

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

КИРИЩУК СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ

**МЕХАНІЗМИ ГЕНЕРАЦІЇ КАЛЬЦІЄВИХ СИГНАЛІВ У
ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ
СИСТЕМИ**

(експериментальне дослідження)

03.00.05 - БІОФІЗИКА

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1996

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00740457 (R)

AB 34.457

Роботу виконано в Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця Національної Академії наук України

Консультанти : академік, доктор біологічних наук
Костюк Платон Григорович
доктор медичних наук,
Верхратський Олексій Несторович

Офіційні опоненти: академік, доктор медичних наук
Шуба Михайло Федорович;
доктор біологічних наук,
Малишева Маргарита Костянтинівна
доктор фізико-математичних наук
Тесленко Віктор Іванович

Провідна установа: Інститут фізіології при Київському університеті ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться "7" травня 1996 року о 14⁰⁰ годині
на засіданні спеціалізованої ради Д - 01.13.01 при Інституті фізіології
ім.О.О.Богомольця Національної Академії наук України за адресою:
252024, м.Київ, вул. Богомольця, 4.

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

Автореферат розісланий "4" вітня 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Внутрішньоклітинний іонізований кальцій є одним з найбільш універсальних регуляторів функціонування клітин. У стані спокою концентрація клітинного іонізованого кальцію $[Ca^{2+}]_i$ утримується на низькому рівні (10^{-7} моль/л, у позаклітинному середовищі - 10^{-3} моль/л). Зміни $[Ca^{2+}]_i$ контролюють найважливіші цитоплазматичні процеси, які є основою збудливості, секреції, пластичності, метаболічних процесів та регуляції функціонування генетичного апарату. Постійна і точна регуляція внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію як у стані спокою, так і під час клітинної активності забезпечується функціонуванням клітинних структур - внутрішньоклітинних (внутрішньоклітинні кальцієві депо та мітохондрії) та розташованих на плазматичній мембрані (кальцієві канали, кальцієві насоси та система натрій-кальцієвого обміну).

Основні параметри цих механізмів інтенсивно досліджуються протягом останніх десятиріч. Поява найсучасніших методів, як електрофізіологічних - фіксація ізольованої частини клітинної мембрани (patch-clamp), так і оптичних - флуоресцентні індикатори та конфокальна техніка, значно прискорила вивчення функціонування структур, які регулюють $[Ca^{2+}]_i$. Однак, онтогенетична регуляція і взаємозв'язок цих структур потребують подальших досліджень. Необхідно також підкреслити, що левова частка експериментів виконується на нервових клітинах та м'язах. В той же час інформація про функціонування механізмів, які відповідають за регуляцію внутрішньоклітинного кальцію у гліальних клітинах, що вважали за пасивний, структуральний елемент мозку, у світовій літературі дуже обмежена.

Мета та завдання дослідження. Мета роботи полягала у дослідженні систем, які регулюють $[Ca^{2+}]_i$, у трьох основних типах гліальних клітин центральної нервової системи - олігодендроцитах, астроцитах та мікроглії.

Для досягнення мети визначені такі завдання:

1. Розробити методики вимірювання внутрішньоклітинної концентрації

іонів кальцію гліальних клітин центральної нервової системи у культуральних умовах та у тонких зрізах мозку.

2. Дослідити особливості функціонування кальцієвих каналів плазматичної мембрани протягом онтогенетичного розвитку гліальних клітин.

3. Дослідити особливості функціонування внутрішньоклітинних кальцієвих депо гліальних клітин.

4. Розробити схему взаємодії механізмів, що регулюють внутрішньоклітинну концентрацію іонізованого кальцію, в основних типах клітин нейрогліальної лінії центральної нервової системи.

Наукова новизна роботи.

Доведено, що протягом онтогенетичного розвитку клітин олігодендроцитарної лінії відбуваються зміни як репертуару експресованих кальцієвих каналів плазматичної мембрани, так і їх розподілу на мембрані.

Вперше досліджені внутрішньоклітинні кальцієві депо у клітинах олігодендроцитарної лінії та виявлена залежність їх функціонування від фази розвитку.

Вперше показано, що розподіл активних мітохондрій у цих клітинах залежить від фази онтогенетичного розвитку.

Вперше досліджені кальцієві депо клітин астрогліальної лінії у тонких зрізах мозку. Доведена залежність функціонування цих депо від рівню внутрішньоклітинного кальцію.

Показано існування та функціональну роль ріанодин-чутливих кальцієвих депо у клітинах астроцитарної лінії у тонких зрізах мозку.

Вперше показано існування та фізіологічну роль системи натрій-кальцієвого обміну та мітохондрій астроцитів у тонких зрізах мозку.

Досліджені кальцієві депо у клітинах мікроглії. Доведено, що звільнення кальцію з цих кальцієвих резервуарів, призводить до відкриття специфічних кальцієвих каналів плазматичної мембрани.

Показано, що основними системами, котрі відповідають за зниження

рівню кальція до базального, є кальцієві насоси : плазматичної мембрани та внутрішньоклітинні. При цьому роль насосів плазматичної мембрани, які виводять кальцій у позаклітинне середовище, - домінуюча, що може бути основою нейрон-гліальної взаємодії.

Практична цінність роботи. Отримані нові принципові результати про функціонування та взаємозв'язок механізмів регуляції кальцію у клітинах нейрогліальної лінії, що може мати принципове значення у дослідженнях роботи мозку та корекції порушень функціонального стану центральної нервової системи.

Апробація роботи. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на семінарах Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Європейській конференції з гліальних клітин (Гайдельберг, 1993), Всесвітній конференції фізіологічних товариств (Глазго, 1993), Конференції Європейської асоціації з нейронаук (Відень, 1994), Конференціях фізіологічного товариства Великої Британії (Бірмінгем, 1994; Бристоль, 1996), Конференції фізіологічного товариства Німеччини (Готtingен, 1995), Конференції нейрофізіологічного товариства Німеччини (Берлін, 1996), семінарах у наукових установах Великої Британії та Німеччини.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 23 роботи.

