

На правах рукопису

УСАЧОВ Юрій Михайлович

МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ  
КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В НЕЙРОНАХ  
СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ КУРЧАТИ ТА ЩУРА

Спеціальність: 03.00.02 — Біофізика

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

AB 28.335

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України.

Наукові керівники: академік П. Г. Костюк,  
д. б. н. С. Л. Міронов,

Офіційні опоненти: д. б. н. В. Л. Зима,  
д. б. н. М. К. Малишева.

Ведуча установа: Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна АН України.

Захист відбудеться 17 листопада 1993 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01 при інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України (м. Київ, вул. Богомольця, 4).

Автореферат розісланий 18 листопада 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
доктор біологічних наук

З. О. Сорокіна-Маріна

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00813986 (Z)

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

Актуальність проблеми. Внутрішньоклітинний кальцій вважається одним з найбільш універсальних регуляторів клітинних процесів. В нервових клітинах, зокрема, іони кальцію беруть участь в процесі вивільнення медіатора, в регуляції електричного збудження, в регуляції синаптичної пластичності, в процесах росту та диференціювання нервової клітини і т.д. Дія іонів кальцію передається різними кальційзалежними ферментами, активність яких регулюється внутрішньоклітинною концентрацією іонів кальцію. Тому вивчення механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації вільного кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в нервових клітинах являє собою важливу наукову проблему. В регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  можуть брати участь такі системи клітини: кальцеві канали плазматичної мембрани, кальцевий насос та  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінник плазматичної мембрани, кальційтранспортуючі системи ендоплазматичного ретикулу та мітохондрій. Особливості функціонування та відносний внесок кожної з цих систем залежать від типу клітини. Для сенсорних нейронів ці питання залишаються відкритими. Усе це і визначило мету роботи.

Мета роботи полягала в дослідженні процесів регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  в ізольованих нейронах спінальних гангліїв теплокровних та систем клітини, що відповідають за ці процеси.

Головні задачі:

1. Розробити методику, що дозволяє одночасно вимірювати  $[Ca^{2+}]_i$  і здійснювати електрофізіологічний контроль в нервових клітинах.
2. Дослідити особливості регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  в різних частинах нервової клітини під час електричної стимуляції клітини.
3. Ідентифікувати та вивчити системи клітини, що відповідають за регуляцію  $[Ca^{2+}]_i$  в різних умовах.
4. З'ясувати роль внутрішньоклітинних Ca депо у кальцевому гомеостазі нервової клітини.

Наукова новизна:

1. Вперше показана різниця в швидкості регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  в сомі та відростках нейронів спінальних гангліїв.
2. Визначена швидкість дифузії  $Ca^{2+}$  в цих клітинах.
3. Показано, що з усіх іонів  $Ca^{2+}$ , котрі увійшли в клітину під час електричної стимуляції, лише приблизно 1% іонів залишається у нез'язаному стані.

4. Ідентифіковані системи нейронів спінальних гангліїв, що беруть участь в регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  (потенціалкеровані Са канали плазматичної мембрани,  $Ca^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани, Са-транспортуючі системи мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму). Визначено відносний внесок цих систем до процесів регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  за різних зовнішньо- та внутрішньоклітинних умов.

5. Подано докладний опис механізму вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних кофеїнчутливих Са депо.

6. Детально вивчена фармакологія процесу вивільнення  $Ca^{2+}$  з кофеїнчутливих Са депо. Зокрема, вперше на нервових клітинах показано, що іони  $Ba^{2+}$  блокують розвиток цього процесу, і що тапсігаргін викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  з кофеїнчутливих Са депо.

Практична цінність даної роботи полягає у виявленні різних способів впливу на Са-залежні процеси в нейронах спінальних гангліїв теплокровних.

Апробація роботи. Основні положення роботи були викладені в доповіді на семінарі Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН України (1993 р.), засіданні Вченої ради Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН України (1993 р.).

Об'єм та структура дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, результатів досліджень, обговорювання, висновків та списку літератури. Робота викладена на 157 сторінках машинописного тексту та ілюстрована 28 малюнками. Список літератури нараховує 235 джерел.

По матеріалах дисертації опубліковано 7 робіт.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури зроблено аналіз сучасних даних щодо систем клітини, котрі беруть участь в регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$ : кальцевих каналів плазматичної мембрани, кальцевого насосу та  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінника плазматичної мембрани, кальційв'язуючих білків, кальційтранспортуючих систем мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму. В цьому розділі розглянуто також експериментальні методики, що використовуються для вимірювань внутрішньоклітинної концентрації вільного кальцію.

## МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Експерименти виконувались в основному на первинній культурі нейронів спінальних гангліїв (DRG нейронах) курчати та щура. Клітини

готувались у відповідності з методикою для вирощування DRG нейронів в первинній культурі (Barde et al., 1980; Kirischuk et al., 1992). Клітини використовувались на 2 - 5 день після перебування в культурі. Деякі експерименти були проведені на свіжоізольованих неідентифікованих нейронах виноградного равлика, які готувались згідно з методикою, що традиційно використовується в нашій лабораторії (Костюк, 1986).

Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  базувалося на спектральних властивостях флуоресцентних кальційчутливих зондів фура-2 і індо-1 (Grynkiewicz, 1985). Для завантаження зондів клітини витримувались при кімнатній температурі на протязі 30 хвилин в розчині Хенкса, який містив 5 мкМ фура-2 /AM чи 10 мкМ індо-1/AM (Molecular Probes чи Calbiochem), а також 0,02 % детергента плуроніка Ф-127 (Molecular Probes). Після закінчення фарбування клітини відмивались нормальним розчином Хенкса на протязі 30 - 60 хвилин. Кінцева концентрація барвника в клітині складала приблизно 50 мкМ.

Експерименти проводились на двох експериментальних установках, побудованих на базі інвертованих флуоресцентних мікроскопів Axiovert 35 (Zeiss) і Люмам Р-1 (ЛОМО). Обидві установки було змонтовано згідно з загальними принципами роботи з флуоресцентними кальційчутливими зондами. Флуоресценція збуджувалась за допомогою ртутної чи ксенонової лампи. Розділення потоків збуджуючого світла та флуоресценції здійснювалось дихроїчною пластинкою. Флуоресценція зонда фура-2 збуджувалась по чергово на довжинах хвиль 340 та 380 нм чи 360 та 380 нм, а реєструвалась в широкому діапазоні 480 - 650 нм. Для селективного збудження чи реєстрації флуоресценції використовувались комбінації інтерференційних та відтинаючих фільтрів. Вимірювання флуоресцентного сигналу здійснювалось за допомогою фотопомножувача чи CCD (charge couple device) камери (Photometrics Series 200). Якщо фотопомножувач дозволяв аналізувати лише середнє значення  $[Ca^{2+}]_i$ , то CCD камера давала можливість вивчати просторовий розподіл  $[Ca^{2+}]_i$  в клітині з точністю до 1 мкм. Флуоресценція зонда індо-1 збуджувалась на довжині хвилі 365 нм, а реєструвалась одночасно на двох довжинах хвиль 400 та 500 нм за допомогою двох фотопомножувачів.

