

Седова Марина Борисівна

РЕГУЛЯЦІЯ КАЛЬЦІЄВОЇ ПРОВІДНОСТІ
В КЛІТИНАХ ГІПОФІЗУ ЩУРА ЛІНІЇ GH₃
ПІД ВПЛИВОМ ГЛЮКОКОРТИКОЇДІВ

Спеціальність: 03.00.02 - Біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Роботу виконано у відділі загальної фізіології нервової системи Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН У раїни

Науковий керівник - академік Платон Григорович Костюк.

Офіційні опоненти: академік Ігор Сільвестрович Магура;

д.б.н. Маргарита Костянтинівна Малишева.

Провідна установа: Київський Державний Університет ім. Т.Г. Шевченка

Захист відбудеться " 31 " жовтня 1995 р.

на засіданні Спеціалізованої ради Д - 01.13.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України за адресою м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Автореферат розісланий " 26 " серпня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор біологічних наук

З.О. Сорокіна-Маріна

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00755681 (W)

ЛННБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Внутрішньоклітинний кальцій розглядається у сьогоденні як один з найбільш універсальних посередників, що бере участь у передачі сигналу від структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних елементів, які забезпечують відгук клітини на зовнішній вплив. Іони кальцію запускають цитоплазматичні процеси, що лежать в основі клітинної збудливості, синаптичної передачі, скорочення та секреції.

Ряд широко відомих патологічних станів пов'язаний з порушенням секреторної активності клітин аденогіпофізу, гормони якого беруть участь у регуляції багатьох фізіологічних процесів. Оскільки кальцій, що надходить у клітини переднього гіпофізу через потенціал-керовані кальцієві канали, грає суттєву роль в зв'язку стимул-секреція, безсумнівний інтерес викликають питання відносно регуляції кальцієвої провідності під впливом речовин, які модулюють секреторну активність клітин цієї структури.

Є багато робіт, присвячених механізмам дії гіпоталамічних факторів на гіпофізарні клітини, але недостатня увага приділяється вивченню впливу гормонів периферійних ендокринних структур. Система гіпофіз-наднирники привертає до себе увагу фахівців різних галузей медицини та нейронаук. Проте, не дивлячись на інтенсивні дослідження метаболічних, протизапальних та антиалергічних ефектів глюкокортикоїдів, потребують більш детального визначення шляхи регуляції цими гормонами електричної активності збудливих клітин, зокрема клітин гіпофізу, що експресують рецептори до цього класу гормонів.

Зручний об'єкт для дослідження регуляції функціонування потенціал-керованих кальцієвих каналів під час модуляції секреції в клітинах гіпофізу являють клітини клонованих ліній, що дозволяють усунути труднощі, пов'язані з гетерогенністю популяції нормальних клітин. Однією з таких ліній є лінія GH₃, клітини якої проявляють спонтанну електричну активність та виділяють гормон росту та пролактин.

Мета роботи полягала у вивченні регуляції кальцієвої провідності в клітинах гіпофізу щурів лінії GH₃ під впливом глюкокортикоїдів.

Задачи роботи: 1. Вивчити вплив глюкокортикоїдів на секрецію гормону росту та пролактину в GH_3 клітинах; 2. Дослідити зміни густини кальцієвих струмів різних типів в GH_3 клітинах під впливом глюкокортикоїдів; 3. Визначити часову та концентраційну залежності ефекту в умовах інкубації клітин з гідрокортизоном або дексаметазоном; 4. Дослідити механізм дії глюкокортикоїдів.

Наукова новизна. Вперше виявлено вплив глюкокортикоїдів - стероїдів кори наднирників на кальцієву провідність в гіпофізарних клітинах. Показано, що гідрокортизон та дексаметазон збільшують густину низькопорогового та високопорогового компонентів кальцієвого струму при інкубації GH_3 клітин в середовищі, що містить мікромолярні дози гормону. В ході досліджень визначені концентраційна та часова залежності ефекту. Наведені результати дозволяють пояснити описаний феномен на основі геномного механізму дії стероїдних гормонів.

Практична цінність. Виявлений ефект впливу глюкокортикоїдів на кальцієву провідність передбачає важливу роль регуляції експресії іонних каналів в опосередкуванні впливу глюкокортикоїдів на електричну та секреторну активності клітин гіпофізу.

Одержані дані можуть бути використані в майбутньому для вивчення механізмів спряження стимул-секреція, а також для з'ясування ролі потенціал-керованих каналів в регуляції стимульованої секреції в гіпофізарних клітинах.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були представлені у вигляді стендової доповіді на радянсько-німецькому симпозиумі "Збудливі мембрани" (Київ, 1991), на міжнародній робочій нараді "Механізми кальцієвого гомеостазу клітин, які збуджуються" (Київ, 1993), а також доповідалися на засіданні Вченої ради Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України. (1994).

Об'єм та структура дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, описання методів та експериментальної частини, обговорення, 7 висновків та списку літератури з 222 найменувань. Робота викладена на 115 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 22 малюнками та 3 таблицями. За матеріалами дисертації опубліковано 3 роботи.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Клітини лінії гіпофізу щура GH_3 культивувалися як монослойна культура в середовищі RPMI 1640 (Sigma) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (м. Мінськ) при 37°C в зволоженій атмосфері, що містила 5% CO_2 . Для експериментів клітини висаджувалися з щільністю $1+2 \times 10^5$ клітин на чашку Петрі (30 мм) та використовувалися на третій-четвертий день після пасажу.

В даній роботі кальцієві струми досліджувалися за допомогою методу фіксації потенціалу на цілій клітині в умовах щільного контакту (Hamil *et al.* 1981) та перфорованого петчу (Horn and Marty, 1988) при використанні каналотвірного антибіотику - амфотерицину Б. Густина кальцієвих струмів визначалась як відношення максимальної амплітуди струму до ємності клітини. Для оцінки останньої проводилося інтегрування ємносного струму у відповідь на прикладення гіперполяризуючого зсуву потенціалу ΔU (10 мВ). Величина інтегралу дорівнює заряду Q , необхідному для перезарядження ємності клітини, яка знаходилась за відношенням $Q/\Delta U$.