Обсяг та структура роботи. Дисертація викладена на 253 сторінках, ілюстрована 4 таблицями та 79 малюнками, складається зі вступу, огляду літератури, викладення методик досліджень, трьох глав результатів, обговорення результатів, висновків та списку цитованої літератури, який вміщує 263 джерел.

ЗМІСТ РОБОТИ

Методи та об'єкти досліджень

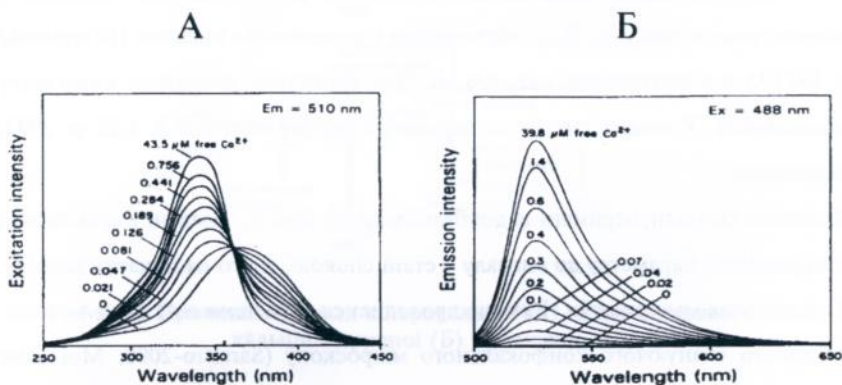
Культуральні клітини. Для дослідів були використані культуральні клітини мікроглії та олігодендроцитів. Методики виділення та культивування клітин

схожі. Фрагменти мозку обробляли 0.1 % розчином трипсину на протязі 15 хвилин за температури 35 °C. Після чого клітини переносили у культуральне середовище DMEM, до якого додавали 10 % сироватки великої рогатої худоби, та поміщали у CO₂ інкубатор (газове середовище 5 % CO₂ + 95% O₂, температура 37 °C). За 4-5 днів нейрони знищувались імуноцитолізом. Клітини - мікроглію чи олігодендроцити, що знаходилися на поверхні моношара астроцитів, потрушуванням переводили у суспензію. Отримана суспензія переносилась у нові чашки Петрі та поміщалась у інкубатор. Культуральні клітини використовувались для дослідів протягом наступних 5-10 діб.

Тонкі зрізи мозку. Експерименти були проведені на зрізах мозочку мишей лінії NMRI віком від 5 до 45 діб. Після декапітації мозок занурювали у холодний фізіологічний розчин (0-4 °C) та вирізали мозочок. Отриманий об'єкт прикріплювали поліакріламідним клеєм до підложки камери вібротома, також заповненої холодним фізіологічним розчином. За допомогою мікротома нарізали сагтальні слайси товщиною 150-200 мкм. Після цього тонкі зрізи переносили у карбонатний фізіологічний розчин кімнатної температури, постійно газований карбогеном (5 % CO₂ + 95% O₂). Отримані зрізи мозочку використовувались для дослідів протягом 4-6 годин.

Імунологічні методи. Роботами професора М. Шахнер було показано, що за допомогою специфічних антитіл (так званої O серії) можна ідентифікувати різні стадії розвитку олігодендроцитів. У всіх дослідах, проведених на культурі олігодендроцитів, до початку експерименту клітини інкубували протягом 15-20 хвилин у фізіологічному розчині, збагаченому відповідним антитілом, яке було з'єднане з люмінофором родаміном. Перед вимірами у флуоресцентному світлі (родамін поглинає зелене світло, а випромінює - червоне) відбирали для досліджень клітини на різних стадіях розвитку : O4-негативні - клітини-попередники, O4-позитивні - молоді олігодендроцити та O10-позитивні - зрілі олігодендроцити. Назви були запропоновані у роботах М.Шахнер і ми будемо дотримуватися цієї номенклатури.

Електрофізіологічні методи. Розроблена Hammil, Neher & Sackmann (1981) методика електричної ізоляції фрагмента клітинної мембрани (patch-clamp) є провідною у дослідженні іонних струмів. У дослідях, викладених у цій роботі, була використана конфігурація whole-cell цієї методики. Пипетки, виготовлені із молібденового скла, мали електричний опір 3-5 МОм. Електричний опір шунта між мембраною клітин та пипеткою був не менше 5 ГОм. Реєстрації проводилися за допомогою підсилювача EPC-7 чи EPC-9 (List Electronic, Німеччина) та персонального комп'ютера. Для обробки була використана програма TIDA, розроблена групою Кетенмана, Гайдельберг, Німеччина.



Мал. 1. Флуоресцентні спектри барвників fura-2 (А) та fluo-3 (Б).

Флуоресцентні індикатори. Синтез хімічних з'єднань, що реагуючи з фізіологічними іонами, змінюють свої оптичні характеристики, призвів до значного прогресу у питаннях, пов'язаних з роллю цих іонів у функціонуванні клітин. Флуоресцентні зонди можна поділити на дві великі категорії: дво- та однохвильові. Останні при з'єднанні з іоном міняють тільки інтенсивність флуоресценції. З їх допомогою не можливо проводити кількісні виміри, оскільки оптичний сигнал є функцією як концентрації іонів, так і, наприклад, концентрації індикатору.

Двохвильові індикатори, з'єднуючись с іоном, змінюють свій спектр збудження (наприклад, fura-2) чи випромінення (наприклад, indo-1). Одночасне вимірювання сигналів, характерних для незв'язаної та зв'язаної форми зонду, дає змогу розрахувати дійсну концентрацію іонів.

