

На правах рукопису

СНИЦАРІВ Владислав Анатолійович

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ТА ВИВЕДЕННЯ
КАЛЬЦІЮ
ПООДИНОКИМИ ІЗОЛЬОВАНИМИ НЕЙРОНАМИ
ВИНОГРАДНОГО РАВЛИКА

Спеціальність: 03.00.02 - Біофізика

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник -
академік П.Г.Костюк

Київ - 1993

AB 29.304

Дисертацією є рукопис.

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

Наукові керівники: академік АН України П. Г. Костюк
к. б. н. Тепікін А. В.

Офіційні опоненти: д.б.н. І.С. Шаура
д.б.н. Ф.В. Федоренко

Провідна установа: Інститут фізіології
ім. О.О.Богомольця Університету
ім. Т.Т. Шевченка

Офіційний захист дисертації відбудеться 27 лютого 1994 р. о
14:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01 при
Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця АН України за адресою м.
Київ, вул. Богомольця, 4.

Автореферат розісланий 22 лютого 1994 р.

З дисертацією можна познайомитися у бібліотеці Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН України.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор біологічних наук

3. О. Сорокіна-Маріна

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00777772 (.)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Цитоплазматична концентрація іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) є, мабуть, найбільш універсальним показником активності для всіх типів клітин та має фундаментальне значення у багатьох аспектах клітинної сигналізації, наприклад, 1) формуванні потенціалу дії, 2) секреції, 3) скорочуванні м'язів, 4) активації ферментів, 5) підтримуванні просторових структур макромолекул.

Залежність внутрішньоклітинних процесів від $[Ca^{2+}]_i$ потребує суворої регуляції як стаціонарних концентрацій, так і потоків іонів кальцію у цитоплазмі та через плазматичну мембрану. Підтримування $[Ca^{2+}]_i$ на належному рівні здійснюється за допомогою кількох кальцій-регулюючих систем, які знаходяться у середині клітини або вбудовані у її поверхневу мембрану. У стані спокою ці системи підтримують $[Ca^{2+}]_i$ на дуже низькому рівні (10^{-8} - $10^{-7}M$), а у період активації (наприклад, при виниканні потенціалу дії чи секреції) здійснюють транзйентне збільшення концентрації цих іонів до кількох мікромолей. Припинення періоду активності супроводжується повертанням $[Ca^{2+}]_i$ до базального рівня та транспортуванням Ca^{2+} проти сильного електрохімічного градієнту з цитоплазми до зовнішньоклітинної середовища.

Відомо багато механізмів, які регулюють $[Ca^{2+}]_i$. Серед них найбільш загальними є: 1) Ca^{2+} - Mg^{2+} -залежні АТРази - білки, які переносять Ca^{2+} проти електрохімічного градієнту за рахунок гідролізу АТР, 2) Na^{+}/Ca^{2+} обмінник, який переносить Ca^{2+} проти градієнту завдяки електрохімічному градієнту Na^{+} , 3) низькомолекулярні органічні та неорганічні негативно заряджені у водному розчині сполуки, які знаходяться у клітині у великих концентраціях: фосфат, цитрат, нуклеотиди, 4) кальцій-зв'язуючі білки, наприклад, кальмодулін, кальсеквестрін, кальретикулін. Однак, процес виведення кальцію з клітини та динаміка його змін залишаються ще недостатньо вивченими. Ці питання стали предметом цього дослідження.

Мета роботи. Мета даної роботи полягала у дослідженні процесу та механізмів підтримання фіксованого рівня концентрації іонів кальцію та виведення іонів кальцію у зовнішньоклітинний розчин у нейронах виноградного равлика.

Головні задачі. 1. Визначити швидкість виведення іонів кальцію у зовнішньоклітинний розчин в поодинокому ізольованому нейроні. 2. Оцінити буферну ємність цитоплазми нейрона для кальцію.

Наукова новизна. 1. Розроблені два оригінальних методи дослідження поодиноких ізольованих клітин (методи краплини та фіксації кальцію). 2. Оптичними методами поміряна швидкість виведення кальцію з нейронів у зовнішньоклітинний розчин при різних фізіологічних концентраціях $[Ca^{2+}]_i$. 3. Методом фіксації кальцію визначена величина кальцієвого буферу цитоплазми нейрона.

Практична цінність даної роботи полягає у створенні нових інструментальних засобів вивчення нервової клітини та отриманні даних про обмін у ній іонів кальцію.

Апробація роботи. Основні положення роботи були викладені у 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).

Об'єм та структура дисертації. Дисертація складається з вступу, літературного огляду, описання методів та експериментальної частини, обговорення, 7 висновків та списку літератури з 132 найменувань. Робота викладена на 130 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 19 малюнками.

За матеріалами дисертації опубліковано 4 роботи.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.