Аплікації здійснювали ін'єкцією під тиском з мікропіпетки, розташованої безпосередньо над клітиною або за рахунок зміни розчину в експериментальній камері.

Зовнішньоклітинний розчин мав такий склад (в ммоль/л): 140 NaCl, 10 HEPES, 15 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 20 глюкози. Натрієвий струм блокувався додаванням 1 мкМ тетродотоксину. Розчин для заповнення петч-піпеток в умовах стандартного методу фіксації потенціалу містив (в ммоль/л): 130 CsCl, 10 EGTA, 5 MgCl_2 , 5 ATP, 10 HEPES, а при використанні методу перфорованого петчу: 55 CsCl, 75 Cs_2SO_4 , 5 MgCl_2 , 10 HEPES. Значення рН розчинів складала 7.35.

Контроль секреторної активності клітин проводився методом радіоімунного аналізу з використанням стандартних наборів для визначення концентрації гормону росту та пролактину в сироватці крові (Radioassay Systems Laboratories, Inc., USA).

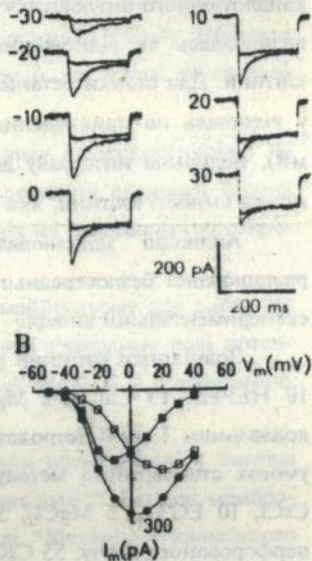
Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} здійснювалося за допомогою флуоресцентного зонду фура-2 по відношенню флуоресцентних сигналів на двох довжинах хвиль збудження (Grinkewich *et al.* 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Виділення та характеристика кальцієвого струму в GH_3 клітинах

Кальцієві струми реєстрували, використовуючи стандартні шляхи виділення їх у чистому вигляді. Для цього клітини перфузували внутрішньоклітинним розчином, що містив Cs^+ як основний катіон - для усунення вихідного калієвого струму. Натрієвий вхідний струм блокувався додаванням 1 мкМ тетродотоксину. В таких умовах деполяризація клітин від мембранного потенціалу, що підтримувався на рівні -75 мВ, до значень більш позитивних ніж -40 мВ, викликала появу вхідного іонного струму, який повністю зникав при введенні в зовнішній розчин 4 мМ Co^{2+} . Таким чином, реєструємий вхідний струм був результатом активації потенціал-керованих кальцієвих каналів.

В роботі ми використовували традиційний протокол для розділення низько- та високопорогового кальцієвих струмів. На мал. 1 наведені суміщені кальцієві струми, зареєстровані при двох значеннях підтримуючого потенціалу (V_h): -80 мВ та -40 мВ. Легко побачити наявність двох компонентів, що відрізняються потенціалозалежними стаціонарними та кінстичними властивостями. Поріг активації компоненту струму, що мав швидку кінетику інактивації, знаходився в районі -40 мВ, а максимум вольт-амперної характеристики - в районі -10 мВ. Другий компонент, що відрізнявся повільною інактивацією, мав поріг активації -20 мВ та максимум при $+10$ мВ. Низькопороговий компонент кальцієвого струму зникав при підвищенні V_h , що віддзеркалює розвиток його стаціонарної інактивації. Ці два компоненти обумовлені наявністю в



Мал. 1. Два компоненти потенціал-керованого кальцієвого струму в GH_3 клітинах. **А.** Реєстрації струмів, отримані при $V_h = -80$ та -40 мВ. **В.** Вольт-амперні характеристики інтегрального (●), низько- (■) та високопорогового (□) кальцієвих струмів.

мембрані GH_3 клітин двох типів кальцієвих каналів, що класифікуються як Т- і L-типи, знайдені в багатьох препаратах.

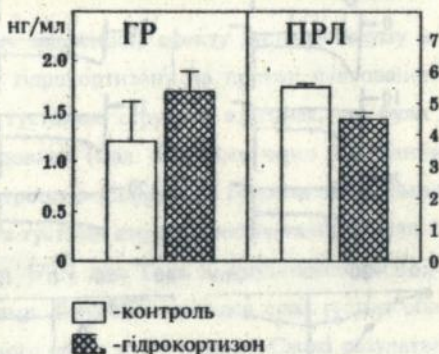
Отже, струм, що реєстрували при $V_h = -40$ мВ, розглядали як струм через високопорогові L-канали, а величина струму через низькопорогові Т-канали оцінювалась по піку різницевого струму, який отримували відніманням високопорогового компонента від загального кальцієвого струму.

Густини кальцієвих струмів визначались як відношення максимальної амплітуди до ємності мембрани клітини.

Вплив гідрокортизону (ГК) на секреторну активність клітин

Спочатку був здійснений контроль секреторної активності клітин шляхом відбору надклітинного середовища і проведення радіоімунного аналізу з використанням стандартних наборів для визначення концентрації гормону росту та пролактину у сироватці крові.

Інкубація клітин на протязі 2 годин з 1 мкМ гідрокортизону прив. дила до підсилення секреції гормону росту на 44% та зменшення секреції пролактину на 10% в порівнянні з базальним рівнем секреції цих гормонів (мал. 2). Як базальна, так і індукована секреція повністю блокувалися додаванням у середовище 4мМ іонів Co^{2+} .