Перерахунок флуоресцентного сигналу в  $[Ca^{2+}]_i$  здійснювався згідно з методом, запропонованим Грінкевічем та співавт. (Grynkiewicz et al., 1985). Розрахунки  $[Ca^{2+}]_i$  виконувались на персональній ЕОМ типу IBM AT або типу Commodore.

Для електрофізіологічної реєстрації одночасно з реєстрацією  $[Ca^{2+}]_i$  були використані метод перфорованого петчу (Horn and Marty, 1988) та метод

петч-клемпу в умовах цілої клітини (Hamill et al., 1981). Для реєстрацій застосовувався петч-клемп підсилювач EPC-7 (List Electronics). Електрофізіологічні вимірювання на нейронах виноградного равлика виконувались за допомогою мікроелектродної техніки, як це описано у працях Костюка та співавт. (Костюк та інш., 1988; Kostyuk et al., 1989).

Усі зовнішньоклітинні розчини для роботи на DRG нейронах готувались на основі розчину Хенка такого складу (мМ): HEPES, 20 (pH=7,45, NaOH); NaCl, 140; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>, 0,4; MgCl<sub>2</sub>, 0,5; KCl, 5; Glucose, 5,6. Зовнішньоклітинні розчини для роботи на нейронах виноградного равлика готувались на основі розчину Рінгера такого складу (мМ): Tris-HCl, 20 (pH=7,4); NaCl, 100; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 10; MgCl<sub>2</sub>, 5. Швидка локальна зміна зовнішньоклітинного розчину здійснювалась за допомогою багатоканальної піпетки з діаметром кінчика близько 400 мкм, розміщеної на відстані 50 - 100 мкм від клітини. Розчини для заповнення кінчика петч-піпетки готувались на базі розчину такого складу (мМ): HEPES, 10 (pH=7,4, KOH); KCl, 135; MgCl<sub>2</sub>, 3; MgATP, 3; EGTA, 0,1. Всі експерименти проводились при кімнатній температурі.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Вивчення входу Ca<sup>2+</sup> в нервову клітину через електрокеровані кальцієві канали.

В умовах фіксації мембранного потенціалу окремих деполіризуючий поштовх протягом 300 мс до 0 мВ від мембранного потенціалу, що підтримувався на рівні -60 мВ, приводив до значного збільшення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в DRG нейронах курчати від рівня  $106 \pm 29$  нМ (n=20) для клітини, що перебуває у спокої, до рівня  $505 \pm 202$  нМ (n=20) (Мал. 1). Збільшення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> у відповідь на деполіризуюче зміщення мембранного потенціалу не спостерігалось, якщо у зовнішньоклітинному розчині був відсутній Ca<sup>2+</sup> або знаходились CdCl<sub>2</sub> чи LaCl<sub>3</sub> в концентрації 100 мкМ - неорганічні блокатори потенціалкерованих Ca каналів (Костюк та інш., 1988; Tsien et al., 1988). Збільшення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> починалось у ділянці клітини, що прилягає до плазматичної мембрани, а потім розповсюджувалося в радіальному напрямі від мембрани до центру клітини (Мал. 1). Виходячи з припущення про те, що радіальний напрям зростання [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> обумовлюється головним чином дифузійним процесом, було оцінено значення коефіцієнта дифузії -  $(7,5 \pm 3,9) \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с (n=3). Це значення узгоджується з даними Хернандеца-Круза та

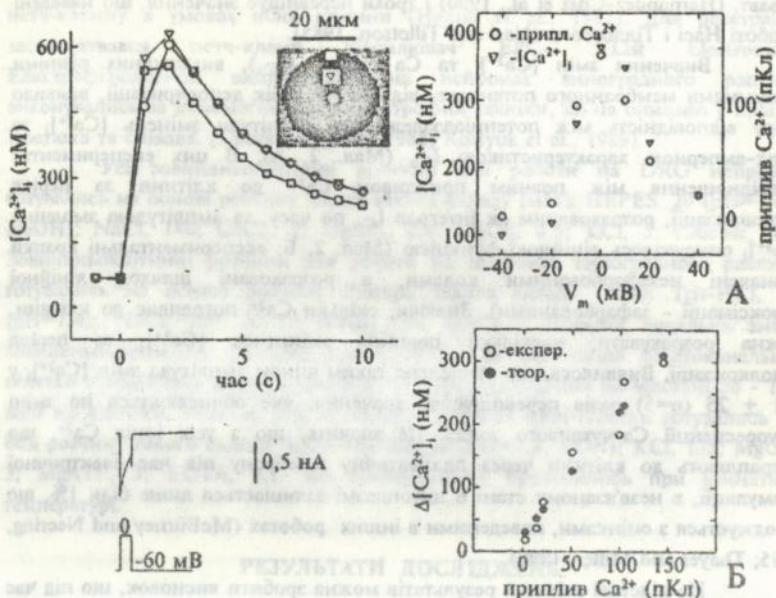
слівавт. (Hernandez-Cruz et al., 1990) і трохи перевищує значення, що наведені в роботі Насі і Тіллотсона (Nasi and Tillotson, 1985).

Вивчення змін  $[Ca^{2+}]_i$  та Ca струму ( $I_{Ca}$ ), викликаних різними зміщеннями мембранного потенціалу від -60 мВ в бік деполіризації, виявило добру відповідність між потенціалзалежною амплітудою змінень  $[Ca^{2+}]_i$  та вольт-амперною характеристикою  $I_{Ca}$  (Мал. 2, А). В цих експериментах співвідношення між повним припливом  $Ca^{2+}$  до клітини за період деполіризації, розрахованим як інтеграл  $I_{Ca}$  по часу, та амплітудою змінень  $[Ca^{2+}]_i$  описувалось лінійною функцією (Мал. 2, Б; експериментальні крапки позначені незафарбованими колами, а розраховані шляхом лінійної апроксимації - зафарбованими). Знаючи, скільки  $Ca^{2+}$  потрапляє до клітини, можна розрахувати, наскільки повинна змінитися  $[Ca^{2+}]_i$  за період деполіризації. Виявилось, що обчислена таким чином амплітуда змін  $[Ca^{2+}]_i$  у  $101 \pm 25$  ( $n=5$ ) разів перевищує те значення, яке обчислюється по зміні флуоресценції Ca-чутливого зонда. Це значить, що з усіх іонів  $Ca^{2+}$ , що потрапляють до клітини через плазматичну мембрану під час електричної стимуляції, в незв'язаному стані в цитоплазмі залишається лише біля 1%, що узгоджується з оцінками, наведеними в інших роботах (McBurney and Neering, 1985; Thayer and Miller, 1990).

