(1 + X^4/K_{d1}^4)^{-1} + 4.44(1 + X^4/K_{d2}^4)^{-1} + 0.38; \quad (2)$$

з $K_{d1} = 0.61 \mu\text{M}$ і $K_{d2} = 0.063 \mu\text{M}$.

При цьому дещо зменшилось тільки значення K_{d1} , тоді як співвідношення владу двох ферментів було таким же, як і в контрольних умовах $s/p = 1.5$ (див. рі-ння (1)). Така поведінка кривої легко пояснюється ефективним блокуванням ТЕО-тільки Ca^{2+} -незалежної форми PDE, що і обумовлює Ca^{2+} незалежний приріст ефекту 5-НТ.

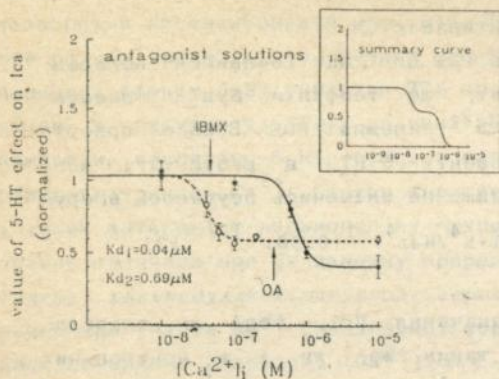
Отримані ізотерми для зв'язування Ca^{2+} в присутності в одному випадку блокатору Ca^{2+} -залежної фосфодіестерази - IBMX і в другому фосфатази - OA, дозволили в чистому вигляді спостерігати роздільно дві Ca^{2+} -залежні активаційні криві для кожного із ферментів (Мал. 5). Як можна бачити, теоретичні криві Ca^{2+} -залежної активації CN і PDE, описуючі експериментальні точки, відповідають тетрамолекулярному зв'язуванню Ca^{2+} і описуються рівняннями:

$$I/I_0 = 0.63(1 + X^4/K_{d1}^4)^{-1} + 0.4 \quad (3)$$

$$I/I_0 = 0.45(1 + X^4/K_{d2}^4)^{-1} + 0.58; \quad (4)$$

з $K_{d1} = 0.69 \mu\text{M}$ і $K_{d2} = 0.04 \mu\text{M}$ для CN и PDE відповідно.

Якщо скласти ці два рівняння, то можна отримати криву, відображуючу сумарну активність CN і PDE в Ca^{2+} -залежному блокуванні ефекту 5-НТ, Мал. 5. Як можна бачити, ця «експериментальна» крива мало чим відрізняється від передбачаємої. (Мал. 4), і повністю підтвержує вірність нашого припущення. Дійсно, всі параметри рівнянь (3) і (4) виявились дуже близькими до передбачених раніше (рі-ння (1)). Співвідношення вказуюче на відносний влад ферментів в процес блокування ($s/p = 1.4$), також видалось близьким до значення, отриманого із рі-ння (1). Про це також свідчать і значення вільних членів рівнянь, співвідношення яких складає 1.45. Їх абсолютна величина показує долю участі ферменту, залишившогося неблокованим в сумарному процесі. Деякі розбіжності виявились лише в значеннях K_d . Для обох



Мал. 5. Трансформація біфазної кривої блокувачами фосфодіестерази і протеїнофосфатази. Символи позначають усереднені дані отримані на різних клітинах. Величина ефекту $10 \mu\text{M}$ 5-HT виміряна в присутності $2 \mu\text{M}$ оокаїнової кислоти (OA) (світлі кружки) і $100 \mu\text{M}$ IBMX (темні кружки) при різних концентраціях Ca^{2+} . Дві криві відповідають рівнянню (3) (пунктирна лінія) і рівнянню (4) (суцільна лінія). Зверху представлена сумарна крива рідень 3 і 4.

випадків вони були дещо меншими, що обумовило зсув сумарної «експериментальної» кривої вліво. Оскільки зсув в значеннях K_d в більшій чи меншій мірі набувався при використанні всіх агентів, він може бути пояснений впливом блокувачів на властивості зв'язування досліджуваних ферментів. Таким чином, для описання Ca^{2+} -залежного блокування cAMP опосередкованого підсилення Ica необхідно і достатньо враховувати активності тільки двох ферментів. Інші процеси, мабуть, не приймають участі в досліджуваному феномені.

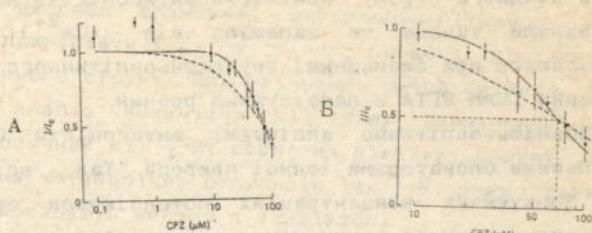
2. ДІЯ АНТАГОНІСТІВ КАЛЬМОДУЛІНУ НА КАНАЛЬНУ МОЛЕКУЛУ.