Дослідження проводилися на неідентифікованих ізольованих нейронах *Helix pomatia*. Ізольовані нейрони отримували за методом, який істотно не відрізнявся від традиційно застосованого у нашій лабораторії [Тепікин та др., 1987]. Розчини, використані у роботі, готувалися на основі розчину слідуючого складу (mM): NaCl - 100, KCl - 5, MgCl₂ - 5, CaCl₂ - 10, Tris-HCl - 20 (pH 7.4).

Принципові моменти методу вимірювання Ca²⁺, що перетинають плазматичну мембрану, були слідуючими.

Ізольовані клітини перед початком експерименту переносили з розчину Рінгера у розчин зі зниженою концентрацією кальцію (mM): CaCl₂ - 1, NaCl - 100, KCl - 5, MgCl₂ - 1, трисHCl - 35 [Тепікин та др., 1991; Tepikin et al., 1991]. Потім тонкою пластиковою пипеткою з отвором діаметром 200 мкм клітину відбирали з чашки та переносили на покривне гідрофобізоване скло. Краплину розчину з клітиною об'ємом 1-2 мл покривали нефлуоресцуючим маслом. Після цього спеціальною тонкою мікропипеткою з отвором діаметром 50 мкм вводили розчин з абсорбційним кальцієвим зондом Антіпірілазо III (APIII) у концентрації 6 мМ (100 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂,

35 mM трісНСІ-буфер). Процедуру повторювали 3-4 рази; загальна кількість введеного розчину з АРІІ було 10 μ l. Потім, використовуючи набір пластикових пипеток з діаметрами отворів 50, 20, 10 μ m, формували каплі радіусом 120 - 140 μ m з формою полусфери об'ємом 4-7 nl, у центрі якої знаходилася клітина. Відношення об'ємів мікрокамера/клітина доводилося до 10/1.

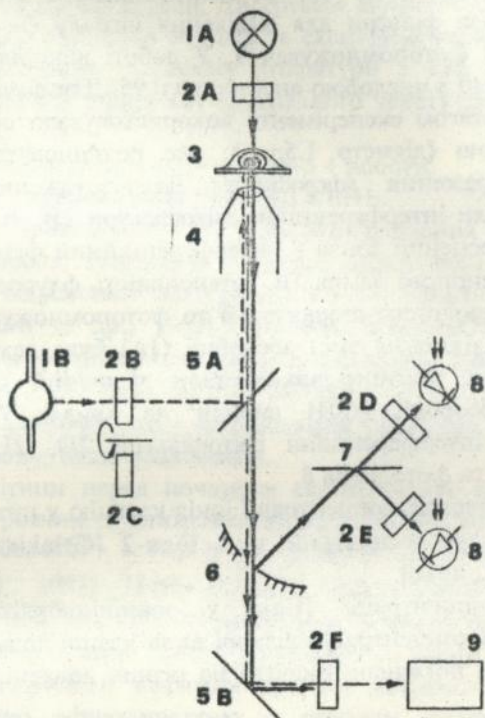
Схема реєстрації флуоресценції зображена на мал. 1. Розділення потоків збуджуючого світла та флуоресценції досягалося за допомогою діхроїчного дзеркала 5A. Світло, яке пройшло крізь фільтр для збудження флуоресценції 2B, 2C, відхилилося діхроїчним дзеркалом та за допомогою високоапертурного об'єктива 4 фокусувалось на об'єкт 3; світло флуоресценції від об'єкта збиралося тимож об'єктивом, проходило крізь фільтри для виділення сигналу флуоресценції 2F та подавалося на фотопомножувач 9. У роботі використався об'єктив - планохромат x40 з числовою апертурою 0.95. Для візуального контролю препарата протягом експеримента використовували сферичне дзеркало 6 з діафрагмою (діаметр 1.5mm), яке розташовувалося у площині дійсного зображення мікроскопа. Для збудження флуоресценції використовували інтерференційні світофільтри 2B, 2C, а для виділення сигналу флуоресценції зонда - інтерференційний фільтр 2F. Джерелом світла була ксенонова лампа 1B. Інтенсивність флуоресценції міряли за допомогою діхроїчного дзеркала 5B то фотопомножувача 9. Джерелом світла для дослідження змін абсорбції (1A) була лампа накаливання; для освітлення клітини використали червоний світофільтр (2A), реєстрацію абсорбції АРІІ робили на хвилях 710nm та 780nm (використали інтерференційні світофільтри 2D, 2E) за допомогою розщипителя 7 та фотодіодів 8.

Для визначення концентрації іонів кальцію у цитоплазмі нейронів використався флуоресцентний зонд Fura-2 [Grinkiewich et al., 1985; Lipscombe et al., 1988].