На малюнку 1 зображені спектри збудження кальцієвих зондів fura-2 та fluo-3. При роботі з fura-2 були використані хвилі 360 та 380 нм для ініціації флуоресценції, виміри проводилися на довжині хвилі 510 нм. Концентрацію кальцію розраховували за формулою :

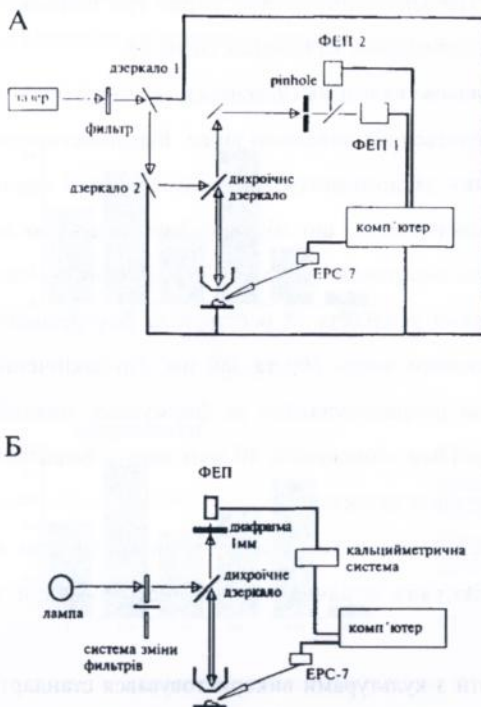
$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

де R - відношення флуоресцентних сигналів, виміряних при збудженні світлом 360 і 380 нм, R_{min} - відношення у розчині з високою (10 мкмоль/л) концентрацією кальцію, R_{max} - відношення у середовищі с низькою (10 мкмоль/л EGTA) концентрацією кальцію, $K_d * \beta$ - константа дисоціації комплексу кальцій-fura. У наших умовах ці параметри дорівнювали - 0.2, 1.25 та 2992, відповідно.

Кальцієві сигнали, отримані за допомогою зонду fluo-3, наведені у відношенні вимірюемого параметру до сигналу у стані спокою, тобто на початку досліду.

Експериментальні методи. Виміри проводилися за допомогою двох методів: лазерного скануючого конфокального мікроскопу (Sarastro-2000, Molecular Dynamics, USA) та одноканальної двоухвильової кальцієвої системи (мал.2 презентує принципові схеми).

Конфокальна техніка. Лазерна конфокальна скануюча мікроскопія (ЛКСМ) базується на використанні лазера для збудження зонду, що дає можливість індукувати флуоресценцію в об'ємі меншому за 1 мкм^3 , і можливості фокусувати лазерний промінь у довільній точці тримірного простору. На той же час, сканування відбувається послідовно, тобто точка за точкою, і отримання тримірної структури клітини потребує часу (приблизно 1 хвилина). Сканування виключно фокальної площини ($256 * 256$ пікселів) потребує 5 сек. Надається також можливість сканувати одну чи декілька ліній у фокальній площині, що забезпечує бистротю - 128 пікселів (одна лінія) у 10 мсек.



Мал.2 Принципові схеми конфокальної (А) та двохвильової кальційметричної (Б) установок.

Тримірна мода була використана тільки задля реконструкції тримірної структури гліальних клітин у тонких зрізах мозку. Це значно полегшує їх ідентифікацію. Основні виміри проводились у режимі сканування фокальної площини; сканування лінії було використане для вимірювань швидких, неоднорідних у просторі процесів.

Параметри лазера, наявного у нашому випадку, не дозволяли проводити досліді з використанням двохвильових кальцієвих зондів, тому всі експерименти були проведені з індикатором fluo-3. На початку кожного експерименту проводилося сканування у вертикальному напрямку і знаходилася найкраща позиція для

фокальної площини. По закінченні досліду перші три цифрові зображення використовували для нормування кальцієвих сигналів.

Однодетекторна двохвильова кальцієва система. Оптична частина цієї методики принципово не відрізняється від наведеної вище. Відмінність полягає в тому, що у данному випадку за допомогою кальційметричної системи можна змінювати довжину хвилі світла, що збуджує флуоресценцію зонду fura-2. Відповідні фільтри були змонтовані на колесі, що крутилося з частотою 5 Гц. Кальційметрична система розділяла та реєструвала флуоресцентні сигнали, котрі відповідали довжинам хвиль 360 та 380 нм. По закінченні реєстрації концентрація кальцію розраховувалась за формулою, наведеною вище. Діафрагма розміром у 1 мм обмежувала 40 мкм зону у фокальній площині, сигнал від якої реєструвався детектором.

За допомогою цієї методики ми мали змогу робити кількісні виміри змін концентрації кальцію, але втрачали можливість вивчати просторові неоднорідності.

Розчини. Під час роботи з культурами використовувався стандартний розчин (у ммоль/л): NaCl - 150, KCl - 5.4, CaCl₂ - 2.5, MgCl₂ - 1, HEPES-NaOH - 10, глюкоза - 10 (pH=7.4). Для тонких зрізів (у ммоль/л): NaCl - 125, KCl - 3, CaCl₂ - 2.5, MgCl₂ - 1, NaHCO₃ - 26, KH₂PO₄ - 1.8, глюкоза - 10 (pH=7.4). У безкальцієвому розчині кальцій було замінено на магній та додано 1 ммоль/л EGTA. У розчинах з підвищеною концентрацією калію - відповідна частка натрію замінювалась на калій.