Антагоністи кальмодуліну спричиняли пригнічуючу дію на базальну амплітуду Ica в контрольних умовах експерименту. Для з'ясування можливих причин такої блокади, ми провели детальні дослідження цього феномену. В дослідках використовувались неідентифіковані нейрони, оскільки цей ефект проявлявся однаково у всіх клітин. Приймаючи до уваги уявлення про Ca -зв'язуючі властивості Ca каналів, припускаючи наявність CM-подібного ділянки у складі молекули каналу, ми дослідили можливість модуляції Ica шляхом безпосередньої взаємодії антагоністів з каналом. У якості інструментів були використані антагоністи кальмодуліну (CPZ, TFP і кальмідазоліум).

Залежність величини ефекту антагоніста від його концентрації досліджувалась в діапазоні від 0.1 до $100 \mu\text{M}$ і виявилась достатньо складною. В субмікромолярних концентраціях всі досліджувані сполуки стимулювали Ica , а в більших (мікромолярних) пригнічували його. Приклад такої залежності показаний на Мал. 6, А. Суттєвої різниці концентрацій, викликаючих стимулюючий ефект, так і амплітуди

викликаємого стимулюючого ефекту для різних агентів не спостерігалось. І перший і другий ефекти були зворотними при відмиванні.

Мал. 6. Концентраційна залежність дії хлорпромазину (CPZ) на I_{Ca} . А Точками позначені величини модифіковані величини струму нормалізовані до контрольної величини (кількість досліджуваних клітин для різних концентрацій починаючи з $0.1 \mu M$ була наступною: 6, 5, 26, 10, 4, 9, 6, 4, 3, 4, 1 і 6).



Суцільна лінія відповідає бімолекулярному ($I/I_0 = (1 + [X]/K_d)^{-1}$) і пунктирна — мономолекулярному ($(I/I_0 = (1 + [X]^2/K_d^2)^{-1/2})$) зв'язуванню сполуки з каналом. Б концентраційна залежність блокади I_{Ca} хлорпромазином. Дані являються частиною представлених у А. Константа дисоціації $K_d = 70 \mu M$ в обох випадках. I і I_0 являються максимальною величиною I_{Ca} , виміряною в присутності блокатора при концентрації $[X]$ та в контролі відповідно.

Блокуюча дія антагоністів кальмодуліну. Розглядаючи особливості блокади I_{Ca} досліджуваними сполуками, необхідно відмітити повільний розвиток цього ефекту. Характерною особливістю концентраційної залежності являється те, що незначна зміна концентрації антагоніста (в 10 раз) викликала значне пригнічення I_{Ca} (аж до 80%), що передбачає кооперативний ефект у дії антагоністів. Трансформація доза-ефект залежності в координати Снетчарда показала, що ця залежність має випуклу форму. Ступінь кооперативності визначалась із експериментальної залежності, представленої координатами Хілла. Нахил прямої дорівнював 2; отже, блокування Ca каналу, мабуть, проходить при зв'язуванні двох молекул антагоніста з певною ділянкою каналу.

Теоретична крива, описуюча таку взаємодію, показана на Мал. 6, Б. Теоретична крива для ефекту мономолекулярного (один до одного) зв'язування також подана для порівняння (пунктирна лінія). Перша крива апроксимує експериментальні точки більш точно, чим друга. Половинне пригнічення (і отже, константа рівноваги, характеризуюча зв'язування) відповідає $70 \mu M$ CPZ. Потенціалозалежність блокуючої дії антагоністів кальмодуліну, мабуть, відображає той факт, що місце взаємодії розташоване у товщі мембрани.

Аналіз блокуючої дії CPZ на I_{Ca} показав, що вона не залежить від природи транспортуемого іону: струм, переносимий іонами Ca^{2+} , пригнічувався так само, як і Ba^{2+} . Експериментальні точки, взяті для

обох випадків, добре описувались такою же самою кривою для обох типів вхідного струму. здатність антагоністів кальмодуліну блокувати Са канали також не залежала від $[Ca^{2+}]_i$. Наприклад, вона зберігалась при зменшенні внутрішньоклітинного рівня кальцію шляхом введення 10мМ EGTA в перфузуючий розчин.

Зовнішньоклітинно аплікуємі антагоністи СМ взаємодіяли з каналними блокаторами іонної природи. Так, всі тестуємі сполуки при блокуючих концентраціях потенціювали ефективність Co^{2+} і Cd^{2+} -індукованого пригнічення кальцієвого струму, тобто спільна дія антагоніста і іонного блокатора викликала більший блокуючий ефект на I_{Ca} , чим кожного із них взятого окремо. Два набори експериментальних точок (у контролі та в присутності Cd^{2+}) добре описуються кривими для мономолекулярного зв'язування з суттєво відрізняючимися рівноважними константами - 90 і 50 μ М, відповідно. Ефект CPZ проявлявся в зсуві доза-ефект кривої для Cd^{2+} вліво, що свідчить про збільшення спорідненості зв'язування Cd^{2+} у каналі. Таким чином, в присутності антагоністів СМ ефективність блокування Са каналів іонними блокаторами збільшувалась внаслідок посилення зв'язування останніх у каналі.