На підставі усіх цих результатів можна зробити висновок, що під час короткої деполіризації в умовах нормального зовнішньоклітинного розчину збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  відбувається головним чином за рахунок роботи електростимульованих Ca каналів.

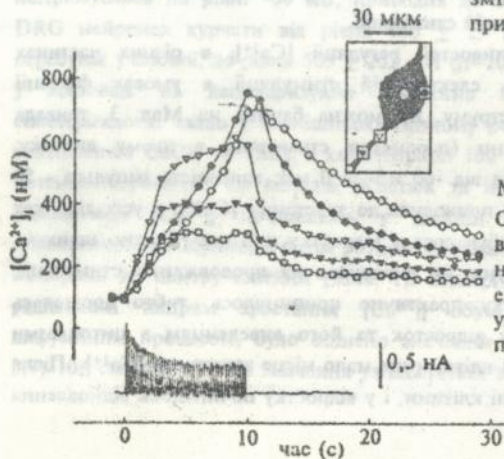
#### Особливості змінень $[Ca^{2+}]_i$ в різних частинах нейрона при електричній стимуляції.

Для вивчення особливостей регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  в різних частинах нейрона клітина піддавалась електричній стимуляції в умовах фіксації мембранного потенціалу чи струму. Як можна бачити на Мал. 3, тривала електрична стимуляція клітини (параметри стимуляції в цьому випадку: зміщення потенціалу мембрани від -60 мВ до 0 мВ; тривалість імпульса - 50 мс; частота стимуляції - 5 Гц) приводила до зростання  $[Ca^{2+}]_i$  в усіх ділянках нейрона, але це зростання відбувалось у відростку клітини помітно швидше, ніж у сомі. Через кілька секунд, не дивлячись на продовження стимуляції, збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  у відростку практично припинялось, тобто досягалась рівновага між входом  $Ca^{2+}$  у відросток та його виведенням з цитоплазми відростку. В цей же час у сомі клітини ще мало місце зростання  $[Ca^{2+}]_i$ . Після виключення стимуляції і у сомі клітини, і у відростку починалось відновлення



Мал.1. Одночасна реєстрація  $[Ca^{2+}]_i$  в трьох точках, позначених на схемі клітини, та транс-мембранного струму.

Мал.2. Графіки залежності максимального значення середньої  $[Ca^{2+}]_i$  і величини припливу  $Ca^{2+}$  до клітини від величини деполаризації мембрани (А) та амплітуди зміни  $[Ca^{2+}]_i$  від величини приплива  $Ca^{2+}$  до клітини (Б).



Мал.3. Одночасна реєстрація  $[Ca^{2+}]_i$  в п'яти точках, позначених на схемі клітини, під час електричної стимуляції в умовах фіксації мембранного потенціалу.

$[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня. Різниця у кінетиці змін  $[Ca^{2+}]_i$  у сомі та відростку нейрона, яка спостерігається під час електричної стимуляції клітини (Мал. 3), певно, може бути обумовлена більшою ефективністю  $Ca^{2+}$  буферних систем у відростку, ніж у сомі. Дійсно, відновлення  $[Ca^{2+}]_i$  в сомі після виключення стимуляції відбувалось відносно повільно і добре описувалось однією експонентою з постійною часу  $12,3 \pm 3,7$  с ( $n=8$ ) для центральної частини сомі та  $10,5 \pm 2,2$  с ( $n=8$ ) для примембранної ділянки сомі. Для відростка поряд з повільним компонентом процесу релаксації  $[Ca^{2+}]_i$  (постійна часу дорівнює  $16,8 \pm 3,5$  с;  $n=8$ ) з'являвся швидкий (постійна часу дорівнює  $1,1 \pm 0,6$  с;  $n=8$ ), відображаючий наявність у відростку окрім систем, характерних і для сомі, більш швидкого  $Ca^{2+}$ -зв'язуючого механізму.

Варіювання параметрів стимуляції (тривалість імпульса від 10 до 50 мс; частоти стимуляції від 5 до 50 Гц) або умов стимуляції (фіксація мембранного потенціалу чи струму) не справило принципового впливу на описані вище ефекти.

Таким чином, на підставі поданих в цьому розділі результатів можна дійти висновку, що процеси регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  відбуваються швидше у відростках нейронів спінальних гангліїв, ніж у сомі.

У попередньому розділі було показано, що при електричній стимуляції збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  в нейроні відбувається головним чином завдяки роботі потенціалкерованих  $Ca$  каналів. Тому і розподіл  $Ca^{2+}$  відповіді у різних частинах клітини повинен залежати від розподілу  $Ca$  провідності плазматичної мембрани. Для більшості вивчених систем був виявлений нерівномірний розподіл потенціалкерованих  $Ca$  каналів в мембрані нервових клітин (див. огляди Llinas, 1988; Sher et al., 1991). Вивчення просторового розподілу  $[Ca^{2+}]_i$  в DRG нейронах у відповідь на електричну стимуляцію також свідчить на користь такої нерівномірності. З Мал. 3, наприклад, випливає, що і в сомі, і у відростку DRG нейрона є потенціалзалежні  $Ca$  канали. Але, якщо для сомі не виявлялись помітні неоднорідності, то для відростків більшості клітин спостерігалось зменшення входу  $Ca^{2+}$  при віддаленні від сомі (Мал. 3). У деяких випадках (3 клітини з 14) зростання  $[Ca^{2+}]_i$  було локалізовано в окремих частинах відростку незалежно від відстані до тіла нейрона.