При діалізі клітин був використаний внутрішньопипеточний розчин (у ммоль/л): KCl - 130, MgCl₂ - 1, АТФ-Mg - 2, HEPES-KOH - 10 (pH=7.2), який містив також, якщо не вказано інше, 200 мкмоль/л fura-2 або fluo-3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

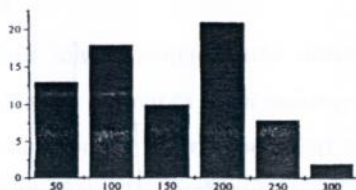
I. Рівень концентрації іонів кальцію у гліальних клітинах центральної нервової системи

На відміну від нейронів, які мають досить стабільний рівень $[Ca^{2+}]_i$ у

стані спокою, рівень концентрації іонів кальцію в усіх трьох типах гліальних клітин знаходився у широкому діапазоні (від 30 до 300 нмоль/л, мал. 3). Різниця рівня $[Ca^{2+}]_i$; не впливала на потенціал спокою клітин, який завжди знаходився

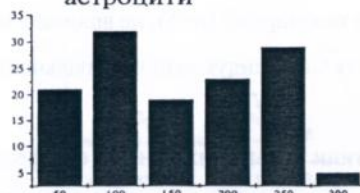
А

олігодендроцити



Б

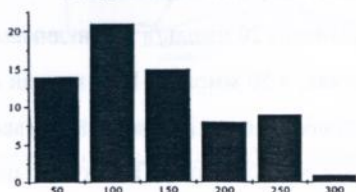
астроцити



Мал.3 Гістограми розподілу внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гліальних клітинах ЦНС у стані спокою.

В

мікроглія

 $[Ca^{2+}]_i$

у діапазоні -80 - -60 мВ. Це дає змогу стверджувати, що така варіабельність не є наслідком процедури препарування. Цілком можливо, що гліальні клітини приймають участь у регулюванні позаклітинної концентрації не тільки калію, але також і кальцію.

II. Кальцієвий гомеостаз у клітинах олігодендроцитарної лінії

2.1 Потенціал-залежні кальцієві канали

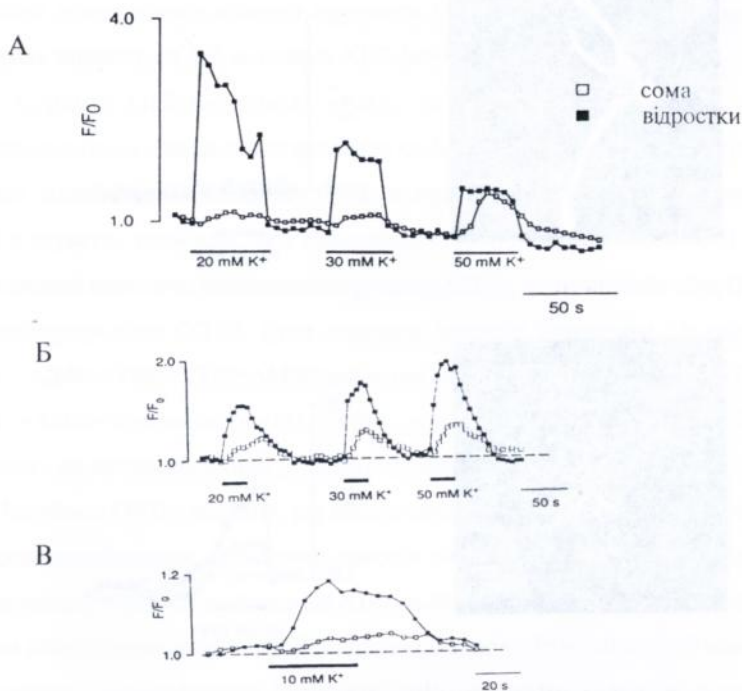
Деполяризація мембран клітин олігодендроцитарної лінії аплікацією розчину з підвищеною концентрацією іонів калію (50 ммоль/л) викликала підвищення $[Ca^{2+}]_i$. Кальцієвий транз'єнт зникав у безкальцієвому розчині ($n=12$) та блокувався 100 мкмоль/л верапамілу ($n=7$). Це дає змогу стверджувати, що підвищення $[Ca^{2+}]_i$ відбувається внаслідок активації потенціал-залежних кальцієвих каналів. Інкубування клітин у розчині, що містив 100 мкмоль/л ріанодину ($n=8$) або 0.5 мкмоль/л тапсігаргіну ($n=5$), не впливало на кальцієвий транз'єнт, що вказує на відсутність Ca^{2+} -індукованого вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо.

Щоб з'ясувати, які саме типи кальцієвих каналів експресуються, були використані розчини з різною концентрацією кальцію (10, 20, 30, 50 ммоль/л). При цьому слід відмітити, що клітини-попередники та зрілі олігодендроцити (ОЛЦ) по-різному відповідали на калієву деполяризацію.

У клітинах-попередниках аплікація 20 ммоль/л K^+ викликала підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ виключно у відростках, а 50 ммоль/л K^+ - по всій клітині, хоча амплітуда відповіді у сомі була приблизно у півтора рази менша (1.6 ± 0.3 , $n=27$, мал.4). Аплікація 50 мкмоль/л Ni^{2+} , блокатора Т-типу кальцієвих каналів, зменшувала амплітуду кальцієвого транз'єнта, який був індукований 20 ммоль/л K^+ , у відростках у 1.6 ± 0.2 рази ($n=7$), не впливаючи на відповідь у сомі. Кальцієвий сигнал, який був викликаний 50 ммоль/л K^+ , збільшувався у розчині, що містив 1 мкмоль/л ВАУ К 8644 ($n=4$), і пригнічувався у присутності 10 мкмоль/л нифедіпіну ($n=5$). Таким чином, можна стверджувати, що у клітинах-попередниках експресовані два типи кальцієвих каналів, а саме, Т- та L-типи.