Зміни концентрації [Ca]_o у зовнішньоклітинному розчині визивали зміни концентрацій вільної та зв'язаної кальцієм форм АРІІ, які мають різні поглинання світла на різних довжинах хвиль - 710 та 780nm.

Принципова схема для метода фіксації концентрації іонів кальцію у клітині, що ми запровадили, зображена на мал. 2. У нейрон С, завантажений флуоресцентним зондом Fura-2 (для вимірювання внутриклітинної концентрації вільних іонів кальцію), вводилися один

двостовбурний мікроелектрод (M1) та один одностовбурний (M2). Лівий на малюнку стовбур мікроелектроду M1 використався для керуємої компаратором A2 іонофоретичної ін'єкції іонів кальцію у цитоплазму клітини. Правий на малюнку стовбур мікроелектроду M1 (заповнений 2.5M KCl) служив індиферентним у схемі ін'єкції іонів кальцію та для пропускання струму крізь мембрану клітини у двуелектродній схемі фіксації потенціалу; для вимірювання трансмембранного потенціалу використався мікроелектрод M2 (2.5M KCl). Фотопомножувач PM реєстрував флуоресценцію зонду Fura-2, фотострум перетворювався I-V конвертером (A1) у сигнал флуоресценції та реєструвався у терміналі 1. Цей сигнал порівнювався з командним (термінал 2) за допомогою мікросхеми

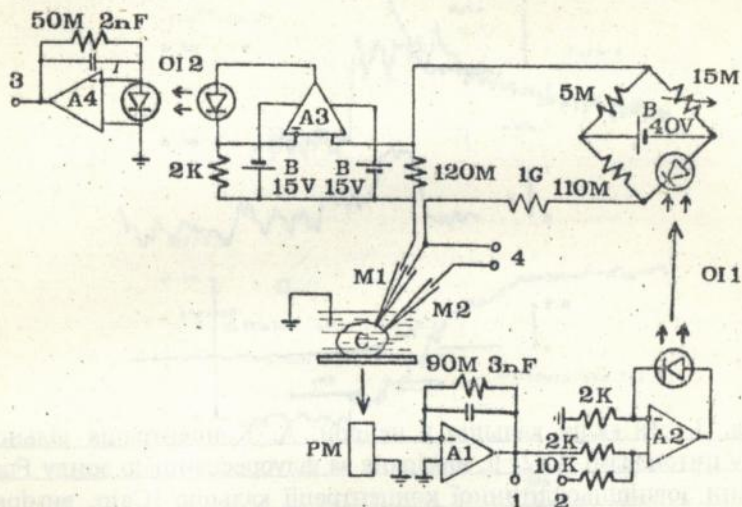


Мал. 1. Оптична схема установки (опис у тексті).

A2, яка керувала струмом ін'єкції кальцію за допомогою оптоізолятора ОІ1. Операційні підсилювачі А3, А4 та оптоізолятор ОІ2 використовувалися для вимірювання струму іонофоретичної ін'єкції.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію зростала під час ін'єкції Ca^{2+} та відразу після її закінчення починала релаксувати до початкового рівня. Зовнішньоклітинна концентрація кальцію $[\text{Ca}]_o$ починала збільшуватися протягом ін'єкції та досягала стабільного рівня протягом кількох хвилин після її закінчення. При збільшенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на $0.2-0.5\mu\text{M}$, що відповідає змінам $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при фізіологічних реакціях нейронів [Kostyuk et al., 1989; Connor et al., 1986], швидкість виведення іонів кальцію складала $0.3-2.5\mu\text{M/s}$ (мал. 3).

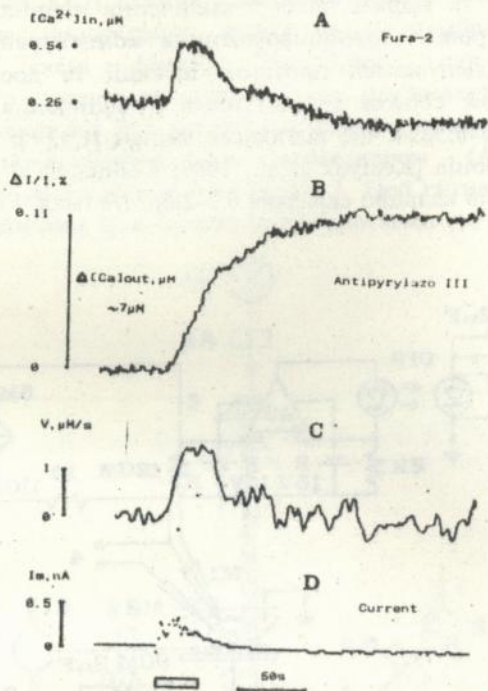


Мал. 2. Принципова схема установки для дослідження за допомогою метода фіксації концентрації іонів кальцію у клітині. Опис у тексті.