#### Роль $Na^+/Ca^{2+}$ обмінника в регуляції $[Ca^{2+}]_i$ .

Однією з систем нервової клітини, яка може приймати участь у поверненні  $[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня після періоду активності нейрона, є  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінник плазматичної мембрани (Костюк, 1986; Blaustein, 1988; Miller, 1991). Якщо вилучити з зовнішньоклітинного середовища іони  $Na^+$ , ця

система починає працювати у протилежному напрямі, забезпечуючи вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину та виведення  $\text{Na}^+$  назовні (Lagnado and McNaughton, 1990). Ця властивість її використовувалась для вивчення ролі  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обміну в регуляції  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Експерименти проводились на інтактних нейронах спінальних гангліїв щура. Поміщення клітини в розчин, в якому весь  $\text{NaCl}$  було замінено на еквівалентну кількість  $\text{N-methyl-d-glucamineCl}$ , викликало збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  від  $80 \pm 16 \text{ nM}$  у контролі до  $151 \pm 28 \text{ nM}$  ( $n=5$ ). Після відмивання безнатрієвого розчину  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  поверталась до рівня, який відповідає перебуваючій у спокою в нормальних умовах клітині. Ці результати доводять наявність  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінника в DRG нейронах, який може працювати в безнатрієвому розчині у зворотньому напрямі. Але ж не було виявлено статистично достовірної різниці ( $n=5$ ) між умовами безнатрієвого та контрольного розчину в швидкості відновлення базального рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  після її підвищення, викликаного короткочасною аплікацією гіперкалієвого розчину ( $40 \text{ mM KCl}$ ). Тобто, в фізіологічних умовах  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінник не відіграє істотної ролі в регуляції  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в DRG нейронах.

#### Роль $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани в регуляції $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Ще однією системою плазматичної мембрани, яка здатна транспортувати  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини назовні, є  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза (або  $\text{Ca}$  насос) (Carafoli, 1991; Wang et al., 1992). Відомо, що іони  $\text{La}^{3+}$  блокують роботу цієї системи (Kwan et al., 1990; Carafoli, 1991). Тому  $\text{La}^{3+}$  використовувався для вивчення ролі  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази в регуляції  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в DRG нейронах. Через те, що  $\text{La}^{3+}$  являє собою також блокатор  $\text{Ca}$  електрокерованих каналів мембрани, він додавався до зовнішньоклітинного розчину лише після закінчення стимуляції клітини за допомогою гіперкалієвого розчину. Аплікація в таких умовах  $\text{LaCl}_3$  в концентрації  $3 \text{ mM}$  приводила до помітного зменшення швидкості відновлення базального рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; постійна часу експоненти, що описує процес відновлення, збільшувалась з  $11,2 \pm 3,7 \text{ s}$  в контрольних умовах до  $34,5 \pm 9,4 \text{ s}$  ( $n=6$ ) в присутності лантана. З цього випливає, що  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани відіграє важливу роль в регуляції  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейронах спінальних гангліїв.

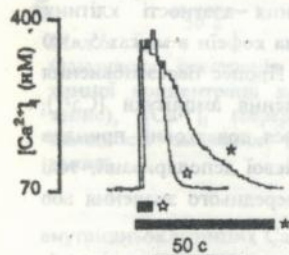
#### Участь $\text{Ca}$ транспортних систем мітохондрій в $\text{Ca}$ гомеостазі.

Електрохімічний протонний градієнт на внутрішній мембрані мітохондрій може забезпечувати транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми у мітохондріальний матрикс проти градієнта концентрації (Ленінджер, 1974; Костюк, 1986). Отже мітохондрії можуть брати участь в регуляції  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Для

того, щоб це перевірити, вивчався вплив сильного роз'єднувача окислювального фосфорилування карбоніл ціанід р-трифлуоретоксифенілгідрозона (FCCP) (Duchen, 1990) на процеси регуляції  $[Ca^{2+}]_i$ . Додавання до зовнішньоклітинного розчину FCCP в концентрації 3 мкМ викликало повільне зростання  $[Ca^{2+}]_i$  від рівня  $78 \pm 15$  нМ в контролі до  $156 \pm 25$  нМ ( $n=7$ ). Це відбувалось, мабуть, через те, що транспорт  $Ca^{2+}$  в мітохондрії зупинявся, в той час як інша система мітохондрій, транспортує  $Ca^{2+}$  в протилежному напрямі в обмін на  $Na^+$  -  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінник мітохондрій (Miller, 1991), продовжувала виводити  $Ca^{2+}$  в цитоплазму по градієнту концентрації. Отруєння мітохондрій FCCP також в деякій мірі впливало на процес відновлення  $[Ca^{2+}]_i$  після її збільшення за допомогою гіперкалієвої деполіризації: постійна часу експоненти, що описує цей процес, зростала з  $8,8 \pm 2,7$  с в контролі до  $12,0 \pm 2,4$  с ( $n=4$ ), тобто у присутності FCCP релаксація  $[Ca^{2+}]_i$  відбувалась трохи повільніше.

#### Вивільнення $Ca^{2+}$ з внутрішньоклітинних кофеїнчутливих Са депо.

Мембрана ендоплазматичного ретикулу, так само, як і поверхнева мембрана клітини, має  $Ca^{2+}$ -АТФазу (Са насос), яка здатна транспортувати  $Ca^{2+}$  з цитоплазми в ретикулум проти градієнта концентрації і, отже, зменшувати  $[Ca^{2+}]_i$  (Martonosi, 1984; Костюк, 1986; Blaustein, 1988). З іншого боку, мембрана Са депо ретикулу містить Са канали, які можуть відкриватися при певних умовах і забезпечувати вивільнення накопиченого в депо Са до цитоплазми (Tsien and Tsien, 1990; Henzi and MacDermott, 1992). Наявність цих антагоністичних механізмів забезпечує важливу роль ретикулу в регуляції  $[Ca^{2+}]_i$ .

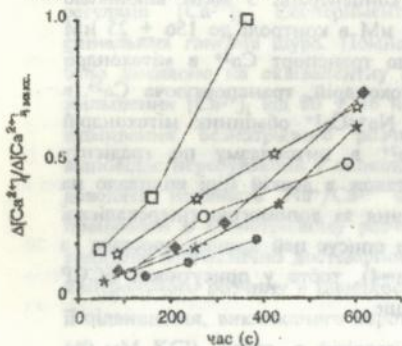


Кофеїн в мілімолярних концентраціях може викликати мобілізацію  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо в різних типах клітин (Henzi and MacDermott, 1992; Berridge, 1993). В DRG нейронах прикладання кофеїну в концентрації 10 мМ приводило до зростання  $[Ca^{2+}]_i$  від  $74 \pm 19$  нМ в спокої до  $342 \pm 97$  нМ ( $n=44$ ). Максимальне значення  $[Ca^{2+}]_i$  досягалось за  $5,4 \pm 1,1$  с ( $n=24$ ). Потім, не зважаючи на

Мал.4.