У зрілих ОЛЦ аплікація 50 мкмоль/л Ni^{2+} не впливала на кальцієві транз'єнти, які були індуковані калієвою деполяризацією. Але вони

потенціювались у розчині, що містив 1 мкмоль/л ВАУ К 8644 ($n=7$), і зменшувались у присутності 10 мкмоль/л нифедіпіну ($n=6$). Амплітуди були завжди більші у відростках ($y 2.0 \pm 0.3$, $n=43$). Таким чином, можна стверджувати, що у зрілих ОЛЦ експресовано L-тип кальцієвих каналів (мал.4). Слід також



Мал.4 Кальцієві відповіді, викликані калієвою деполяризацією у клітинах-попередниках (А) та олигодендроцитах (Б,В).

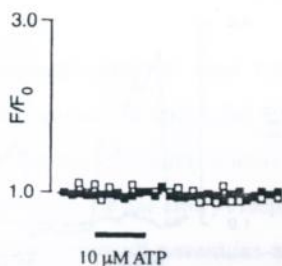
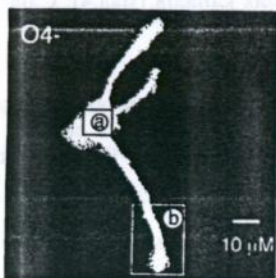
завважити, що навіть деполяризація 10 ммоль/л K^+ викликала підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відростках зрілих ОЛЦ ($n=3$, мал.4).

2.2 Внутрішньоклітинні кальцієві депо

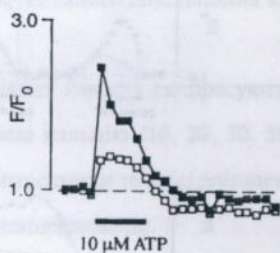
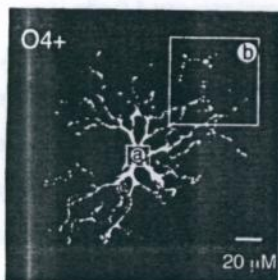
2.2.1 Інозітолтрифосфат-чутливе кальцієве депо

Аплікація 100 мкмоль/л АТФ викликала підвищення внутрішньоклітинної

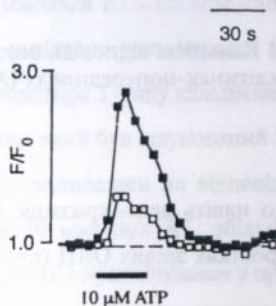
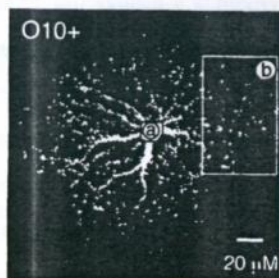
A



B



C



Мал.5 АТФ-індуковані кальцієві відповіді у клітинах-попередниках (А), молодих (В) та зрілих (С) олігодендроцитах (а-сому, в-відростки).

концентрації іонів кальцію у зрілих ОЛЦ, але не в клітинах-попередниках (на

мал.5 приведені морфологічні та кальційметричні дані). При цьому, як і у випадку з кальцієвими каналами, відповідь у сомі була значно менша за амплітудою у порівнянні з транзйентом у відростках (у 2.2 ± 0.5 рази, $n=35$). Аплікацією розчинів, які містили різні концентрації АТФ, було з'ясовано, що порогова концентрація агоніста становить 1 мкмоль/л, а напівмаксимальна відповідь ініціюється 5-7 мкмоль/л АТФ ($n=17$).

Сурамін (100 мкмоль/л) - мало специфічний блокатор P_2 -типу пуринорецепторів - зменьшував амплітуду кальцієвого сигналу на $90 \pm 9\%$ ($n=21$), що дає змогу стверджувати, що ОЛЦ експресують якийсь із P_2 -рецепторів. Щоб з'ясувати, який саме тип пуринорецепторів експресовано у ОЛЦ були протестовані аденозин, аденозинмонофосфат (АМФ), аденозиндифосфат (АДФ) та урідінтрифосфат (УТФ). Були отримані наступні результати : у клітинах кори - АДФ > АТФ >> УТФ = АМФ = аденозин ($n=12$), у ретині - УТФ > АТФ >> АДФ = АМФ = аденозин ($n=14$). Тобто, рецептор, експресований у ОЛЦ, належить до метаботропних P_{2Y} та P_{2U} пуринорецепторів.

Інкубація ОЛЦ у розчині, що містив тапсігаргін (10 мкмоль/л) - блокатор внутрішньоклітинних кальцієвих насосів ендоплазматичного ретикулуму, пригнічувала кальцієву відповідь на АТФ на $80 \pm 13\%$ ($n=15$). Більш того, діаліз клітин олігодендроцитарної лінії розчином, до якого було додано 10 мкмоль/л гепарину - специфічного інгібітора $InsP_3$ -чутливого кальцієвого каналу ендоплазматичного ретикулуму, також призводив до блокування кальцієвого транзйента ($n=7$). Діаліз нормальним внутрішньоклітинним розчином не впливав на реакцію ($n=7$).

Задля перевірки можливого культурального артефакту ряд дослідів було проведено на тонких зрізах мозку. Як і в культурі, аплікація АТФ викликала кальцієвий транзйент виключно у зрілих ОЛЦ і не впливала на рівень $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах-попередниках ($n=12$).

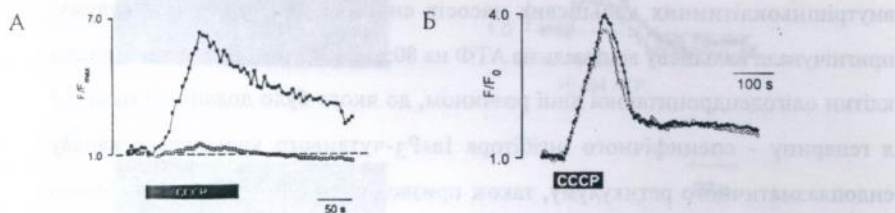
Наведені результати вказують на те, що аплікація АТФ призводить до активації метаботропних рецепторів, синтезу інозітолтрифосфату та вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо.