Подібні експерименти з малими (стимулюючими) концентраціями антагоністів СМ не дали ясних результатів. Чотири із 12 тестуємих клітин при 0.5 μ М CPZ показали 10% зменшення блокуючої здатності іонів Cd^{2+} , тоді як у решти клітин величини Cd^{2+} -індукованої блокади в присутності і у відсутності CPZ були однаковими.

На основі отриманих результатів була створена модель взаємодії антагоністів СМ з каналом. Вона базується на припущенні про зв'язування проникаючого через канал іону з молекулою каналу. Антагоністи СМ, ліпід-розчинні сполуки, взаємодіють з каналом в товщі мембрани, зв'язуючись з двома іншими локусами молекули каналу. При цьому вони змінюють силу зв'язування проникаючого катіону із каналом, яка і визначає величину створюваного катіонами струму. Заповнення антагоністами кальмодуліну локуса з високою спорідненістю зв'язування веде до послаблення сили зв'язування катіонів у каналі (і, отже, до збільшення амплітуди струму), а заповнення локуса з низькою спорідненістю до підсилення зв'язування катіонів у каналі (до пригнічення струму).

3. ПРИРОДА ЗМІН ІНАКТИВАЦІЇ Са СТРУМУ, ІНДУКОВАНИХ ФАРМАКОЛОГІЧНИМИ АГЕНТАМИ.

Як відмічалось вище, аплікація 5-НТ на сому печальних нейронів, крім збільшення I_{Ca} , викликає також зміну його інактивації - виникає

зворотнє сповільнення спаду струму (напр. Мал. 1, В). Такий ефект 5-НТ-індукованого «розгину» кривої Іса суттєво зменшувався у бар'єрних розчинах, а також при високим значеннях внутрішньоклітинного рН. Останнє дало підставу припустити роль у цьому процесі протилежно направленого неспецифічного струму. Для уточнення цього питання був проведений детальний аналіз механізму дії ряду фармакологічних сполук, що чинять аналогічний дії 5-НТ ефект на кінетику струму, але не спричиняють впливу на метаболічну регуляцію Іса. В ряду таких сполук особливе місце посідають ментол і тіадіазол.

3.1. ДІЯ ТІАДІАЗОЛУ НА ЕЛЕКТРОЗБУДЛИВУ МЕМБРАНУ.

Було встановлено, що амплітуда і кінетика натрієвого і швидкого калієвого струмів практично не змінюються під впливом тіадіазолу в концентраціях до 5 мМ. Зміни Іса при введенні тіадіазолу залежали від експериментальних умов. В контрольних умовах тіадіазол в концентраціях 0.1-3 мМ усував швидку фазу спаду струму при тривалих деполаризуючих зміщеннях мембранного потенціалу («інактивацію»). При достатньо великих деполаризаціях, коли становиться помітною активація залишкового вихідного струму, застосування тіадіазолу крім «розгибання» кривої вхідного струму (сповільнення інактивації струму) ефективно усувало вихідний компонент струму. Аналогічні зміни Іса спостерігались при підвищенні рН (Дорошенко и др., 1982), що пояснюється усуненням в цих умовах вихідного струму іонів H^+ . Саме пригніченням водневого струму можна пояснити розгибання Іса індуковане тіадіазолом. Дійсно, в умовах досліду, що виключають неспецифічний струм (рН: 8.2), застосування тіадіазолу у тих же концентраціях практично не впливало на величину та кінетику Іса. Характерним чином змінювався при аплікації тіадіазолу затриманий H^+ струм. Криві цього струму, що свідчили про наявність глибокої інактивації у контролі, під впливом тіадіазолу майже повністю «розпрямлялись». Усунення інактивації супроводжувалось також збільшенням часу досягнення струмом максимального пікового значення. Схожі з описаними вище ефекти тіадіазолу спостерігались і при внутрішньоклітинному введенні цієї сполуки.

Дослідження впливу тіадіазолу на величину неспецифічного (водневого) струму показали, що в присутності цього агенту амплітуда вихідного компоненту струму помітно зменшувалась. Дія сполуки була зворотною, повільнопротікаючою і була ефективною і при її внутрішньоклітинному введенні у тих же концентраціях. Таким чином, ці дос-

лідження показали, що схожі с дією 5-НТ зміни кінетики I_{Ca} , викликані тіадіазолом, обумовлені, головним чином, пригніченням компоненту вихідного струму.

3.2. Дія ментолу на електрозбудливу мембрану.