Порівняння змін середньої  $[Ca^{2+}]_i$ , що викликаються аплікацією кофеїну різної тривалості. Періоди аплікації кофеїну в концентрації 10 мМ позначені чорними прямокутниками під реєстраціями.

присутність зовні кофеїна,  $[Ca^{2+}]_i$  починала зменшуватись і поверталась до початкового рівня протягом  $87,3 \pm 33,8$  с ( $n=24$ ). Відповідь на кофеїн зберігалась і у безкальцієвому розчині, що доводить активацію кофеїном вивільнення  $Ca^{2+}$  з



Мал. 5.

Нормовані залежності для шости клітин амплітуди викликаного кофеїном  $Ca^{2+}$  відповіді від часу між двома послідовними тривалими аплікаціями кофеїну в концентрації 10 мМ. Кожній клітині відповідає певний символ на графіку.

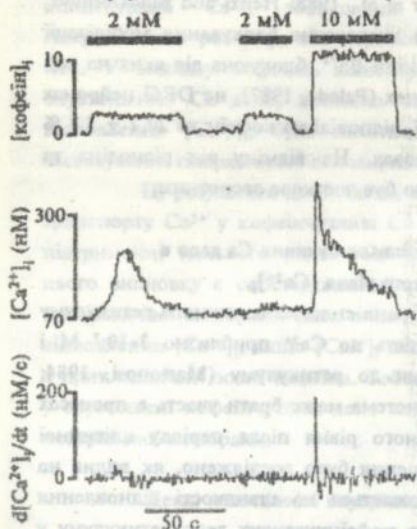
Хвилин відбувалось майже лінійно з часом (Мал. 5). Процес перезавповнення проходив досить повільно: половинний час відновлення амплітуди  $[Ca^{2+}]_i$  відповіді складав 2 - 5 хвилин. Але, якщо створювався додатковий приплив  $Ca^{2+}$  до цитоплазми, наприклад, за рахунок гіперкальцієвої деполаризації, тоді амплітуда  $[Ca^{2+}]_i$  відповіді дуже швидко досягала попереднього значення або навіть перевищувала його.

Кофеїн спроможний взаємодіяти з флуоресцентним зондом індо-1, викликаючи гасіння флуоресценції. Ефект гасіння не залежить від довжини хвилі флуоресценції і збільшується лінійно зі збільшенням концентрації кофеїна в межах 0,5 - 50 мМ (O'Neill et al., 1990). Тому, з одного боку, ефект гасіння не заважає вимірювати  $[Ca^{2+}]_i$  за допомогою двохвильового методу (Grynkiewicz et al., 1985), а, з іншого боку, дозволяє вимірювати внутрішньоклітинну концентрацію кофеїна (O'Neill et al., 1990). Остання властивість була використана для вивчення дозозалежності впливу кофеїна на  $[Ca^{2+}]_i$ . Як можна бачити з Мал. 6, прикладання зовні кофеїна приводило до

внутрішньоклітинних депо. Кофеїн викликав збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  як в сомі нейрона, так і в його відростках. При тривалій аплікації кофеїна в концентрації 10 мМ відбувалось виснаження внутрішньоклітинних Ca депо, і повторна аплікація не викликала майже ніякої реакції. При прикладанні кофеїна на короткий час спустошення було істотно меншим. Відновлення  $[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня відбувалось набагато повільніше в присутності кофеїна, ніж у випадку, коли одразу після досягнення піка  $[Ca^{2+}]_i$  кофеїн відмивався (Мал. 4).

Перезавповнення депо Ca та відновлення здатності клітини відповідати на кофеїн в межах 5 - 10

швидкого зростання концентрації кофеїна в клітині, яка потім утримувалася на постійному рівні, поки кофеїн був присутній в зовнішньоклітинному розчині. Кофеїна в концентрації 2 мМ часто було досить для того, щоб викликати вивільнення  $Ca^{2+}$  із депо. Але цей процес помітно відставав від зміни внутрішньоклітинної концентрації кофеїна і був істотно повільнішим,



Мал.6.

Одночасна реєстрація внутрішньоклітинної концентрації кофеїна (верхній запис),  $[Ca^{2+}]_i$  (середній запис) та швидкості змінення  $[Ca^{2+}]_i$  (нижній запис).

внутрішньоклітинних  $Ca^{2+}$  депо також залежить від концентрації кофеїна.

Крім кофеїна, вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних кофеїнчуйливих  $Ca$  депо викликалось також теофіліном та 3-ізобутіл-1-метилксантіном (IBMX) в мілімолярних концентраціях. Аденін та гіпоксантин - інші речовини, що мають схожу з кофеїном хімічну структуру, - в тих самих концентраціях не мали ніякої дії на  $[Ca^{2+}]_i$ .

Іншим класом речовин, які можуть викликати вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо, є специфічні блокатори  $Ca^{2+}$ -АТФази мембрани ендоплазматичного ретикулуму (Rink and Merrit, 1990; Demarex et al., 1992). До цього класу речовин належить тапсігаргін. На клітинах нейробластоми було

ниж при аплікації кофеїна в концентрації 10 мМ (Мал. 6). Максимальна швидкість зростання  $[Ca^{2+}]_i$  у відповідь на 2 мМ кофеїна складала  $35 \pm 8$  нМ/с ( $n=8$ ), тоді як у випадку 10 мМ кофеїна максимальна швидкість була  $172 \pm 23$  нМ/с ( $n=22$ ). Аналогічним чином, амплітуда змін  $[Ca^{2+}]_i$  залежала від концентрації кофеїна: для 2 мМ кофеїна амплітуда складала  $106 \pm 28$  нМ ( $n=8$ ), а для 10 мМ кофеїна -  $268 \pm 48$  нМ ( $n=44$ ). Цікаво відмітити, що хоч відповідь на кофеїн в низькій концентрації (2 мМ в цьому випадку) могла бути виснаженою, більш високі концентрації кофеїна все ще були спроможні викликати мобілізацію великої кількості  $Ca^{2+}$  з депо. Таким чином, ступінь спустошення

показано, наприклад, що талсігаргін мобілізує  $\text{Ca}^{2+}$  з тих самих депо, що й агоністи, які активують формування інозитол 1,4,5-трифосфата (Jackson et al., 1988). Виявилось, що в DRG нейронах талсігаргін в концентрації 2 мкМ може звільняти  $\text{Ca}^{2+}$  з кофеїнчутливих Са депо.