Швидкість витіснення іонів кальцію з цитозолу була обчислена як похідна змін зовнішньоклітинної концентрації кальцію помножена на відношення об'єма каплі до об'єму клітини:

$$V=(d[Ca]_o/dt)*(V_d/V_c).$$

Залежність швидкості витіснення іонів кальцію від часу була

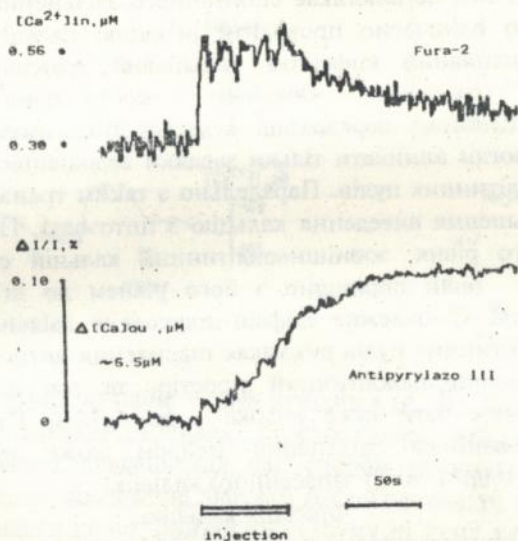


Мал. 3. Ін'єкція кальцію у нейрон. А. Концентрація вільного кальцію у цитоплазмі $[Ca^{2+}]_i$, виміряна за флуоресценцією зонду Fura-2. В. Зміни зовнішньоклітинної концентрації кальцію $[Ca]_o$, виміряні за зміною абсорбції барвника Antipyrylazo III. $\Delta I/I$ означає відносні зміни абсорбційного сигналу на довжині хвилі 710 nm. С. Швидкість виведення іонів кальцію, розрахована як похідна кривої В. D. Трансmemбранний струм. Подвійний відрізок означає час ін'єкції кальцію. Об'єм нейрону був 0.5 nl, об'єм зовнішньоклітинного розчину - 5 nl, струм ін'єкції - 15 pA, мембранний потенціал підтримувався на рівні -50mV.

аналогічна залежності від часу внутрішньоклітинного рівня вільних іонів кальцію.

Більша частина іонів кальцію, що були введені іонофоретично у сому нейрона, зв'язувалася у середині клітини, і тільки незначна частина (кілька процентів) виводилася у зовнішньоклітинний розчин. В експерименті, представленому на мал. 3, у зовнішньоклітинний розчин було виведено 14% ін'єкovanого кальцію. Під час першої ін'єкції доля виведеного Ca^{2+} була мінімальною, та далі збільшувалася під час наступних ін'єкцій у той же самий нейрон.

Під час тривалого збільшення рівня вільного кальцію у нейроні за допомогою іонофоретичної ін'єкції швидкість виведення кальцію стабілізувалась і не змінювалась суттєво (Мал. 4). Стабілізована



Мал. 4. Тривале підтримування стабільного збільшеного рівня внутрішньоклітинного кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітині шляхом регулювання струму ін'єкції. Середній струм ін'єкції склав 10nA; трансмембранний потенціал фіксувався на рівні -50mV. $\Delta I/I$ означає відносні зміни абсорбційного сигналу на довжині хвилі 710 nm. Подвійний відрізок означає час ін'єкції кальцію.

швидкість виведення кальцію у цьому випадку була біля $0.7\mu\text{M/s}$. У цій же клітині підтримання внутрішньоклітинної концентрації кальцію на більш високому рівні ($0.76\mu\text{M}$) приводило до більшої швидкості виведення ($1.9\mu\text{M/s}$). Аналогічні швидкості виведення ($0.3\text{--}4.6\mu\text{M/s}$) були отримані на інших клітинах, де зміни концентрації вільного кальцію були у фізіологічних межах ($0.2\text{--}0.5\mu\text{M}$).

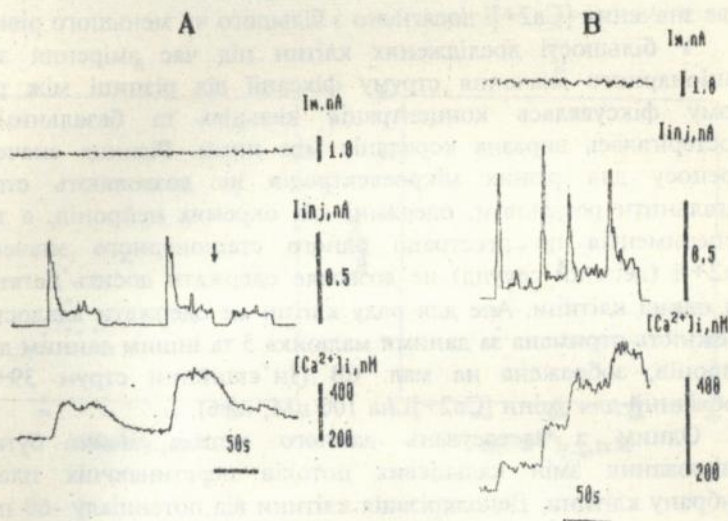
Якщо зовнішньоклітинний рівень вільного кальцію підтримувався на постійному рівні за допомогою іонофоретичної ін'єкції, швидкість виведення кальцію залишалася стабільною протягом всього періоду ін'єкції. Ця швидкість прямо корелювала зі збільшенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у межах між $0.1\text{--}0.5\mu\text{M}$.