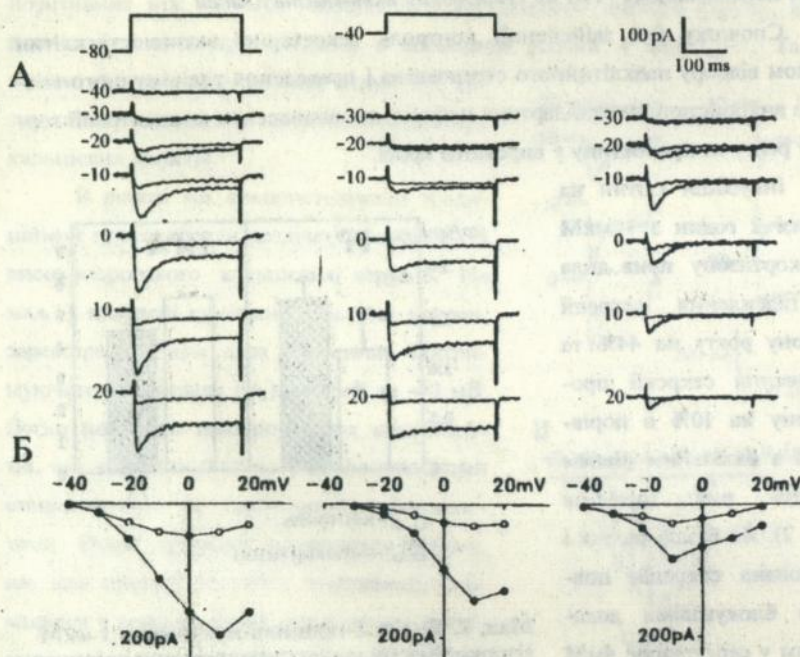


Мал. 2. Вплив 2-годинної інкубації в 1 мкМ гідрокортизону на секрецію гормону росту (ГР) та пролактину (ПРЛ) в GH_3 клітинах.

Вплив гідрокортизону (ГК) на кальцієві струми різних типів

Малюнок 3 ілюструє вплив гідрокортизону на кальцієві струми в GH_3 клітинах. Верхні реєстрації отримані на клітині з контрольної групи, нижні - на клітині, що була проінкубована 2 години з 1 мкМ ГК. Ліва колонка реєстрацій являє загальний кальцієвий струм, середня - високопороговий

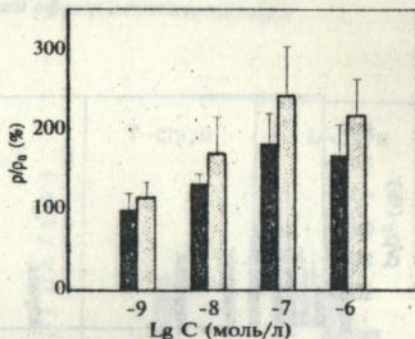
компонент, а права - низькопороговий Т-компонент. Відповідні вольт-амперні характеристики (ВАХ) для цих двох клітин наведені знизу. Оскільки обидві клітини мали приблизно однакову ємність (~12 пФ), то можна побачити, що амплітуди обох кальцієвих струмів значно збільшилися після обробки гідрокортизоном. При цьому поріг активації та положення максимуму вольт-амперної характеристики обох компонентів струму не змінювались.



Мал. 3. Вплив гідрокортизону на кальцієвий струм. А. Реєстрації, отримані на контрольній клітині (верхні) і на клітині, проінкубованій 2 години з 1 мкМ гормону (нижні). Ліва колонка - загальний кальцієвий струм, середня - високопороговий, права - низькопороговий. Б. Відповідні ВАХ для контрольної (O) та обробленої гормоном (●) клітини. Мембранна ємність обох клітин ~12 пФ.

Концентраційна характеристика дії гідрокортизону

В роботі була визначена концентраційна залежність дії гідрокортизону на кальцієву провідність при одноденній інкубації. Ці результати зображені на мал. 4. Достовірне збільшення густин обох компонентів струму спостерігалося при концентрації гормону 10^{-8} М, а максимальний ефект - при концентраціях - 10^{-7} та 10^{-6} М.



Мал. 4. Вплив різних концентрацій гідрокортизону на густину низько- (■) та високорогового (▨) струмів. Результат зображено порівняно з контролем.

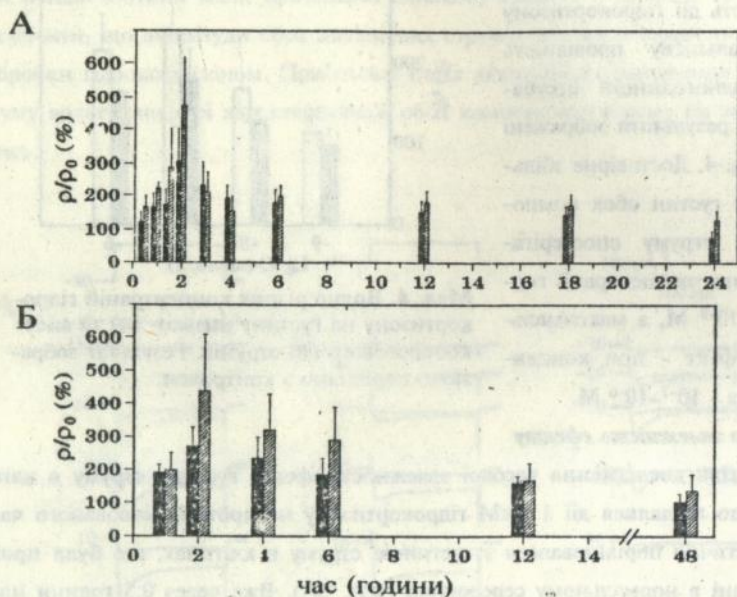
Часова залежність ефекту

Для дослідження часової залежності ефекту густина струму в клітинах, що піддалися дії 1 мкМ гідрокортизону на протязі фіксованого часу, статистично порівнювалася з густиною струму в клітинах, що були проінкубовані в нормальному середовищі (мал. 5А). Вже через 0.5 години інкубації клітин з ГК, було зареєстровано збільшення густини обох компонентів струму. Максимальні значення густини струму спостерігалися після 2 годин інкубації і становили 300% та 470% для Т- і L-струмів відповідно, порівняно з контрольними клітинами. Далі спостерігався спад густин обох компонентів струму до контрольного рівня за 24 години. Схожі результати були отримані при використанні синтетичного глюкокортикоїду - дексаметазону. В аналогічних умовах максимальний ефект досягався також після 2 годин інкубації з гормоном і становив 280% и 440% (мал. 5Б).