Популярні блокатори процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з кофеїнчутливих депо ріанодін та дантролен натрію (Thayer et al., 1988; Henzi and MacDermott, 1992) в концентрації 10 мкМ викликали незворотне блокування мобілізації кофеїном  $\text{Ca}^{2+}$  з Са депо DRG нейронів. Іони  $\text{Ba}^{2+}$ , блокуюча дія яких на цей процес була досліджена на м'язових клітинах (Palade, 1987), на DRG нейронах приводили до зменшення амплітуди  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  відповіді на кофеїн до  $20,7 \pm 5,7\%$  ( $n=7$ ) від амплітуди в контрольних умовах. На відміну від ріанодіна та дантролена натрію, блокуючий ефект барію був частково зворотним.

#### Участь кофеїнчутливих внутрішньоклітинних Са депо в контролюванні низького рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Як вже відзначалося вище, мембрана ендоплазматичного ретикулулу містить  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, яка має спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$  приблизно  $3 \cdot 10^{-7}$  М і здатна транспортувати  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми до ретикулулу (Martonosi, 1984; Костюк, 1986; Blaustein, 1988). Тому ця система може брати участь в процесах відновлення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до низького базального рівня після періоду клітинної активності. Для перевірки цього припущення було досліджено, як вплив на транспортні системи ретикулулу відображається на швидкості відновлення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Для того, щоб заблокувати участь кофеїнчутливих депо ретикулулу у виведенні  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми, використався, по-перше, специфічний блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази ретикулулу талсігаргін (Rink and Merritt, 1990) і, по-друге, ріанодін, який, як відомо (Fill and Coronado, 1988), при зв'язуванні з Са каналом мембрани кофеїнчутливих депо переводить його у постійно відкритий субпровідний стан і, отже, робить мембрану депо нездатною до підтримання градієнту концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Обидві ці речовини значно зменшували швидкість повернення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до базального рівня після того, як  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  підвищувалась за допомогою електричної стимуляції клітини: талсігаргін в концентрації 2 мкМ приводив до збільшення постійної часу експоненти, що описувала процес відновлення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , з  $10,3 \pm 2,2$  с ( $n=6$ ) у контролі до  $17,9 \pm 4,5$  с ( $n=6$ ), а ріанодін в концентрації 10 мкМ відповідно - з  $12,3 \pm 3,5$  с ( $n=6$ ) у контролі до  $27,6 \pm 6,7$  с ( $n=6$ ).

Ефективність зворотного захоплення  $\text{Ca}^{2+}$  кофеїнчутливими депо ретикулулу зменшується з накопиченням Са в цих депо (Martonosi, 1984; Henzi and MacDermott, 1992). Тому впливати на участь систем

ендоплазматичного ретикулуму у виведенні надлишкового Са з цитоплазми також можна, змінюючи завантаженість кофеїнчутливих депо. Ця особливість була використана ще в одній серії експериментів по перевірці ролі кофеїнчутливих Са депо в контролюванні низького рівня  $[Ca^{2+}]_i$ . В цих експериментах порівнювалась швидкість відновлення внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$ , збільшення якої досягалось або прикладанням гіперкалієвого розчину, або короткою аплікацією кофеїна в концентрації 10 мМ. У випадку кофеїна, коли зростання  $[Ca^{2+}]_i$  відбувалось за рахунок спустошення Са депо, постійна часу експоненти, яка апроксимує процес відновлення  $[Ca^{2+}]_i$ , була помітно менше ( $7,7 \pm 2,2$  с,  $n=8$ ), ніж при застосуванні гіперкалієвої деполяризації ( $11,2 \pm 3,7$  с,  $n=8$ ).

Ці результати дозволяють зробити висновок, що механізм активного транспорту  $Ca^{2+}$  у кофеїнчутливі Са депо ретикулуму відіграє важливу роль у підтриманні низького рівня  $[Ca^{2+}]_i$ . Ще одним непрямим підтвердженням цього висновку є спостереження про те, що лантан, блокатор  $Ca^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани (див. вище), мав значно менший ефект на швидкість відновлення  $[Ca^{2+}]_i$ , якщо  $[Ca^{2+}]_i$  збільшувалась не деполяризацією мембрани, а прикладанням зовні кофеїна. Тобто підвищення зворотного захоплення  $Ca^{2+}$  у спустошені кофеїнчутливі депо компенсувало виведення з ладу  $Ca^{2+}$ -АТФази поверхневої мембрани.

#### Деякі властивості внутрішньоклітинних кофеїнчутливих Са депо нервових клітин молюска *Helix pomatia*.

Для того, щоб перевірити, наскільки наведені вище властивості кофеїнчутливих Са депо є універсальними для нервових клітин, були проведені дослідження на іншому експериментальному об'єкті - свіжовиділених ізольованих неідентифікованих нейронах навколлоткового ганглію молюска *Helix pomatia*. Для цих нейронів, також як і для сенсорних нейронів теплокровних, прикладання кофеїна в мілімолярних концентраціях викликало зростання  $[Ca^{2+}]_i$ , яке потім, не зважаючи на присутність зовні кофеїна, змінювалось поверненням  $[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня. Відповідь на кофеїн майже не залежала від присутності  $Ca^{2+}$  у зовнішньому розчині, тобто кофеїн і у цих нейронах викликав вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних Са депо. Ці депо досить швидко спустошувались, і повторні відповіді на кофеїн були значно слабшими, або зовсім не спостерігались. Перезаповнення депо кальцієм відбувалось трохи швидше, ніж для DRG нейронів, і помітно прискорювалось, якщо створювався додатковий приплив  $Ca^{2+}$  до цитоплазми шляхом деполяризації плазматичної мембрани. Тобто, основні властивості

кофеїнчутливих Са депо нейронів виноградного равлика практично не відрізняються від властивостей тих же депо DRG нейронів. Таке ж саме можна сказати і про фармакологію процесу вивільнення Са<sup>2+</sup> з кофеїнчутливих депо нейронів *Helix pomatia*: теофілін та IBMX викликали мобілізацію Са<sup>2+</sup> з цих депо, а ріанодін та іони Ва<sup>2+</sup> блокували цей процес.