Добре відомим активатором кальцієвого звільнення з внутрішньоклітинних депо являється кофеїн [Palade et al., 1987; Kostyuk et al., 1989]. Доданий у зовнішньоклітинний розчин у концентрації 5mM , кофеїн сам не викликає спонтанного звільнення іонів кальцію. Однак, якщо одночасно проводити ін'єкцію кальцію у клітину, то виникає викликаний кофеїном кальцієвий транз'єнт, часто після закінчення ін'єкції. Оскільки концентрація Ca^{2+} у зовнішньоклітинному середовищі була на дуже низькому рівні, такі транз'єнти могли виникати тільки завдяки звільненню іонів кальцію з внутрішньоклітинних пулів. Паралельно з таким транз'єнтом виникало швидке збільшення виведення кальцію з цитозолу. Після повернення до базального рівня, зовнішньоклітинний кальцій стабілізувався на підвищеному рівні порівняно з його рівнем до ін'єкції. Ці дані показують, що Са-залежне кофеїн-індуковане звільнення кальцію з внутрішньоклітинних пулів викликає підсилення витиснення кальцію з нейрону у зовнішньоклітинний простір, та що швидкість такого виведення може бути дуже висока - до $5\mu\text{M/s}$. Протягом періоду кофеїн-індукованого звільнення нейрон може втрачати значну кількість ($50\text{--}100\mu\text{M}$, $n=5$) запасеного кальцію.

Фіксація кальцію.

Типовий приклад фіксації $[\text{Ca}^{2+}]_i$ зображено на лівій частині мал. 5. На ілюстрації легко розрізнити дві компоненти струму ін'єкції: великий за амплітудою транз'єнт (виникаючий протягом збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ від попереднього фіксованого (або базального) рівня до нового рівня фіксації, та незначний постійний струм ін'єкції (необхідний для підтримання бажаного рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Більша частина іонів кальцію, яка потрапляє у цитоплазму нейрона під час транз'єнту струму ін'єкції,

виникаючого при фіксації $[Ca^{2+}]_i$ від меншого її значення до більшого, очевидно, зв'язується внутрішньоклітинними буферними системами. Тому площа під цим транзієнтом, виражена як кількість двувалентних катіонів поділена на об'єм нейрона ($C, \mu M$), повинна характеризувати величину цього буфера. Проведенні вимірювання показали, що величина C корелює з різницею меж рівнями, на якому підтримувалася $[Ca^{2+}]_i$ до та після



Мал. 5. Фіксація кальцію у двох нейронах (А, В). Перша фіксація на діаграмі А показує приклад переколювань, які є загальною особливістю процесу фіксації під час спроби поліпшення часового діапазону. На другій фіксації на діаграмі А стрілка вказує на перехід до фіксації до меншого рівня. Зникнення струму ін'єкції кальцію I_{inj} за час переходу пояснюється тим, що клітині доводиться тільки витискати збитковий кальцій з цитоплазматичного буфера і у додатковій ін'єкції кальцію у цитоплазму нема необхідності. В. Фіксація кальцію на чотирьох послідовно збільшуючихся рівнях. Моменти початку фіксації кальцію співпадають з переднім фронтом відповідних транзієнтів струму фіксації. Трансмембранний потенціал, що підтримується, - 60mV.

початку фіксації на новому рівні. Проведена з урахуванням числа переносу для мікроелектрода числова оцінка показує, що величина даної цитоплазматичної кальцієвої ємності при зміні $[Ca^{2+}]_i$ на 100 nM в районі базального рівня складає $36 \pm 20 \mu\text{M}$, ($n=7$) (мал. 6).

Після закінчення транзйентного періоду струм ін'єкції I_{inj} стабілізувався на низькому рівні. Для зміни $[Ca^{2+}]_i$ на 100 nM цей струм складав тільки $50 \pm 9\text{ pA}$ ($n=7$), що відповідає ін'єкції $0.39 \pm 0.2 \mu\text{M/s}$ іонів Ca^{2+} . Величина I_{inj} не залежала від того, чи було нове значення $[Ca^{2+}]_i$ досягнуто з більшого чи меншого рівня.