При зовнішньоклітинній дії ментол викликав характерні зміни I_{Ca} : амплітуда піків струму зменшувалась, а швидкість його спаду після досягнення пікового значення помітно зростала. Дія ментолу розвивалась на протязі 1-3 хв., причому помітні зміни кінетики струму проходили швидко, тоді як зміни амплітуди струму були більш тривалими.

Зовнішні прояви ефектів ментолу на I_{Ca} нагадували характер зміни струму внаслідок зниження внутрішньоклітинного рН (тобто посилення вихідного струму іонів H^+). Однак зовнішньоклітинне застосування 4-амінопіридину (5мМ), пригнічуючого водневий струм, практично повністю усувало індукований ментолом вихідний компонент струму, але не приводило до зникнення швидкої фази спаду I_{Ca} . Це ж було справедливим і по відношенню до тіадіазолу. Ці результати заперечують припущення про вклад підсилення вихідного струму іонів H^+ в індуковані ментолом зміни I_{Ca} . З цим результатом повністю узгоджуються також збереження ефекту ментолу в умовах перфузії клітини розчинами із підвищеним рН (8.2). Кінетику розвитку індукованого ментолом спаду I_{Ca} доцільно було досліджувати в умовах двохімпульсного експерименту, дозволяючого визначати ступінь розвитку цього процесу в початковий період часу паралельно із процесом активації струму. В таких експериментах тривалість міжімпульсного інтервалу і тестуючого зміщення мембранного потенціалу зберігались постійними (20 мс). Досліджувалась залежність амплітуди піків струму, активованого $V_t = +25$ мВ, від тривалості кондиціонуючого зміщення також до рівня 25 мВ. Виявилось, що амплітуда тест-струму зменшувалась в міру подовження першого зміщення. Вже при тривалості кондиціонуючої деполаризації 1-2 мс амплітуда тест-струму була менше максимально можливої. Це дає підставу припустити, що в присутності ментолу процес спаду струму починається одночасно з початком деполаризації мембрани (або з дуже невеликою затримкою), значно раніше часу досягнення I_{Ca} пікового значення.

В напівлогарифмічному масштабі досліджувана залежність мала вигляд кривої, яку можна було подати у вигляді суми двох експонент з постійними часу τ_1 і $\tau_2 > 100$ мс, причому швидка експонента мала прибли-

Зміни амплітуди струму в часі представлені на Мал. 7, А. Клітина, перфузуєма розчином вміщущим 2мМ АТР, відповідала на застосування гормону звичайним збільшенням амплітуди струму, Мал. 7, А (крива 1). Чітко видно, що амплітуда I_{Ca} зростала більш ніж на 50%, досягаючи максимальної величини на 60+70 хв. дії гормону. Усунення АТФ із перфузуючого розчину приводило до повного зникнення (Мал. 7, крива 3) або значного послаблення ефекту. Необхідність присутності у складі перфузату АТФ вказувала на залежність ефекту гормону від енергетично залежних процесів клітини.

4.4. *Внутрішньоклітинний кальцій і ефект ПТГ.* Окрім АТФ, присутність EGTA у внутрішньоклітинному перфузуючому розчині також чинила значну дію на величину ПТГ ефекту. У випадку перфузії клітини розчином що містить АТФ із фіксованою підвищеною концентрацією вільного Ca^{2+} (10^{-6} М) 10^{-10} М ПТГ викликав виражене збільшення амплітуди I_{Ca} , тоді як при додаванні 10мМ EGTA (рівень вільного Ca^{2+} нижче 10^{-7} М) потенціалії ефекту не спостерігалось (Мал. 7, крива 2) або спостерігалось його значне послаблення. Очевидно, внутрішньоклітинний Ca^{2+} являється необхідним для розвитку ефекту. Прийняті разом, ці спостереження припускали можливу роль Ca^{2+} залежних метаболічних процесів у потенціуючому ефекті ПТГ.

4.5. *ПТГ змінює Ca провідність мембрани.* На остеобластах щура було показано, що ПТГ може активувати Cl провідність мембрани [Chesnoy-Marchais & Fritsch, 1989]. Тому, виникла необхідність в проведенні спеціальних досліджень по виявленню можливої участі аніонних каналів у ефекті ПТГ. В наших дослідях після розвитку ефекту гормону зовнішньоклітинні іони Ca^{2+} були замінені на проникні через кальцієві канали іони Ba^{2+} (10 мМ); при цьому амплітуда струму після заміни носія струму збільшилась в ~3.5 рази і суттєво не змінювалась на протязі десятків хвилин, засвідчуючи про збереження ефекту гормону в присутності іонів Ba^{2+} .