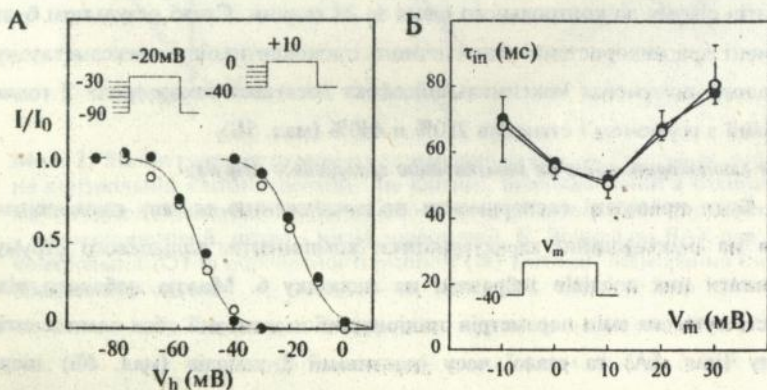
Вплив глюкокортикоїдів на інактивацію кальцієвого струму

Були проведені експерименти по дослідженню впливу глюкокортикоїдів на інактиваційні характеристики компонентів кальцієвого струму. Результати цих дослідів зображені на малюнку 6. Можна побачити відсутність суттєвих змін параметрів стаціонарної інактивації обох компонентів струму (мал. 6А) та сталої часу інактивації L-каналів (мал. 6Б) після

інкубації клітин у середовищі, що містило 1 мкМ гормону, на протязі 1.5 годин.



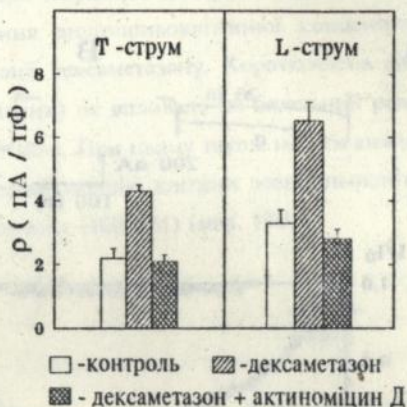
Мал. 5. Часова залежність дії 1 мкМ гідрокортизону (А) і дексаметазону (Б) на низько- (■) та високопороговий (▨) струми. Ордината являє збільшення густини струмів в клітинах, проінкубованих з гормоном, відносно густини струмів в клітинах контрольної групи.



Мал. 6. А. Стационарна інактивація кальцієвих струмів в контрольній (O) та обробленій гідрокортизоном (●) клітинах. Б. Вплив дексаметазону на сталу часу інактивації L-каналів.

Вплив актиноміцину Д на виявлений ефект глюкокортикоїдів

Відомо, що механізм дії стероїдних гормонів передбачає індукцію біосинтезу протеїнів в результаті взаємодії гормон-рецепторного комплексу з генетичним апаратом клітини. Тому ми досліджували вплив актиноміцину Д, інгібітору протеїнового синтезу на рівні транскрипції, на виявлений ефект. Не спостерігалось збільшення густини кальцієвого струму після 1 години інкубації клітин в середовищі, що містило 1 мкМ дексаметазону при одночасному додаванні актиноміцину Д у концентрації 100 мкМ.



Мал. 7. Вплив актиноміцину Д на густину кальцієвих струмів в клітинах, про інкубованих в присутності дексаметазону.

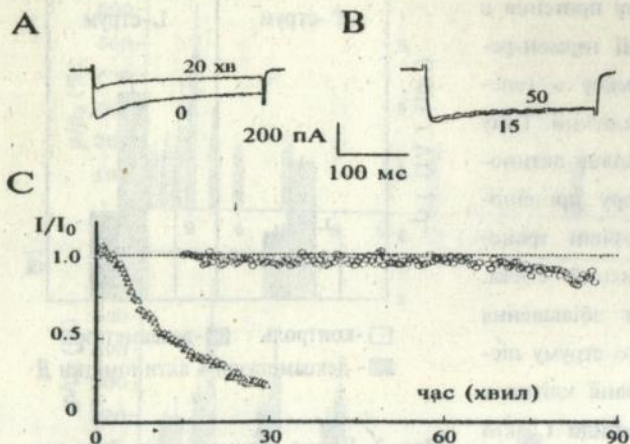
Вплив дексаметазону на L-струм в умовах перфорованого петчу

Аплікація ГК на протязі 30-40 хвилин безпосередньо на діалізовану клітину не змінювала природнього зменшення амплітуди кальцієвого струму з часом, що було пов'язане з вимиванням внутрішньоклітинного вмісту.

З метою збереження цитоплазматичних компонентів, і в той же час реєстрації кальцієвого струму застосовувалася перфорація частки мембрани за допомогою каналотворюючого антибіотику - амфотерицину Б.

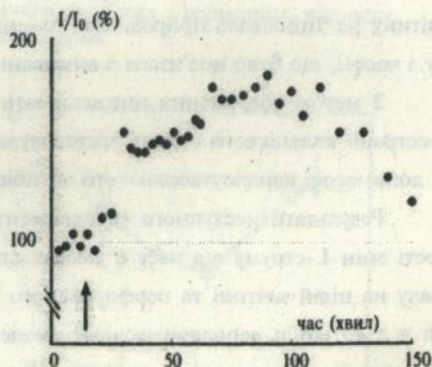
Результати наступного експерименту наведені для порівняння залежності змін L-струму від часу в умовах стандартного методу фіксації потенціалу на цілій клітині та перфорованого петчу. Реєстрації проводились при $V_h = -40$ мВ и деполяризуючому зміщенні до +10 мВ. Амплітуди струму нормовані до початкового значення. При використанні стандартного методу фіксації потенціалу на цілій клітині амплітуда кальцієвого струму збільшувалася на протязі перших 1-3 хвилин, а потім спостерігався швидкий спад струму (мал. 8 А, С-Д). В умовах перфорованого петчу кальцієвий струм

практично не змінювався на протязі 30-60 хвилин після створення конфігурації (мал.8 В, С-О).