2.2.2 Ріанодин-чутливе кальцієве депо

Ні аплікація кофеїну (до 40 ммоль/л, $n=15$), ні ріанодину (до 100 мкмоль/л, $n=17$) не викликали зміни рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Кальцієві транзєнти, які індукувалися калієвою деполяризацією чи АТФ, також не були модульовані. Це дає можливість вважати, що клітини олігодендроцитарної лінії практично не експресують ріанодинових рецепторів і, як результат, ріанодин-чутливе депо не приймає участі у регуляції $[Ca^{2+}]_i$.

2.2.3 Мітохондрії

Для дослідження розподілу мітохондрій у клітинах олігодендроцитарної лінії був використаний специфічний флуоресцентний маркер родамін 123. 10-хвилинна інкубація клітин у розчині, що містив 1 мкмоль/л родаміну 123 показала, що у клітинах-попередниках мітохондрії концентруються майже



Мал.6. Кальцієві транзєнти, викликані аплікацією мітохондріального блокатора CCCP у клітинах-попередниках (А) та зрілих олігодендроцитах (Б). Пусті символи - сома, заповнені - відростки.

виключно у відростках, а у зрілих ОЛЦ - розподіляються однорідно. Аплікація 10 мкмоль/л CCCP ($n=17$) - блокатора мітохондріального транспорту протонів - викликала значне підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$, що говорить за те, що мітохондрії мають значну кількість зв'язаного кальцію. Однак, як і у випадку з родаміном 123, у клітинах-попередниках кальцієвий транзєнт виникав лише у відростках, а в зрілих ОЛЦ - по всій клітині (мал. 6). Базуючись на наведених даних,

можна вважати, що у молодих ОЛЦ мітохондрії зосереджені виключно у відростках. Однак, спроба перевірити це твердження за допомогою електронної мікроскопії показала, що і кількість, і морфологія мітохондрій однорідні по всій клітині. Таку розбіжність результатів можна пояснити тим фактом, що і родамін 123, і СССР реагують з мітохондріями, що мають низький потенціал мембрани (-200 мВ) - "активні" мітохондрії. Базуючись на цьому факті, можна стверджувати, що у клітинах-попередниках "активні" мітохондрії розташовані у відростках, а у зрілих ОЛЦ - їх розподіл однорідний.

2.3. *Механізми вилучення іонів кальцію*

Для функціонування клітин принциповим є не тільки можливість підвищувати рівень $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на стимул, але й відновлювати рівень спокою. У наших дослідях кальцієві транзєнти були викликані аплікацією розчину, який містив 50 ммоль/л KCl.

Інкубування клітин у розчині, що містив або 10 мкмоль/л СССР (n=12), або 10 мкмоль/л рїанодину (n=11), не впливала на кінетики кальцієвих відповідей. Аплїкація безнатрієвого розчину (еквімолярна заміна на NMDG) (n=6) не змінювала ні рівень $[Ca^{2+}]_i$, ні кінетику кальцієвих транзєнтів, які були індуковані калїєвою деполїризацією. Наведені дані вказують на те, що роль мітохондрїй, рїанодин-чутливого депо та системи натрїй-кальцієвого обміну у відновленні базального рївню $[Ca^{2+}]_i$ незначна.

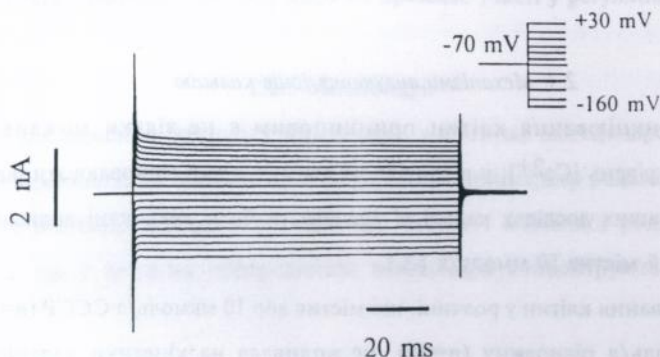
Зовнїшньоклітинна аплікація 3 ммоль/л La^{3+} - антагонїсту кальцієвих насосів плазматичної мембрани - уповільнювала процес відновлення базового рївня $[Ca^{2+}]_i$ у 5-7 разів (n=12). Тапсїгаргїн (10 мкмоль/л) також викликав зниження швидкості цього процесу (1.5 ± 0.2 , n=8). Таким чином, основне значення у відновленні базального рївню $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах олігодендроцитарної лїнії вїдїграють кальцієві насоси плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму.

III. Кальцієвий гомеостаз у клітинах Бергманівської глії мозочка

3.1 Плазмалемальні кальцієві канали

Клітини Бергманівської глії (БГ), які належать до астроцитів, мають високий рівень пасивної калієвої провідності і не експресують потенціал-залежних, у тому числі кальцієвих, каналів (мал.7).

На той же час, аплікація кайнату (100 мкмоль/л) викликає значне



Мал. 7. Клітини Бергманівської глії не експресують потенціал-залежних каналів.

підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ (до 500 нмоль/л). Ефект кайнату блокувався у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині та додаванням 10 мкмоль/л CNQX - специфічного інгібітора АМРА/КА типу глутаматних іонотропних рецепторів. Таким чином, можна сказати, що БГ експресує іонотропний глутаматний рецептор, який являє собою неспецифічний канал, крізь який проходять іони Na^+ , Ca^{2+} та K^+ . Фракціональна провідність цього каналу для іонів кальцію становить 2-3 %.

3.2 Внутрішньоклітинні кальцієві депо

3.2.1 Інозітолтрифосфат-чутливе кальцієве депо.

Як показано у табл.1, крім вищезгаданного кайнату, АТФ, гистамін

та адреналін викликали підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах БГ. Приклади кальцієвих транз'єнтів, які були індуковані цими речовинами, приведені на мал.8.