У більшості досліджених клітин під час змірення залежності стаціонарного значення струму фіксації від різниці між рівнем на якому фіксувалась концентрація кальцію та базальним рівнем, спостерігалась виразна кореляція між ними. Різниця значень чисел переносу для різних мікроелектродів не дозволяють статистично узагальнити результати, одержані для окремих нейронів, а тривалість експериментів по реєстрації одного стаціонарного значення I_{inj} - $[Ca^{2+}]_i$ (десятьки секунд) не дозволяє одержати досить багато даних для однієї клітини. Але для ряду клітин це одержати вдалось. Типова залежність отримана за даними малюнка 5 та іншим даним для різних нейронів, зображена на мал. 6В (Ін'єкційний струм $39 \pm 6\text{ pA}$ був необхідний для зміни $[Ca^{2+}]_i$ на 100 nM , $n=6$).

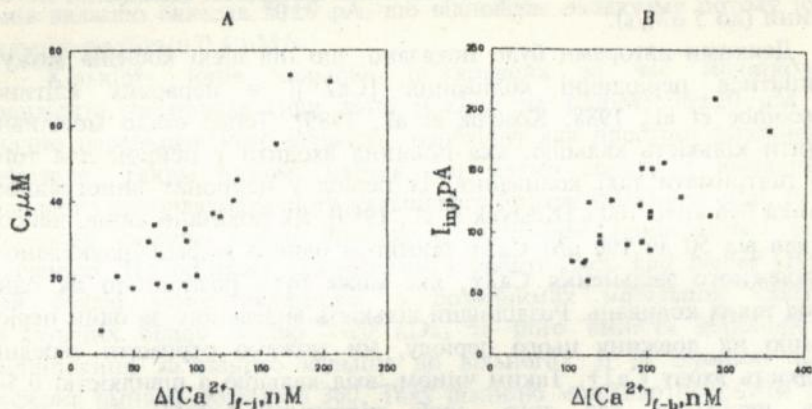
Одним з застосувань даного метода може бути пряме вимірювання змін кальцієвих потоків перетинаючих плазматичну мембрану клітини. Деполяризація клітини від потенціалу -60 mV до -15 mV приводила до суттєвого збільшення $[Ca^{2+}]_i$ у випадку відсутності фіксації і одночасно не супроводжувалась змінами цього рівня у випадку фіксації. Зменшення I_{inj} у момент початку деполяризуючого зміщення відповідало збільшенню входу Ca^{2+} крізь канали плазматичної мембрани. Проведені з урахуванням числа переносу оцінки показують, що під час перших секунд деполяризуючого зміщення від -60 до -15 mV виникав струм $68 \pm 15\text{ pA}$ і у клітину входило $0.59 \pm 0.31 \mu\text{M}$ Ca^{2+} .

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

Метод каплі та швидкість виведення кальцію.

Швидкість виведення іонів кальцію при фізіологічно допустимих збільшеннях $[Ca^{2+}]_i$ в наших експериментах дорівнювала приблизно $1\text{ }\mu\text{M/s}$. Стабільна швидкість виведення кальцію відповідає швидкості виведення кальцію, підрахованої для нейронів виноградного равлика

непрямим засобом [Hermann et al., 1982]. Пряме порівняння внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та потоку Ca^{2+} крізь мембрану показали, що при фізіологічних змінах $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 0.1-0.5 μM швидкість виведення кальцію у нейронах равлика залежить від $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Аналогічні данні про швидкості виведення Ca^{2+} , отримані на ненеуронних препаратах (панкреатичних ацінарних клітинах миші [Terikín et al., 1992]). З цього можливо зробити висновок, що ця залежність, скоріш всього, є універсальним для більшості типів клітин.



Мал.6. А. Залежність площі під кривою транзйента струма ін'єкції (С) від величини зміни концентрації кальцію ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_f-i$). Результати одержані для типового нейрона при фіксації рівня кальцію від одного стаціонарного значення до другого. Величина змін $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_f-i$ визначалася як різниця між концентрацією кальцію у нейроні - $[\text{Ca}^{2+}]_i$ після та до початку фіксації до наступного значення. В. Залежність стаціонарного рівня струма фіксації кальцію (I_{inj}) від величини зміни концентрації кальцію відносно базального рівня ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_f-b$). Величина стаціонарного рівня I_{inj} визначалася як середнє значення струма ін'єкції за час між закінченням транзйента, який приводить до данного значення концентрації кальцію, та початком слідууючого транзйента. Величина $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_f-b$ визначалося як різність концентрацій кальцію меж рівнем фіксації та базальним рівнем.

Кофеїн-індуковане звільнення кальцію.