Мал. 8. Зменшення високопорогового кальцієвого струму в умовах стандартного методу фіксації потенціалу на цілій клітині -1 і перфорованого петчу -2. А, В. Кальцієві струми в умовах 1, 2 відповідно. С. Залежність амплітуди струму від часу для методу 1-Δ та 2-О. Амплітуди струмів нормовані до початкових значень.

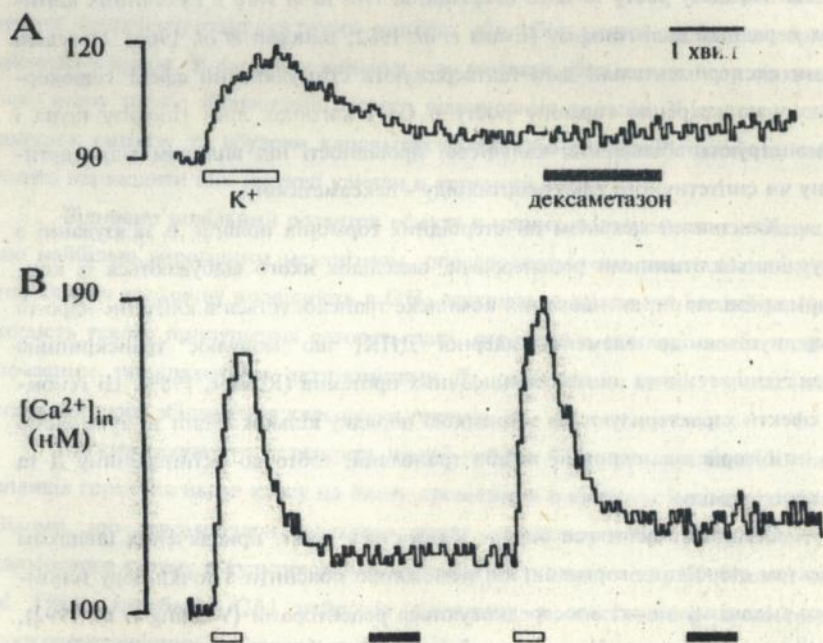
Використання методу перфорованого петчу дозволило нам попередити швидкий спад високопорогового компоненту кальцієвого струму та зареєструвати ефект глюкокортикоїдів на нього. Мал. 9 демонструє вплив тривалої аплікації дексаметазону на амплітуду L-струму, яка наведена в процентному відношенні до середнього початкового значення (125 пА). Ефект становив через 1 годину $54 \pm 31\%$ ($n=3$).



Мал. 9. Вплив аплікації дексаметазону на L-струм в умовах перфорованого петчу. Початок аплікації вказаний стрілкою.

Вплив аплікації дексаметазону на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію

Щоб відповісти на питання про існування швидкого ефекту глюкокортикоїдів проводилися вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію в GH_3 клітинах при аплікації дексаметазону. Короткочасна аплікація дексаметазону (1 мкМ, ~1 хвилини) не впливала на базальний рівень внутрішньоклітинного кальцію (мал. 10А). При цьому також не змінювалася амплітуда кальцієвої відповіді на деполяризацію клітини зовнішньоклітинним прикладенням гіперкалієвого розчину (100 мМ) (мал. 10В).



Мал. 10. Реєстрації внутрішньоклітинного кальцію при аплікації 1 мкМ дексаметазону. **А.** Відсутність ефекту дексаметазону на базальний рівень кальцію. **В.** Аплікація гормону не змінювала відповіді на деполяризацію гіперкалієвим розчином (100 мМ).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Більшість робіт, що мають за мету вивчення механізмів спряження стимул-секреція, пов'язана з дослідженням ролі змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) та потенціал-керованих кальцієвих каналів в цьому процесі. З одного боку, розглядається вплив речовин, що здатні модулювати секреторну активність, на $[Ca^{2+}]_i$ та кальцієву провідність мембрани клітин, а з іншого - вплив агоністів та антагоністів кальцієвих каналів на синтез та секрецію гормонів.

Раніше було показано, що гідрокортизон стимулює накопичення мРНК гормону росту та його секрецію *in vivo* та *in vitro* в пухлинних клітинах передньої долі гіпофізу (Evans *et al.* 1982; Bancroft *et al.* 1969). Наведені нами експериментальні дані підтверджують стимулюючий ефект гідрокортизону на секрецію гормону росту в GH_3 клітинах лінії гіпофізу щура і демонструють збільшення кальцієвої провідності під впливом гідрокортизону чи синтетичного глюкокортикоїду - дексаметазону.

Класичний механізм дії стероїдних гормонів полягає в зв'язуванні з внутрішньоклітинними рецепторами, внаслідок якого відбуваються їх конформаційні зміни; активований комплекс транслюкується в клітинне ядро та приєднується до елементу ядерної ДНК, що модулює транскрипцію визначених генів та синтез специфічних протеїнів (Rossier, 1989). Ці геномні ефекти характеризуються затримкою порядку кількох годин та чутливістю до інгібіторів транскрипції та/або трансляції, тобто до актиноміцину Д та циклогексимиду.

Останнім часом все більше з'являється робіт, присвячених швидким ефектам стероїдних гормонів, які неможливо пояснити з точки зору геномного механізму та які опосередковуються рецепторами (Wehling *et al.* 1992), відмінними від класичних цитозольних та/або ядерних (Arriza *et al.* 1987).