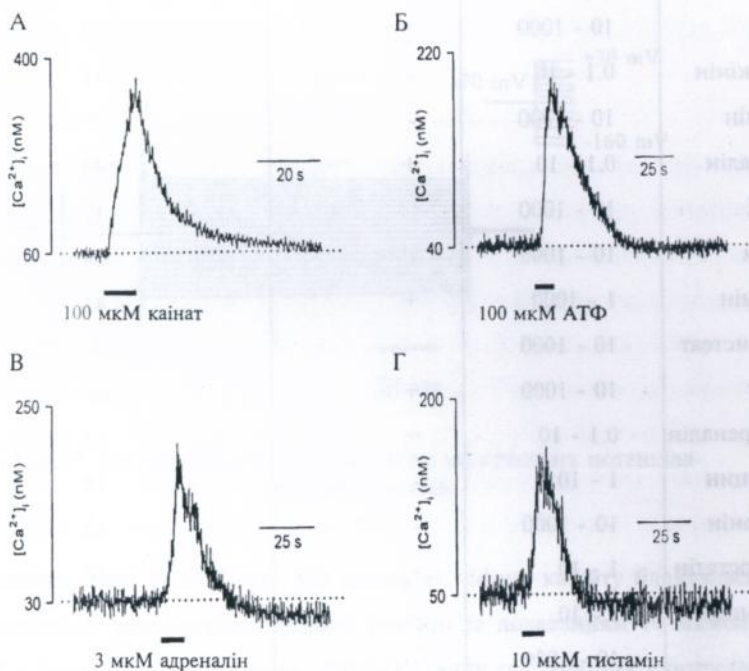
Таблиця 1.

	Концентрація	$[Ca^{2+}]_i$	Число клітин
Аспарат	10 - 1000	-	9
АТФ	10 - 1000	+	37
Брадикінін	0.1 - 10	-	11
Допамін	10 - 1000	-	9
Адреналін	0.1 - 10	+	44
ГАМК	10 - 1000	-	12
Гліцин	10 - 1000	-	14
Гистамін	1 - 1000	+	41
Гомоцистеат	10 - 1000	-	8
Каїнат	10 - 1000	+	51
Норадреналін	0.1 - 10	+	15
Оксітоцин	1 - 10	-	18
Серотонін	10 - 1000	-	12
Соматостатін	1 - 10	-	10
Субстанція Р	1 - 10	-	11
Таурін	10 - 1000	-	7
Вазопресін	1 - 10	-	15

Щоб з'ясувати механізм, за рахунок якого вищезгадані агоністи ініціюють кальцієвий сигнал, були проведені наступні тестові досліді. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації, викликані аплікацією АТФ, адреналіна чи гистаміна, не змінювалося при заміні зовнішньоклітинного розчину на розчин, що містив 1 мкмоль/л ТТХ, 10 мкмоль/л бікукуліна - блокатора ГАМК-

рецепторів та 10 мкмоль/л CNQX - інгібітора кайнатних рецепторів. Базуючись на цих даних, можна вважати, що АТФ-, адреналін- та гистамін-індукований зріст $[Ca^{2+}]_i$ виникають внаслідок активації рецепторів, експресованих клітинами БГ.

Аплікації зростаючих концентрацій відповідних агоністів дали можливість побудувати криві доза-відповідь. Для адреналіну порогова концентрація



Мал. 8 Кайнат-, АТФ-, адреналін- та гистамін-індуковані кальцеві відповіді у клітинах Бергманівської глії у тонких зрізах мозку.

дорівнювала 0.3 мкмоль/л, а 3 мкмоль/л викликала кальцевий транзйент напівмаксимальної амплітуди. Для гистаміну ці параметри дорівнювали 1 мкмоль/л та 30 мкмоль/л, відповідно. Для АТФ - 1 мкмоль/л та 50 мкмоль/л.

Для визначення типу пурино-, адрено- та гистаміно-рецепторів були перевірені специфічні агоністи та антагоністи відповідних рецепторів.

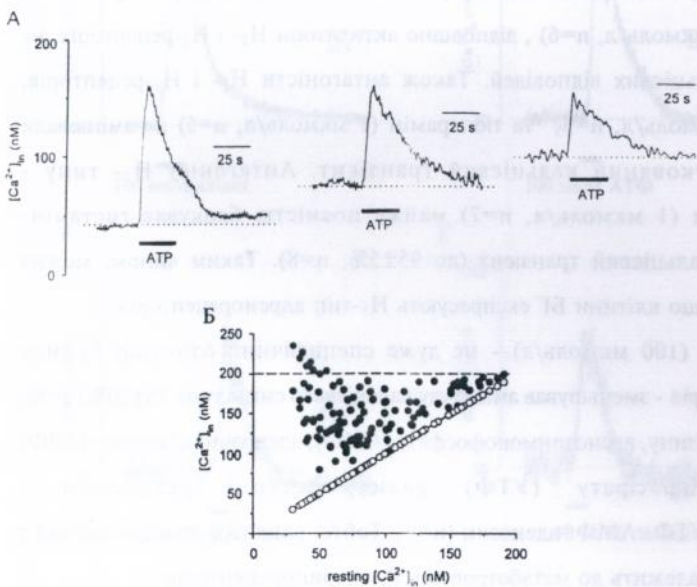
Аплікація фенілефрину (1 мкмоль/л, n=7) - специфічного активатора α_1 -типу адренорецепторів викликала кальцієвий транз'єнт, схожий на адреналін-індукований, а клонідін (до 10 мкмоль/л, n=10) - активатор α_2 -типу рецепторів та ізопротеренол (до 10 мкмоль/л, n=11) - агоніст β -типу не змінювали рівню $[Ca^{2+}]_i$. Також неефективні були блокатори α_2 - та β -типу рецепторів, відповідно йохимбін і пропранолол (n=6), а празозін (1 мкмоль/л, n=12) пригнічував адреналін-індукований кальцієвий транз'єнт на $85 \pm 10\%$ (n=11). Таким чином, можна стверджувати, що клітини БГ експресують α_1 -тип адренорецепторів.