## ОБГОВОРЕННЯ

Спільне використання мікрофлуориметричного та електрофізіологічного підходів дозволило проаналізувати особливості регуляції [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в нейронах спінальних гангліїв курчати та щура. Результати експериментів вказують на те, що є, як мінімум, дві системи, що забезпечують приплив Са<sup>2+</sup> до цитоплазми сенсорних нейронів: 1) потенціалкеровані Са канали плазматичної мембрани, які можуть активізуватися при деполаризації мембрани; 2) внутрішньоклітинні Са депо, що здатні звільняти Са<sup>2+</sup> під впливом кофеїна та інших ксантинподібних речовин, а також й тапсігаргіна. На відміну від спостережень одних вчених (Lipscombe et al., 1988; Friel and Tsien, 1992), але у відповідності з результатами інших (Plaayer and Miller, 1990; Blumenfeld et al., 1992) для DRG нейронів у фізіологічних умовах не було виявлено помітного внеску внутрішньоклітинних Са депо у розвиток Са<sup>2+</sup> відповіді під час електричної стимуляції клітини. На користь того, що при деполаризації мембрани вхід Са<sup>2+</sup> до цитоплазми визначається в основному роботою потенціалкерованих Са каналів, свідчать такі результати: 1) зростання [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> не спотерігалось, якщо у зовнішньоклітинному розчині був відсутній Са<sup>2+</sup>, або знаходились іони Cd<sup>2+</sup> чи La<sup>3+</sup> - неорганічних блокторів Са каналів; 2) зростання [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> починалося біля поверхневої мембрани та розповсюджувалось з часом радіально від мембрани до центру соми (Мал. 1); 3) залежність амплітуди змінень середньої [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> від величини потоку Са<sup>2+</sup> до клітини добре описувалась лінійною функцією (Мал. 2).

Збільшення [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> за рахунок вивільнення Са<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо могло бути викликано кофеїном, теофіліном, 3-ізобутіл-1-метилксантіном і тапсігаргіном. Як впливає з порівняння [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> відповідей на аплікації кофеїна різної тривалості, вивільнення Са<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних Са депо відбувається на протязі усього періоду аплікації. Якщо прийняти до уваги результати спостережень на рівні поодиноких каналів саркоплазматичного ретикулулу серцевих м'язів (Sitsapesan and Williams, 1990) та ендоплазматичного ретикулулу нейронів Пуркін'є (Bezprozvanny et al., 1991), то можна вважати, що вивільнення Са<sup>2+</sup> з депо відбувається при

активації Са каналів депо, яка триває, доки в цитоплазмі є кофеїн. Але ж через спустошення Са депо і, отже, зменшення кальцієвого градієнта між депо та цитоплазмою, потік Са<sup>2+</sup> з депо повинен падати. Оскільки усе це відбувається на фоні активного зв'язування Са<sup>2+</sup> буферами клітини, то не зважаючи на постійну присутність кофеїна, фаза зростання внутрішньоклітинної концентрації Са<sup>2+</sup> змінюється на її зменшення. Швидкість зростання [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> при мобілізації Са кофеїном повинна залежати від того, яка кількість Са каналів депо одночасно відчиняється. Імовірність відчиненого стану збільшується з підвищенням концентрації кофеїна (Sitsapesan and Williams, 1990). З цієї точки зору можна пояснити, чому швидкість зростання [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> була помітно меншою при використанні низьких концентрацій кофеїна (Мал. 6). Окрім того, імовірно, що при використанні низьких концентрацій кофеїна менша кількість потенційно здатних до мобілізації Са депо залучалась у розвиток реакції: дійсно, кофеїн в концентрації 10 мМ був здатний спричинити значний ефект, в той час як концентрації кофеїна 2 мМ було вже недостатньо (Мал. 6). Імуноцитохімічні, морфологічні та біофізичні дослідження показують, що порожнища ендоплазматичного ретикулуму не є одним великим безперервним резервуаром для Са, а складається з просторово та функціонально окремих депо (Henzi and MacDermott, 1992). Тому можна припустити, що Са канали різних депо мають різну чутливість до кофеїна, наприклад, за рахунок цАМФ-залежного фосфорилування одних, що підвищує імовірність активації вивільнення Са<sup>2+</sup> (Yoshida et al., 1992), і/чи калмодулінзалежної інактивації інших (Smith et al., 1989). Тоді дії низьких концентрацій кофеїна будуть підвладні тільки сенситизовані Са депо, в той час як решта збереже свій Са вміст, який потім може бути мобілізований більш високими дозами кофеїна (Мал. 6).

Фармакологічні характеристики процесу вивільнення Са<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних кофеїнчутливих Са депо DRG нейронів повністю відповідають загальновідомим властивостям цього процесу і для інших клітин (Martonosi, 1984; Palade, 1987; Henzi and MacDermott, 1992). Вивільнення Са<sup>2+</sup>, поряд з кофеїном, викликалося іншими блокаторами фосфодіестерази - теофіліном та 3-ізобутил-1-метилксантіном (Северія та Кочетова, 1985). Тому можна припустити, що дія цих речовин опосередкована циклічним АМФ. Здатність тапсігаргіна мобілізувати Са<sup>2+</sup> з кофеїнчутливих депо пояснюється, певно, блокуючою дією цієї речовини на Са<sup>2+</sup>-АТФазу ретикулуму (Rink and Merritt, 1990; Wictome et al., 1992).

Базуючись на результатах експериментів по вивченню кофеїнчутливих Са депо отриманих на зовсім іншому порівняно з DRG нейронами

гемлокровних експериментальному об'єкті - нейронах молюска *Helix pomatia* - можна припустити, що досліджені біофізичні та фармакологічні особливості процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з цих депо є універсальними для нервових клітин.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  в DRG нейронах, що перебувають у спокої, підтримується на рівні меншому, ніж 100 нМ (див. результати). Збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клітині за рахунок входу  $\text{Ca}^{2+}$  через електрокеровані Са канали мембрани або вивільнення з внутрішньоклітинних Са депо активує різноманітні клітинні системи, які виводять  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми. Це призводить до відновлення попереднього рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Вивчаючи процеси, які відбуваються при електричній стимуляції нейрона, вдалось виявити дві стадії процесу відновлення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ : 1) швидка стадія, яка починається одночасно з початком стимуляції і триває мілісекунди або менше; 2) повільна стадія, яка триває десятки секунд. Під час швидкої стадії відбувається зв'язування близько 99% усіх іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , що утійшли до клітини (див. результати). Найбільш імовірним учасником процесу швидкого зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  під час першої стадії уявляються Са-зв'язуючі білки (Miller, 1991; Vainbridge et al., 1992).