Наприклад, був виявлений швидкий ефект альдостерону на клітини моноядерних лейкоцитів людини (Wehling *et al.* 1991) та гладком'язові клітини кровеносних судин щурів (Moura & Worcel, 1984). В результаті була запропонована двофазна модель дії мінералкортикоїдів, в якій перший етап обумовлений зв'язуванням гормону з мембранним рецептором, що запускає

швидкі зміни в системі електролітного транспорту (Na^+/H^+ -обмінник) та проявляється через хвилини, а другий етап реалізується за геномним механізмом, що приводить до синтезу нових молекул Na^+/K^+ -АТФази і може бути зареєстрований через 1-2 години. Були показані участь протейкінази С та інозитолтрифосфату (IP_3), а також збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію на першому етапі (Wehling *et al.* 1994). Модель дії, запропонована для мінералкортикоїдів, має багато спільного з мембранними ефектами інших стероїдів (McEwen, 1991). Пізніше були описані значні варіації в механізмах дії кортикостероїдних гормонів на різні клітинні процеси (Joels & de Klet, 1992).

В основі ефекту збільшення кальцієвих струмів може полягати змінення функціонування окремих каналів або збільшення щільності працюючих каналів. У першому випадку - за рахунок збільшення часу відкритого стану та/або збільшення частоти відкривання каналів. У другому - за рахунок синтезу та вбудови каналних білків або регуляції протейнів, які здатні переводити вже існуючі канали в активний стан.

Відносно повільний розвиток ефекту в наших експериментах показує, що найбільш вирогідним механізмом, опосередковуючим вплив глюкокортикоїдів на кальцієву провідність в GH_3 клітинах, є геномний механізм. На користь такого припущення говорять дані, отримані в експериментах з одночасним прикладенням актиноміцину Д, оскільки в таких умовах не спостерігалось збільшення кальцієвих струмів.

Можна порівняти результати нашої роботи з іншими дослідженнями впливів гормонів цього класу на іонну провідність в клітинах інших тканин. Відомо, що дексаметазон індукував появу низькопорогового компоненту кальцієвого струму в культивованих клітинах кісткового мозку (Publicover *et al.* 1994). Інкубація CA1 нейронів гіпокампу з селективним агоністом глюкокортикоїдних рецепторів на протязі 2 годин призводила до значного збільшення кальцієвих потенціалів дії та кальцієвих струмів (Kerr *et al.* 1992). Це збільшення кальцієвої провідності блокувалося циклогексимідом, що доводить залежність ефекту від протейнового синтезу. Hayashi *et al.* (1991) показали, що дексаметазон збільшував вхід міченого $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у А7r5 гладком'язеві клітини кровоносних судин. Вхід іонів кальцію через дигідро-

піридин-чутливі кальцієві канали також блокувався інгібіторами протейнового синтезу. Щоправда, далі була виявлена блокуюча дія інгібіторів протейнінази С (ПКС) на цей ефект (Kato *et al.* 1992). На підставі наведених даних природньо припустити, що дексаметазон може безпосередньо впливати на синтез каналних білків або ініціювати синтез певних протейнів, здатних брати участь в активації ПКС.

Дійсно, функціонування високопорогових потенціал-керованих кальцієвих каналів L-типу залежить від рівня активності протейнінази. Оскільки ми спостерігали потенціювання обох компонентів кальцієвого струму, то даний ефект важко пояснити за рахунок фосфорилування каналних білків. До того ж, дослідження впливів активаторів ПКС на кальцієву провідність в GH_3 клітинах показали, що синтетичні аналоги діацилгліцеролу інгібують як T-, так і L-компоненти кальцієвого струму (Marghetti & Brown, 1988), а форболові ефіри пригнічують вхід іонів кальцію в клітину у відповідь на деполаризацію гіперкалієвим розчином (Tornquist & Tashjian, 1990; Naumes *et al.* 1992). Необхідно зазначити, що фосфорилування каналних білків може каталізуватися цикло-АМФ-залежною протейніназою (ПКА). Було показано, що введення каталітичної субодиниці протейнінази А в клітини або підвищення внутришньоклітинного рівня цАМФ викликало в GH_3 клітинах збільшення L-струму та сповільнення його інактивації (Armstrong & Eckert, 1987; Chad *et al.* 1987; Kalman *et al.* 1988). При цьому відбувалося стимулювання секреції пролактину (Murdoch *et al.* 1982; Delbeke *et al.* 1984; Rae *et al.* 1986; Sikdar *et al.* 1990). Як і у випадку активації ПКС, вказані ефекти рееструються на діалізованих клітинах і розвиваються на протязі кількох хвилин. Всі ці дані свідчать про те, що активація протейнінази С та А не може імітувати ефект збільшення густини обох компонентів кальцієвого струму та інгібування секреції пролактину, що спостерігалися в нашій роботі.

З кожним роком розширюється класифікація кальцієвих каналів, що базується на відмінностях у потенціалозалежності, фармакології та кінетики функціонування. Однак, функціональна роль такої різноманітності кальцієвих каналів недостатньо вивчена.

Вважають, що високопорогові L-канали, активні під час потенціалів дії чи в умовах суттєвої деполяризації клітини, можуть значно збільшувати $[Ca^{2+}]_i$, запускаючи секрецію та скорочення, а низькопорогові T-канали регулюють генерацію потенціалів дії в нейронах, серцевих пейсмерних клітинах та багатьох секреторних клітинах, що виявляють спонтанну електричну активність (White *et al.* 1989; Suzuki & Rogawski, 1989; Wang *et al.* 1991; Hagiwara *et al.* 1988).