Новий метод також дає можливість простежити зміни цитоплазматичної концентрації іонів кальцію, звільнених з внутрішньоклітинних пулів протягом комбінованої дії кофеїна та ін'єкуемого кальцію. У цьому випадку низька концентрація кальцію у зовнішньому розчині є перевагою, тому що внутрішньоклітинні пули є практично єдиними джерелами збільшення рівня внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Протягом кофеїн-індукованого кальцій-залежного звільнення Са клітина втрачала значну кількість Ca^{2+} - до $100 \mu\text{M}$, очевидно, завдяки помітному збільшенню швидкості виведення його з клітини (до $5 \mu\text{M/s}$).

Деякими авторами було показано, що під дією кофеїна можуть починатися періодичні коливання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нервових клітинах [Lipscombe et al., 1988; Kostyuk et al., 1989]. Тепер стало можливим оцінити кількість кальцію, яка повинна входити у нейрон для того, щоб підтримати такі коливання. Їх період у нейронах виноградного равлика був коло 100 s [Kostyuk et al., 1989]. Як показано вище, нейрон втрачав від 50 до $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} протягом одного кофеїн-індукованого Са-залежного звільнення Ca^{2+} , яке може бути розглянено як один період таких коливань. Розділивши кількість виведеного за один період кальцію на довжину цього періоду, ми можемо отримати середню швидкість входу Ca^{2+} . Таким чином, вхід кальцію з швидкістю $0.5-1 \mu\text{M/s}$ необхіден для того, щоб підтримати стабільність такої осциляторної поведінки.

Метод фіксації кальцію.

Представлена робота є також першою спробою використати широко відому методологію фіксації до процесів, зв'язаних з регулюванням концентрації вільного кальцію у цитозолі окремих клітин. Основна ідея полягає у тому, щоб за допомогою двох противодіючих систем, одна з яких - іонофоретична ін'єкція - збільшує $[\text{Ca}^{2+}]_i$, шляхом ін'єкції Ca^{2+} у цитоплазму, а друга - кальційрегулюючі системи нейрона - протидіє її збільшенню, зафіксувати концентрацію вільних іонів кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на бажаному рівні. У цьому випадку струм ін'єкції буде точно відображати роботу систем, які виводять Ca^{2+} з цитозолу. Крім можливості вивчення роботи внутрішньоклітинних кальційрегулюючих механізмів, створення такого методу відкриває широке поле для дослідження

різних внутрішньоклітинних процесів, що залежать від $[Ca^{2+}]_i$, в умовах фіксації її рівня у цитоплазмі окремої нагивної клітини.

Плато струма фіксації.

Після завершення перехідних процесів та стабілізації концентрації кальцію на заданому рівні, ін'єкційний струм, необхідний для підтримання цього стану, був дуже малий по зрівнянню з тим, який звичайно використовується для мікроелектродної ін'єкції Ca^{2+} [Hermann et al., 1982; Gorman et al., 1980]. При зміні концентрації $[Ca^{2+}]_i$ на 100 нМ порівняно з базальною, необхідний для цього струм іонів кальцію складав 50 ± 9 pA, що відповідає входячому потоку іонів кальцію не більш 0.4 $\mu M/s$.

Кількість іонів кальцію, ін'єкованих за час початкового транзєнта, становила (при зміні $[Ca^{2+}]_i$ на 100 нМ) 36 ± 20 μM що значно перевищує його кількість, необхідну для простого заповнення цитозоля. Таким чином, мабуть, ми маємо справу з вмиканням швидкого цитоплазматичного кальцієвого буферу [Meldolesi et al., 1988], буферна ємність якого приблизно відповідає приведеному вище значенню. По оцінкам, приведеним у роботі Zhou and Neher (1993), цей буфер може складатись з розчинимих мобільних кальцій-зв'язуючих білків масою 7-20 kDa, та його ємність дорівнює 40 (відношення зв'язаного кальцію до вільного). В їх термінах наша буферна ємність дорівнює 360. Таку різницю можливо пояснити тим, що ці автори завантажували цитоплазму великими (більш, ніж 1 μM) концентраціями кальцію, і тому кальцієвий буфер знаходився ближче до насичення, ніж у наших експериментах (де концентрація $[Ca^{2+}]_i$ не перевищувала фізіологічних значень).

Деполаризація за час фіксації кальцію.

Оцінки показують, що протягом перших секунд тривалі деполаризації мембрани до рівня -15 mV до нейрону потрапляє 0.23 ± 12 $\mu M/s$ Ca^{2+} . При продовженні деполаризації входячий струм іонів кальцію поступово зменшується, причому у різних клітинах з різною швидкістю. В крайніх випадках маємо або практично повне зникнення його на протязі 30-40 секунд, або збереження його значення на протязі понад 100 секунд після початку деполаризації. Мабуть, це зв'язано з тим, що різні нейрони мають різні швидкості інактивації кальцієвих входячих струмів при тривалих деполаризаціях, що відображає їх різну функціональну приналежність.