В наступній серії експериментів ми використовували блокатори кальцієвих каналів для демонстрації участі у ефекті ПТГ змін активності саме Ca^{2+} каналів мембрани. В цих експериментах ми зважали на той факт, що агенти, пригнічуючі I_{Ca} , можуть також блокувати і Ca -залежні струми, в тому числі і $I_{Ca}(Ca)$ і $I_{Ca}(Ca)$; тому використовувались внутрішньоклітинні розчини, що містили Ca -EGTA буфер із $[Ca^{2+}]_i = 1\mu M$. Зовнішньоклітинний Cd^{2+} (50 μM) зворотно блокував збільшення I_{Ca} , індуоване ПТГ, також як і базальний струм на протязі декількох

секунд на $92 \pm 7\%$ ($n=4$). Додавання другого блокатору - верапамілу ($50 \mu\text{M}$) також приводило до пригнічення Ca струму на $80 \pm 5\%$ ($n=3$) реєструємого під час розвитку ефекту ПТГ. $10 \mu\text{M}$ ніфедіпіну і $10 \mu\text{M}$ німодіпіну зворотньо блокували індуковане 10^{-9}M ПТГ збільшення струму на $60 \pm 7\%$ ($n=4$) і $66 \pm 4\%$ ($n=5$) відповідно; швидкість розвитку дії блокаторів і час відмивання були приблизно однаковими. В той же час, аплікація DHP агоністу - Вау К-8644 в концентраціях 5 і $10 \mu\text{M}$ не приводила до помітної зміни амплітуди струму ($n=4$). Таким чином, DHP антагоністи кальцієвих каналів чинили дію, аналогічну іншим блокаторам, ясно вказуючи на направленість ефекту ПТГ саме на I_{Ca} .

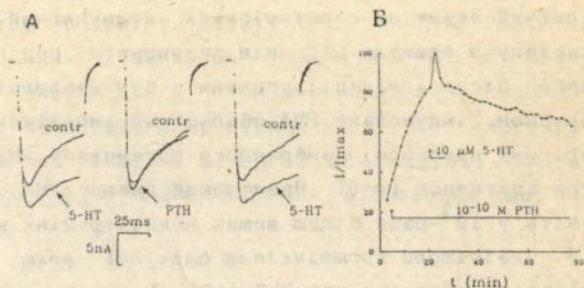
В той же час дослідження дії селективного блокатору Cl^- каналів - DIDS - на ПТГ індуковане збільшення. I_{Ca} підтвердило, що Cl^- струм не приймає участі в спостерігаємому феномені, оскільки у всіх тестуємих клітин ($n=6$) DIDS не змінював амплітуди ПТГ індукованого приросту Ca струму в концентраціях 0.5-1мМ.

І нарешті, ще одним свідотством на користь того, що Cl^- струм не приймає участі в спостерігаємому ефекті ПТГ, являється той факт, що в області рівноважного потенціалу для іонів Cl^- (E_{Cl}) ефект гормону був близьким до максимального.

4.6. *Індуковане ПТГ збільшення кальцієвого струму не опосередковане цАМФ і цГМФ.* Природньо, надзвичайно цікавою задачею було визначення механізму дії ПТГ. В силу монотонно повільного протікання ефекту гормону найбільш ймовірною здавалася участь вторинних посередників в трансдукції паратиреоїдного сигналу. Нами були здійснені спроби з'ясувати, чи приймають участь циклічні нуклеотиди у реалізації дії гормону. Були виявлені два різних впливи цАМФ на I_{Ca} . У більшості досліджуваних клітин спостерігалась лише деяка стабілізація амплітуди струму. Тільки у деяких клітин із педальних гангліїв відбувалося зростання амплітуди I_{Ca} на $40 \pm 5\%$, при цьому максимальний ефект спостерігався через 25-30 хвилин досліду, після чого I_{Ca} швидко зменшувалася. Порівняння ефектів сАМФ і ПТГ дало підставу припустити їх різну природу. Було дуже зручно використати педальні нейрони для дослідження участі сАМФ-залежної системи вторинних посередників в дії ПТГ. Протокол експерименту нічим не відрізнявся від попередніх. Після розвитку ефекту ПТГ в омиваючий розчин був добавлений $10 \mu\text{M}$ 5-НТ, і через 5 хв. було проведене його відмивання. Як можна бачити з Мал. 8, Б, ефекти ПТГ і 5-НТ були адитивні. Оскільки, як нами було

Мал. 8. Порівняння ефе-

ктів 5-НТ і ПТГ на I_{Ca} у тій самій клітині. А Представлені криві I_{Ca} , отримані на одній і тій же клітині у контролі і після аплікації $10 \mu M$ 5-НТ або $0.1 \mu M$ rPTH(1-34). Криві представлені у часовій послідовності їх реєстрації. Б Зміни у часі піку I_{Ca} другої клітини. Аплікації $0.1 nM$ ПТГ і $10 \mu M$ 5-НТ позначені горизонтальною лінією зі стрілкою. Внутрішньоклітинний розчин містив $2 mM$ АТР у відсутності EGTA. Тест потенціал $+20 mV$.