Було показано, що в нормальних клітинах гіпофізу, секретуючих пролактин (лактотрофах) ч:1 гормон росту (соматотрофах), присутні обидва класи кальцієвих каналів. Проте вони по-різному представлені в цих типах клітин: густина L-струму практично однакова в лакотрофах (8.0 ± 4.0 пА/пФ) та соматотрофах (7.4 ± 4.4 пА/пФ), в той час як густина T-струму в лакотрофах (8.1 ± 6.0 пА/пФ) значно вища, ніж в соматотрофах (3.3 ± 1.8 пА/пФ) (DeRiemer, 1989). Оскільки лакотрофи характеризуються високим рівнем базальної секреції, було зроблено припущення про те, що два типи кальцієвих каналів в цих клітинах опосередковують два типи секреторної активності: базальний рівень секреції пролактину підтримується за рахунок активності низькопорогових кальцієвих каналів, а стимульована секреція запускається активацією високопорогових каналів (DeRiemer & Sakmann, 1986).

В наведених нами даних двогодинний вплив глюкокортикоїдів посилював секрецію гормону росту та паралельно призводив до потенціації обох типів потенціал-керованих кальцієвих каналів. Але ефект відрізнявся для низько- та високопорогового компонентів кальцієвого струму: збільшення густини останнього було набагато більшим. Це можливо відображає той факт, що саме L-канали, головним чином, відповідають за регуляцію секреції гормону росту. Проте, незважаючи на сильну потенціацію високопорогових струмів, секреція пролактину не тільки не стимулювалася, а натомість незначно пригнічувалася. Важко пояснити, чому збільшення кальцієвої провідності не супроводжувалось позитивним впливом на секрецію пролактину. Можливо, що існують принципові розбіжності в механізмах контролю за секрецією різних гормонів в GH_3 клітинах. На клітинах іншої лінії GH_4C_1 , також секретуючих і пролактин, і гормон росту, було

показано, що синтез кожного з цих гормонів по-різному регулюється на рівні транскрипції пептидними, стероїдними та тиреоїдними гормонами (Murdoch *et al.* 1985; Bancroft *et al.* 1985).

Той факт, що ми не спостерігали ефекту при аплікації гідрокортизону безпосередньо на діалізуєму клітину, говорить про сильну залежність дії гормону від цілісності внутрішньоклітинних процесів. Для ряду гіпофізарних клітин вже було показано, що внаслідок внутрішньоклітинної перфузії клітини втрачали здатність відповідати на тиротропін-рилізінг-гормон (ТРГ) (Velham, 1989). Kramer *et al.* (1991) використовували нистатин для вивчення інгібуючої дії ТРГ на кальцієвий струм в GH_3 клітинах без впливу екзогенних буферів на $[Ca^{2+}]_i$.

Використання методу перфорованого петчу дозволило нам попередити швидкий спад високопорогового компонента кальцієвого струму і зареєструвати вплив дексаметазону на нього. Характерний час розвитку ефекту - десятки хвилин. Нам не вдалося побачити швидкий ефект дексаметазону на рівень внутрішньоклітинного кальцію при аплікації гормону на клітину. Через це взаємодія глюкокортикоїдів зі структурами плазматичної мембрани в таких умовах уявляється малоімовірною.

Таким чином, наведені дані свідчать про те, що глюкокортикоїди ініціюють ланцюг біохімічних реакцій, в результаті яких посилюється секреція гормону росту та збільшується потік кальцію через потенціалкерзовані кальцієві канали. Результати роботи говорять на користь впливу глюкокортикоїдів за класичним механізмом дії стероїдних гормонів, що передбачає індукцію біосинтезу каналних білків внаслідок зв'язування гормону з цитозольними рецепторами і подальшої взаємодії гормон-рецепторного комплексу з генетичним апаратом клітини.

Вже відомо про гормональну регуляцію експресії генів іонних каналів на різних об'єктах (Boyle *et al.* 1987; Folander *et al.* 1990; Pragnell *et al.* 1990). Levitan *et al.* (1991) показали, що дексаметазон регулює рівень мРНК потенціал-керваного калієвого каналу в GH_3 клітинах. Зміни експресії різних типів кальцієвих каналів спостерігалися в первинній культурі меланотрофів при тривалій інкубації клітин з нейротрансмітером, що впливає на секрецію меланостимулюючого гормону (Cota & Hiriart, 1989) та в

GH₃ клітинах під дією β-естрадіолу (Ritchie, 1993). Це підтверджує отримані нами результати про важливу роль регуляції експресії іонних каналів в опосередкуванні гормонального контролю різних функцій клітин.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу фіксації потенціалу на цілій клітині в умовах щільного контакту показана наявність в мембрані клітин гіпофізу лінії GH₃ двох типів кальцієвих каналів: низькопорогового, який не інактивується (Т) та високопорогового, який інактивується (L). Струми через ці канали можна розділити підвищенням підтримуючого потенціалу.
2. В роботі був виявлений потенціюючий ефект природного глюкокортикоїду - гідрокортизону та синтетичного аналогу - дексаметазону на густини низько- та високопорогового компонентів кальцієвого струму в клітинах гіпофізу щура лінії GH₃.
3. Досліджена залежність збільшення густини обох компонентів кальцієвого струму від часу інкубації клітин в середовищі, що містило 1 мкМ глюкокортикоїдів. Максимальне збільшення спостерігалось при часі інкубації 2 години і складало 300% та 470% для Т- і L-струмів відповідно при дії гідрокортизону, і 280% та 440% - при дії дексаметазону.
4. Інкубація клітин з глюкокортикоїдами в концентрації 1 мкМ на протязі 1.5 години не впливала на параметри стаціонарної інактивації обох компонентів кальцієвого струму та сталої часу інактивації L-компоненту.
5. Отримана залежність доза-ефект для гідрокортизону при терміні інкубації 1 година. Максимальне збільшення густин низько- та високопорогового компонентів кальцієвого струму викликалось гормоном в концентрації 0.1 мкМ.
6. В роботі встановлено, що блокатор протеїнового синтезу на рівні транскрипції - актиноміцин Д в концентрації 0.1 мМ повністю пригнічує збільшення густин низько- та високопорогового компонентів кальцієвого струму, викликане інкубацією клітин з дексаметазоном (1 мкМ) на протязі 1 години.