У фізіологічному діапазоні змін $[Ca^{2+}]_i$ кількість Ca^{2+} , який потрапляє до нейрону крізь плазматичну мембрану при деполяризації мембрани та активації кальцієвих потенціал-керуємих каналів, достатньо добре відповідає його кількості, що усувається з цитозоля, - таким чином продуктивність роботи звільняючих та усуваючих кальцій систем приблизно однакова, що дає можливість підтримувати ефективний кальцієвий баланс.

ВИСНОВКИ

1. Одночасні оптичні вимірювання зовнішньоклітинної концентрації кальцію за абсорбційним зондом Antipyrylazo III та внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію за флуоресцентним зондом Fura-2 у поодинокого ізольованого нейрона виноградного равлика в умовах іонофоретичної ін'єкції цих іонів крізь мікроелектрод показали, що швидкість виведення кальцію з клітини прямо корелює з цитоплазматичною концентрацією іонів кальцію в області змін $[Ca^{2+}]_i$, перевищуючих базальну концентрацію. При збільшенні $[Ca^{2+}]_i$ за допомогою іонофореза на 0.2-0.5 μM , швидкість виведення кальцію з нейрона складала 0.3-4.6 $\mu M/s$.

2. На протязі кофеїн-індукованого кальцій-залежного кальцієвого викиду з внутрішньоклітинних депо спостерігається підсилення виведення кальцію з клітини, швидкість якого досягає 5 $\mu M/s$.

3. Використовуючи зворотній зв'язок між сигналом флуоресценції зонда Fura-2 та струмом іонофоретичної ін'єкції кальцію у цитоплазму крізь мікроелектрод, здійснена фіксація рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. При цьому величина струма ін'єкції характеризує величину та кінетику роботи систем, які виводять Ca^{2+} з цитозолю. Показано, що перехід до нового більш високого рівня $[Ca^{2+}]_i$ супроводжується короточасним збільшенням кальційін'єкуючого струму. Щоб збільшити $[Ca^{2+}]_i$ на 0.1 μM , необхідно ін'єкувати за цей період $36 \pm 20 \mu M$ кальцію. Зроблений висновок, що цей транз'єнт необхіден для заповнення швидкого цитоплазматичного кальцієвого буферу, який повинен бути насиченим для досягнення нового більш високого рівня $[Ca^{2+}]_i$.

4. За допомогою цього ж методу зміряна продуктивність роботи кальцій-регулюючих систем, які виводять кальцій з цитоплазми. Після короточасного збільшення кальцій-ін'єкуючого струму та до закінчення фіксації його сила підтримується на постійному рівні, який є дуже малим за величиною (0.39 \pm 0.2 $\mu M/s$ для підтримання $[Ca^{2+}]_i$

зміненним на $0.1 \mu\text{M}$). Ця величина характеризує роботу систем, які виводять кальцій та відповідає аналогічній кількості іонів кальцію, що витискуються з цитоплазми до зовнішньоклітинного розчину.

5. Прямо зміряна швидкість потрапляння іонів кальцію у клітину протягом деполяризуючих зміщень мембранного потенціалу. Швидкість потрапляння кальцію у клітину протягом перших секунд деполяризації до -15 mV була $0.59 \pm 0.31 \mu\text{M/s}$, що для клітини діаметром $100 \mu\text{m}$ дорівнює трансмембранному струму 400 pA .

6. Не знайдена активація Ca -залежних калієвих каналів при збільшенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, у кілька разів перевищуюча базальний рівень, що означає, що для активації цих каналів необхідне більш істотне збільшення концентрації іонів кальцію у безпосередній близькості від міста розташування цих каналів.

7. Запропонована інтегральна схема механізмів, які ефективно підтримують гомеостаз іонів кальцію у цитозолі нервової клітини та регулюють амплітуду та тривалість внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів при її активації.

Перелік робіт, які опубліковані за тематикою дисертації:

1. Тепікин А.В., Сницарев В.А., Белан П.В. Використання барвника Антіпірілазо III для изучения висновка Ca^{2+} з ізольованого нейрона моллюска *Helix pomatia* // Биологические мембрани. - 1991. - 8, N5, - С. 514-521.
2. Tepikin A.V., Kostyuk P.G., Snitsarev V.A., Belan P.V. Extrusion of calcium from a single isolated neuron of the snail *Helix pomatia* // J.Membrane Biol. 123, 43-47 (1991).
3. Belan P., Kostyuk P., Snitsarev V. and Tepikin A. Calcium clamp in isolated neurones of the snail *Helix pomatia*. Journal of Physiology (1993), 462, pp. 47-58.
4. Belan P. V., Kostyuk P. G., Snitsarev V. A. and Tepikin A. V. Calcium clamp in single nerve cells. Cell Calcium (1993) 14, 419-425.

460804

AB 29.304

AB 29.304