встановлено раніше, cAMP-залежний ефект 5-НТ, на відміну від ефекту ПТГ, не так драматично залежить від часу перфузії клітини, то виникла можливість розділити ці два ефекти. З цієї метою після перфузії педального нейрону (30 хв.) на його сому аплікували $10 \mu M$ 5-НТ, що приводило до росту I_{Ca} (Мал. 8, А, перша пара кривих); після відмивання 5-НТ амплітуда струму поверталась в попередній стан. Потім у зовнішньоклітинний розчин був добавлений ПТГ або rPTH(1-34). В цьому випадку суттєвої зміни амплітуди струму тієї ж клітини не відбувалося на протязі 10-15 хв. (Мал. 8, А, друга пара кривих). Після чого 5-НТ знову був аплікований на ту ж клітину, при цьому ефект 5-НТ проявлявся в такій же мірі, як і перше (Мал. 8, А, третя пара кривих). Це ясно свідчило про незалежну реалізацію дії ПТГ від cAMP-залежних механізмів. При перфузії клітин розчином вміщующим $60 \mu M$ cGMP і $100 \mu M$ IBMX росту струму не спостерігалось.

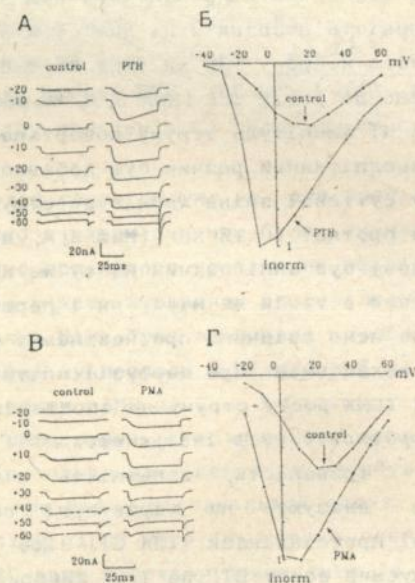
4.7. *Форболовий ефір імітує ефект ПТГ.* Риси описаного гормонального ефекту - тривалість, залежність від АТФ і внутрішньоклітинного кальцію - вказують на характерні ознаки участі Ca^{2+} -фосфоліпід-залежної протеїнкінази (ПК-С). Щоб встановити залучення ПК-С в досліджуєний ефект ПТГ на I_{Ca} , використовувався структурний аналог діацилгліцеролу (активатора ПК-С) - форболовий ефір (РМА). Агент був добавлений у зовнішньоклітинний розчин в концентраціях $0.1-10 \mu M$. Було досліджено 12 клітин; 9 клітин відповідали повільно розвиваючимся збільшенням амплітуди кальцієвого струму в 1.5-2-рази, у 2-ух інших проявлявся чіткий стабілізующий ефект, і в 1 випадку сти-

мулюючий ефект не спостерігався. Стимулюючий ефект РМА мав схожу кінетику з ефектом ПТГ: він розвивався повільно на протязі 40-60 хвилин після аплікації сполуки і був незворотнім. Як і у випадку з гормоном, індуковане РМА збільшення амплітуди I_{Ca} спостерігалось у широкому діапазоні мембранного потенціалу (Мал. 8). Дія ПТГ і РМА не була адитивною ($n=8$). Неактивний аналог РМА - 4 α -форболовий ефір - навіть у 10^3 -рази більш вищих концентраціях не чинив ефекту на I_{Ca} .

4.8. *Інгібітори протеїнкіназ блокують ефект ПТГ*. Після додавання блокатора протеїнкіназ Н-7 ($100\mu\text{M}$) у зовнішньоклітинний розчин амплітуда I_{Ca} , не дивлячись на присутність 10^{-10}M ПТГ, різко зменшувалась, досягаючи значення, близького початковому (до аплікації гормону); ступінь блокування складала $84\pm 7\%$, ($n=6$). Після цього амплітуда струму стабілізувалася. Нами було протестовано також дію друго-

Мал. 9. Потенціалозалежність ефектів ПТГ і форболового ефіру (РМА) на амплітуду I_{Ca} . А, В - Криві I_{Ca} , викликані деполяризацією мембрани до різних тест потенціалів (вказаних біля кривих) від підтримуючого потенціалу -50mV у двох різних клітинах. Криві були виміряні після аплікації 1nM ПТГ (А) і $10\mu\text{M}$ РМА (В) 75 і 89 хв. після аплікації. Б, Г - ВАХ для I_{Ca} , відповідаючі вимірам у А і В. В обох випадках ТЕАВr був замінений на ТЕАС1 у зовнішньоклітинному розчині. Внутрішньоклітинний розчин містив 2mM АТР у відсутності EGTA.