7. Показано, що проявлення ефекту залежить від присутності цитоплазматичних компонентів. Збільшення кальцієвого струму не спостерігалось при аплікації гормонів на перфузуємі клітини в умовах стандартного методу фіксації потенціалу, але реєструвалося через десятки хвилин після початку аплікації дексаметазону при використанні перфорованого петчу. Отримані в роботі дані свідчать на користь геномного механізму дії глюкокортикоїдів на кальцієві струми GH_3 клітин.
8. Показано, що стимуляція секреції гормону росту супроводжується паралельним збільшенням густини L-струму в значно більшій мірі, ніж T-струму. Це може відображувати той факт, що саме L-канали, головним чином, відповідальні за регуляцію секреції гормону росту в GH_3 клітинах. Пригнічення секреції пролактину, що спостерігалася при цьому, свідчить про різні шляхи регуляції секреції різних гормонів в цих клітинах.

Перелік робіт, опублікованих за тематикою дисертації.

Фомина А.Ф., Седова М.Б. Увеличение плотности кальциевого тока в клетках линии гипофиза крысы под действием гидрокортизона // 2-ой Всесоюзный симпозиум "Теоретические и прикладные аспекты молекулярной биологии": Тез. докл. 1991.

Седова М.Б., Фомина А.Ф. Регуляція кальцієвої провідності в GH_3 клітинах під впливом глюкокортикоїдів // Конференція Львівського медичного інституту: Тези доп. - Львів, 1995.

P.G.Kostyuk, A.V.Kozlov, Z.Yu.Tkachuk, S.V.Viatchenko-Karpinski, M.B.Sedova, I.A.Mahailopulo, V.i.Kvasyuk and V.I.Teslenko. Effect of "core" 2',5'-oligoadenylates on the phosphorylation-depedent calcium channels in GH_3 cells //Україн. біохім. журн.-1995.-67, N 1.-С. 26-32.

A.F. Fomina, F.G. Kostyuk and M.B. Sedova. Glucocorticoids modulation of calcium currents in growth hormone 3 cells. // Neuroscience.-1993.-55, N 3.-P. 721-725.

В работе исследовалось влияние природного глюкокортикоида - гидрокортизона и синтетического аналога - дексаметазона на плотность кальциевых токов и секрецию гормона роста и пролактина в клетках гипофиза крысы линии СH₃. При использовании метода фиксации потенциала на целой клетке в условиях плотного контакта было показано, что в мембране этих клеток присутствует два типа кальциевых каналов: низкопороговый инактивирующийся (Т) и высокопороговый неинактивирующийся (L), которые могут быть разделены повышением уровня поддерживаемого потенциала. Инкубация клеток на протяжении 2 часов в среде, содержащей 10^{-6} М гидрокортизона, приводила к стимуляции секреции гормона роста на 44% и подавлению секреции пролактина на 10%. Одновременно наблюдалась потенциация низко- и высокопороговых кальциевых токов. Максимальное увеличение плотностей обоих компонентов тока вызывалось двухчасовой инкубацией и составляло 300% и 470% для Т- и L-токов соответственно при действии гидрокортизона, 280% и 440% - при действии дексаметазона. При этом не наблюдалось изменения положения максимумов вольт-амперных характеристик, параметров стационарной инактивации обоих компонентов тока и постоянной времени инактивации высокопорогового компонента. Получена концентрационная зависимость влияния гидрокортизона при времени инкубации с гормоном 1 час. Максимальное увеличение плотностей обоих компонентов тока вызывалось гормоном в концентрации 10^{-7} М. Добавление 10^{-4} М актиномицин Д - блокатора протенинового синтеза на уровне транскрипции - одновременно с дексаметазоном в инкубационную среду полностью подавляло эффект. Аппликация глюкокортикоидов на диализированную клетку не изменяла естественного спада высокопорогового компонента кальциевого тока. Использование метода перфорированного пэтча позволило сохранить цитоплазматические компоненты и зарегистрировать увеличение L-тока через десятки минут после начала аппликации дексаметазона. Кратковременная аппликация дексаметазона (1 мин) не изменяла базального уровня внутриклеточного кальция и ответа на деполяризацию клетки внеклеточным приложением гиперкальцевого раствора.

Clonal malignant pituitary GH₃ cells were used for the analysis of glucocorticoid modulation of calcium permeability. We studied the influence of hydrocortisone and dexamethasone on voltage-gated calcium currents and hormone secretion. The whole-cell patch-clamp technique and perforated patch-clamp were used. We shown the presence of low-threshold inactivating (T) and high-threshold persisting (L) components in the total calcium current which could be separated at less negative holding potential level. The growth hormone secretion (measured by radioimmunoassay method) was increased by 44% after 2 h of incubation in the presence of 1 μ M hydrocortisone, while the secretion of prolactin was slightly depressed (10%). Incubation of GH₃ cells in the solution containing 1 μ M hormone led to an increase in current densities, that was maximal for both types of currents after 2 h exposure of cells. The elevation of the HT current densities was significantly higher (more than a 4-fold) than that of LT ones (about a 3-fold). We measured the dose-dependence of hydrocortisone effect after 1 hour exposure of cells. The elevation of both types of Ca current densities was clearly discernible with 10⁻⁷ M hydrocortisone. Parameters of current inactivation and current-voltage dependence were unaffected. Potentiation of currents was blocked by adding 0.1 mM actinomycine D, suggesting that protein synthesis was required for this effect. The stimulatory action of dexamethasone on HT current was observed under conditions of perforated patch clamp recording (T = 29°C) after 20-30 min from the beginning of hormone application to the bath solution but disappeared with the whole-cell patch technique used. Application of dexamethasone did not influence the basal level of intracellular calcium and calcium transient evoked by high concentration of external potassium. The presented experiments suggest an important role of the regulation of genomic expression of voltage-gated ion channel in glucocorticoids effects on pituitary cells.

AB 32.823

AB 32.823