Повільна стадія відновлення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до базального рівня добре апроксимувалась для сомі клітини однією експонентою з постійною часу близько десяти секунд. На підставі аналізу постійної часу експоненти при різних діях на клітину були досліджені системи, що забезпечують повільну стадію зв'язування цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$ . З'ясувалось, що основну роль у відновленні  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейронах спінальних гангліїв у фізіологічному діапазоні змін  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. При цьому відносний внесок Са насоса ретикулуму в цьому процесі залежить від заповнення депо ретикулуму кальцієм. Деякий вплив на швидкість повернення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до базального рівня справляють також Са транспортні системи мітохондрій.

Виявити участь  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінника плазматичної мембрани у підтриманні низького рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в сенсорних нейронах не вдалось. Ці дані відрізняються від результатів досліджень на нервових закінченнях (Baker and DiPolo, 1984; Blaustein, 1988), але узгоджуються зі спостереженнями для сомі нервової клітини (Nohmi and Kuba, 1984; Kostyuk et al., 1989; Thayer and Miller, 1990; Benham et al., 1992).

Мікрофлуорометрична техніка, яка використовувалась в дослідженнях, дозволяла порівнювати динаміку змін  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у сомі та відростках. Основні відмінності зводяться до наступного: регуляція  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у відростках відбувається швидше, ніж у сомі, тобто  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  зростає з випередженням у відростках під час електричної стимуляції та швидше спадає

до початкового рівня після закінчення стимуляції (Мал. 3). Якщо зважити на те, що як зростання, так і відновлення  $[Ca^{2+}]_i$  в значній мірі визначаються роботою систем плазматичної мембрани - електрокерованими Са каналами та  $Ca^{2+}$ -АТФазами, то стає зрозумілим, що ці процеси будуть відбуватися швидше в тих частинах нейрона, для яких вище співвідношення поверхня/об'єм. Неважко оцінити, що для відростка це співвідношення значно вище, що, мабуть, і пояснює виявлену різницю у швидкості регуляції  $[Ca^{2+}]_i$ .

## ВИСНОВКИ

1. За допомогою флуоресцентних  $Ca^{2+}$ -чутливих зондів фура-2 і індо-1 та методики петч-клемп були вивчені механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в нейронах спінальних гангліїв курчати та щура.

2. Показано, що в цих нейронах існують, як мінімум, два механізми, що забезпечують збільшення  $[Ca^{2+}]_i$ : 1) вхід  $Ca^{2+}$  через потенціалкервані Са канали плазматичної мембрани, які активуються при її деполяризації; 2) вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних Са депо, яке може викликатись кофеїном та іншими метилксантінами, а також специфічним блокатором  $Ca^{2+}$ -АТФази ретикулуму тапсігаргіном. Не було виявлено активації  $Ca^{2+}$ -залежного вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо при деполяризації плазматичної мембрани.

3. Було вивчено механізм вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних кофеїнчутливих Са депо. Цей процес має такі особливості:

- вивільнення відбувається на протязі всього часу присутності кофеїна в цитоплазмі, доки не будуть спустошені депо;
- амплітуда досягнутих при цьому змін  $[Ca^{2+}]_i$  залежить від кількості запасеного в депо Са;
- швидкість розвитку процесу вивільнення  $Ca^{2+}$  з депо та ступінь спустошення депо збільшуються з підвищенням концентрації кофеїна;
- відновлення вмісту Са депо в межах 5 - 10 хвилин відбувається майже лінійно з часом;
- додатковий приплив  $Ca^{2+}$  до цитоплазми сприяє відновленню вмісту Са депо.

4. Процес відновлення  $[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня в сомі нейрона апроксимується у більшості випадків однією експонентою з постійною часу у десятисекундному діапазоні. Цей процес контролюється, як мінімум, трьома системами клітини:  $Ca^{2+}$ -АТФазою плазматичної мембрани,  $Ca^{2+}$ -АТФазою

мембрани ендоплазматичного ретикулуму та Са транспортними системами мітохондрій. Відносний внесок Са<sup>2+</sup>-АТФази ретикулуму в цей процес збільшується після спустошення кофєїнчутливих Са депо.

5. Порівняння амплітуд змін [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в сомі, які реєструються за допомогою флуоресцентних Са<sup>2+</sup>-чутливих зондів при деполяризації плазматичної мембрани, з амплітудами, розрахованими на підставі аналізу Са струмів, виявляє поруч з тривалим, моноекспоненційним компонентом процесу відновлення [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> наявність швидкого компонента. Швидкі Са буфери, що забезпечують цей компонент, зв'язують близько 99% усіх іонів Са<sup>2+</sup>, що увійшли до клітини.

6. Просторовий аналіз динаміки [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в різних частинах нервової клітини виявив, що процеси регуляції [Са<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> відбуваються швидше у відростках, ніж у сомі. Найбільш імовірне пояснення цього факту - більш високе співвідношення поверхня/об'єм для відростка, ніж для соми нервової клітини.

#### Матеріали дисертації опубліковані в таких роботах:

1. Усачев Ю.М., Миронов С.Л. Действие ионов стронция и бария на системы связывания и транспорта кальция в нервных клетках // *Нейрофизиология.* - 1989. - 21, №6. - С. 820-825.
2. Усачев Ю.М., Миронов С.Л. Влияние кофеина на процессы регуляции внутриклеточной концентрации Са<sup>2+</sup> в изолированных нейронах виноградной улитки // *Нейрофизиология.* - 1991. - 23, №1. - С. 66-73.
3. Усачев Ю.М., Шмиголь А.В., Прончук Н.Ф., Верхратский А.Н. Роль кофєїн-чувствительных кальциевых депо в модуляции кальциевых сигналов в сенсорных нейронах крыс // *Доклады Академии наук.* - 1993 (в печати).
4. Mironov S.L., Usachev Yu.M. Sr and Ba transients in isolated snail neurones studied with fura-2. The recovery from depolarization induced load and modulation of Ca release from intracellular stores // *Neuroscience Letters.* - 1990. - 112. - P. 184-189.
5. Mironov S.L., Usachev Yu.M. Caffeine affects Ca uptake and Ca release from intracellular stores: fura-2 measurements in isolated snail neurones // *Neuroscience Letters.* - 1991. - 123. - P. 200-202.
6. Mironov S.L., Usachev Yu.M., Lux H.D. Spatial and temporal control of intracellular free Са<sup>2+</sup> in chick sensory neurons // *Pflügers Archiv.* - 1993. - 424. - P. 183-191.
7. Usachev Y., Shmigol A., Pronchuk N., Kostyuk P., Verkhratsky A. Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons // *Neuroscience.* - 1993 (in press).





464198

AB 28.355

**AB 28.355**