го блокатора РК-С - ставроспорину. В силу особливості його дії, затосовувалась інкубація клітин у розчині, що містив ставроспорин, і значно більші концентрації цієї сполуки по відношенню до використовуваних в умовах *in vitro*. Застосована процедура була досить простою; клітини із одного й того ж препарату були розділені на дві частини, одна із яких була контрольною; в розчин, містячий другу, був добавлений $30-100\mu\text{M}$ ставроспорин. Після цього обидві партії клітин знаходились в однакових умовах на протязі 1-3 годин при температурі



22°C в розчині Рінтгера. Дія ПТГ на контрольні клітини розвивалась як звичайно. Інший характер розвитку ефекту ПТГ спостерігався у клітин, попередньо інкубованих в 30-100µM ставроспорину. В цьому випадку, не дивлячись на присутність у зовнішньоклітинному розчині 10^{-9} M ПТГ, після деякого початкового зростання піку I_{Ca} спостерігалось його різке зменшення. Так, вже після 30 хв. перфузії клітини, амплітуда I_{Ca} зменшувалась на $52 \pm 5\%$ ($n=5$) по відношенню до її максимальної величини.

В И С Н О В К И

Проведені експериментальні дослідження мембранних і внутрішньоклітинних механізмів модуляції кальцієвої провідності мембрани нервових клітин дозволяють зробити наступні висновки:

1. Кальцієва провідність мембрани у різних нейронів молюску *Helix pomatia* неоднаково чутлива до дії серотоніну. Виявлені три групи нейронів: а) нечутливі до дії серотоніну; б) реагуючі на серотонін збільшенням кальцієвого струму в) реагуючі на серотонін пригніченням кальцієвої провідності мембрани.

2. Встановлено, що серотонін-індуковане збільшення кальцієвого струму опосередковано цАМФ-залежною фосфорилуючою системою вторинних посередників, а 5-НТ індуковане пригнічення I_{Ca} не залежить від внутрішньоклітинних процесів.

3. На основі порівняльних досліджень впливу серотоніну і вторинного посередника цАМФ на кальцієву провідність мембрани різних нейронів встановлено, що участь цАМФ-залежної системи фосфорилування в потенціалі кальцієвої провідності мембрани не являється універсальною властивістю всіх нейронів мозку молюска. Нейрони, володіючи цАМФ-залежною позитивною модуляцією кальцієвих каналів, локалізовані головним чином у педальних гангліях молюска. Наявність цАМФ-залежної позитивної модуляції кальцієвих каналів корелює з присутністю у нейронів серотонінових рецепторів, фармакологічні характеристики яких подібні 5-НТі серотоніновим рецепторам ссавців.

4. Внутрішньоклітинні іони Ca^{2+} блокують сАМР опосередковане збільшення кальцієвої провідності мембрани. Це блокування має біфазну природу, що обумовлено активацією двох Ca^{2+} -залежних ферментів - фосфодіестерази і кальцинеїрину - відрізняючихся K_d (0.01 і 1 µM відповідно). Ці ферменти викликають зменшення фосфорилування каналоформуючої молекули. Вклад цих ферментів в сумарне блокування складає 40 і 60% відповідно. Показано, що цей процес лежить в основі десен-

ситизації 5-HT₁-подібних серотонінових рецепторів до дії агоністу.

5. Встановлено, що паратиреоїдний гормон викликає значне, стійке і повільно розвивається збільшення кальцієвої провідності мембрани. Це збільшення опосередковане активацією Ca²⁺/фосфоліпід-залежної протеїнкінази.

6. Величина струму, створеного потенціалокерованими кальцієвими каналами, може модулюватись антагоністами кальмодуліну. Створена модель взаємодії антагоністів кальмодуліну з кальцієвим каналом, яка базується на припущенні про зміну антагоністами кальмодуліну спорідненості зв'язування проникаючого через канал катіону з молекулою каналу.

7. Показано, що інактивація кальцієвого струму мембрани, в додаток до Ca-залежного і потенціалозалежного компонентам, може бути індукована застосуванням фармакологічних сполук, що чинять повільнорозвиваючися потенціалозалежну блокуючу дію на кальцієві канали.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дорошенко П.А., Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Действие форсколина на кальциевый ток в мембране нервных клеток моллюска // *Нейрофизиология*. 1988, Т.20, №1, С.134-136.
2. Дорошенко П.А., Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Взаимодействие антагонистов кальмодулина с кальциевыми каналами // *Биол. мембраны*. 1988, Т.5, №7, С.688-697.
3. Костюк П.Г., Вислобоков А.И., Дорошенко П.А., Лукьянец Е.А. Манцев В.В. Действие 3,5-диамино-1-тиа-2,4-диазола на электровозбудимую мембрану нервных клеток моллюсков // *Биол. Мембраны* 1988, Т.5, №12, С.1297-1303
4. Лукьянец Е.А. Дорошенко П.А. Действие форсколина на трансмембранные токи в нервных клетках виноградной улитки // II Всесоюз. конф. по нейронаукам: Тез. докл., Киев, 1988, С.46-48.
5. Doroshenko P.A., Kostyuk P.G., Luk'yanetz E.A. Modulation of calcium current by calmodulin antagonists. *Neuroscience*, 1988, V. 27(3), p. 1073-1080.
6. Дорошенко П.А., Лукьянец Е.А. Изменение связывания катионов в кальциевом канале антагонистами кальмодулина // II Всесоюз. конф. по нейронаукам: Тез. докл., Киев, 1988, С.27-28.
7. Дорошенко П.А., Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Роль вторичных посредников в модуляции кальциевой проводимости нервной клетки серотонином // Сб. «Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки»: Тез. Всесоюзн. конф., Суздаль, 1989, С.58
8. Лукьянец Е.А. Стимулирующее влияние серотонина на кальциевые каналы мембраны нервных клеток виноградной улитки // *Физиологический журнал* 1989, Т.35, №5, С.113-114.
9. Дорошенко П.А., Лукьянец Е.А. Селективный блокатор водородного тока // *Биол. мембраны*, 1989, Т.6, №6, С.642-646.
10. Дорошенко П.А., Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Блокирование кальциевых каналов ментолом // *Биол. мембраны*, 1989, Т.6, №1, С.42-50.
11. Kostyuk P.G. Lukjanetz E.A. Shcherbatko A.D. Osipenko O.N. Modulation of Ca-Channel activity by transmitters and hormones.

German-Soviet Symposium "Membrane Physiology", Heidelberg, 1989, P.5.

12. Дорошенко П.А., Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Идентификация серотониновых рецепторов, участвующих в опосредуемой цАМФ стимуляции кальциевой проводимости мембраны нейронов виноградной улитки // III Всесоюз. конф. по нейронаукам: Тез. докл., Киев, 1990, С.16-17.
13. Лукьянец Е.А. Исследование механизмов ослабления ионами кальция серотонининдуцируемого увеличения кальциевого тока // III Всесоюз. конф. по нейронаукам: Тез. докл., Киев, 1990, С.30-31.14.
14. Лукьянец Е.А., Дорошенко П.А. Допаминовые рецепторы принимают участие в регуляции кальциевой проводимости нейронов виноградной улитки // III Всесоюз. конф. по нейронаукам: Тез. докл., Киев, 1990, С.31.
15. Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Тер-Маркосян А.С., Худавердян Д.Н. Стимуляция паратиреоидным гормоном кальциевой проводимости нервных клеток // Нейрофизиология, 1990, Т.22, N3, С.373-380.
16. Костюк П.Г., Лукьянец Е.А. Дорошенко П.А. Влияние цАМФ на кальциевые токи нейронов моллюсков, обладающих различной чувствительностью их кальциевой проводимости к действию серотонина // Нейрофизиология, 1990, Т.22, N5, С.605-612.
17. Doroshenko P.A., Lukyanetz E.A. Involvement of protein kinases A and C in modulation of calcium channels in snail neurones. 64 Fyziologicke Dni, Bratislava, 6-8 februara, 1990, P.16.
18. Doroshenko P.A., Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A. Evidence that parathyroid hormone stimulates calcium current in snail neurones via protein kinase C. Second Soviet-Spanish symposium on physicalchemical biology, Biological membranes: Structure and function., Kiev, october 1-7, 1990, P.10
19. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. cAMP-mediated modulation of calcium channels in snail neurones. 2nd Japan-USSR Cooperative Symposium on receptors structure and function. May-June 1, 1991, Shigakukaikan, Kyoto, Japan, P.8.
20. Лукьянец Е.А. Исследование влияния внутриклеточного кальция на увеличение кальциевого тока, опосредованное цАМФ // Нейрофизиология, 1991, Т.23, N3, С.228-234
21. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. Effects of serotonin and cAMP on calcium current in different neurones of *Helix pomatia* // Pflügers Arch., 1992, v.420, P.9-15.
22. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Ter-Markosyan A.S. Parathyroid hormone enhances calcium current in snail neurones. Simulation of the effect by phorbol ester // Pflügers Arch., 1992 v.420, P.146-152.
23. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A. Second messenger interaction in modulation of calcium channels in snail neurones. // 8th International conference on second messengers & phosphoproteins. August 3rd-8th, 1992, Glasgow, Scotland, P.24.
24. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A. Mechanisms of antagonistic action of internal Ca^{2+} on serotonin-induced potentiation of calcium currents in *Helix* neurones // Pflügers Arch., 1993, in press.

470655

48 26 965
АВ 26.965

Б0 22749. Формат 60x84/16. Бумага тип. 04с. печать. Усл. печ. л. 2, 32.
Усл. кр. - отт. 2, 32. Уд. - изд. л. 1, 95. Тираж 105экз. Заказ 1. Бесплатно.

Отпечатано в Институте физиологии им. А. А. Богомольца АН Украины.
252601 Киев-24, ул. Богомольца 4.