У випадку з гистаміном ні димапріт (100 мкмоль/л, n=4), ні альфа-метил-гистамін (100 мкмоль/л, n=6), відповідно активатори H_2 - і H_3 -рецепторів, не викликали кальцієвих відповідей. Також антагоністи H_2 - і H_3 -рецепторів, ранітідін (1 мкмоль/л, n=5) та тіоперамін (1 мкмоль/л, n=5) не змінювали гистамін-індукований кальцієвий транз'єнт. Антагоніст H_1 -типу - хлорфенірамін (1 мкмоль/л, n=7) майже повністю блокував гистамін-індукований кальцієвий транз'єнт (до $95 \pm 5\%$, n=8). Таким чином, можна стверджувати, що клітини БГ експресують H_1 -тип адренорецепторів.

Сурамін (100 мкмоль/л) - не дуже специфічний блокатор P_2 -типу пуринорецепторів - зменшував амплітуду кальцієвого сигналу на $75 \pm 20\%$ (n=8). Аплікації аденозину, аденозинмонофосфату (АМФ), аденозиндифосфату (АДФ) та урідинтрифосфату (УТФ) дали наступні результати : АДФ=АТФ >> УТФ=АМФ=аденозин (n=9). Тобто, рецептор, експресований у клітинах БГ, належить до метаботропних P_{2U} пуринорецепторів.

Як відомо із літератури, всі три типи рецепторів, що експресуються клітинами БГ, належать до метаботропних рецепторів, тобто їх активація супроводжується синтезом $InsP_3$ та вивільненням кальцію із внутрішньоклітинних депо. Дійсно, кальцієві відповіді, індуковані вищезгаданими речовинами, не залежали від зовнішньоклітинного кальцію (n=12 для кожного агоністу).

Інкубація у розчині, що містив тапсігаргін (1 мкмоль/л) - блокатор внутрішньоклітинних кальцієвих насосів ендоплазматичного ретикулуму, необоротно пригнічувала кальцієві відповіді ($n=15$). Більш того, діаліз клітин БГ розчином, до якого було додано 10 мкмоль/л гепарину - специфічного інгібітора InsP_3 -чутливого кальцієвого каналу ендоплазматичного ретикулуму, також призводив до пригнічення кальцієвого транз'єнту на $80 \pm 11\%$ ($n=6$). Діаліз нормальним внутрішньоклітинним розчином не впливав на реакції ($n=5$). Наведені дані показують, що клітини Бергманівської глії експресують три типи метаботропних рецепторів, а саме α_1 -адрено-, H_1 -гістаміно- та P_2 -



Мал.9 Кальцієві відповіді, індуковані активацією метаботропних рецепторів, залежать від рівню $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

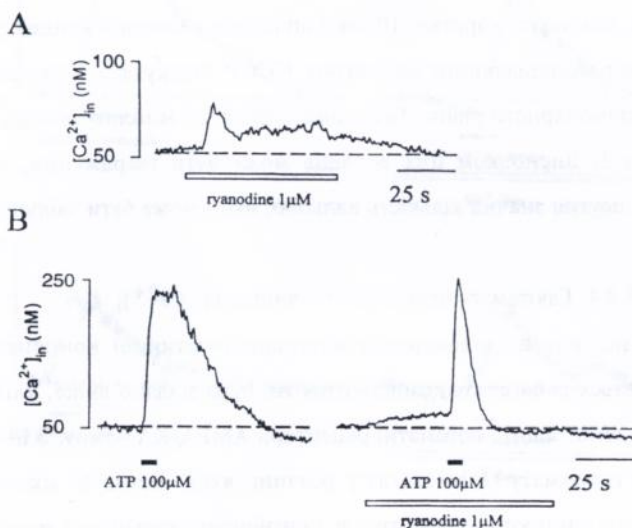
пурино-рецептори.

Слід також відмітити, що амплітуди кальцієвих відповідей, які було

викликаню аплікацією активаторів метаботропних рецепторів, були у зворотній залежності від рівню внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Якщо ж рівень $[Ca^{2+}]_i$ перевищував 150-200 нмоль/л, аплікація агоністів не індукувала кальцієвих транз'єнтів (мал.9).

3.2.2 Ріанодин-чутливе кальцієве депо

Аплікація кофеїну (до 40 ммоль/л, $n=12$) викликала підвищення $[Ca^{2+}]_i$ на 30-50 нмоль/л. Інкубація тонких зрізів мозочку у розчині, який містив ріанодин (10 мкмоль/л, $n=8$), також транз'єнтно підвищувала внутрішньоклітинну концентрацію кальцію на 30-50 нмоль/л і пригнічувала



Мал.10 Ріанодин викликає підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та модулює АТФ-індуковану кальцієву відповідь.

кофеїн-індуковану кальцієву відповідь. Незважаючи на досить незначні кальцієві відповіді на кофеїн та ріанодин, преінкубація слайсів у розчині, до

якого додавали ріанодин (10 мкмоль/л, n=25), пригнічувала кайнат-індукований кальцієвий транз'єнт на $30 \pm 13\%$ (n=7) і хоча і не впливала на амплітуди кальцієвих відповідей, індукованих активацією метаботропних рецепторів, зате значно їх скорочувала у часі (мал.10). Наведені дані вказують на те, що в клітинах БГ присутнє ріанодин-чутливе кальцієве депо, яке приймає участь у підвищенні рівню $[Ca^{2+}]_i$ за механізмом кальцій-індукованого вивільнення кальцію (CICR).

3.2.3 Мітохондрії

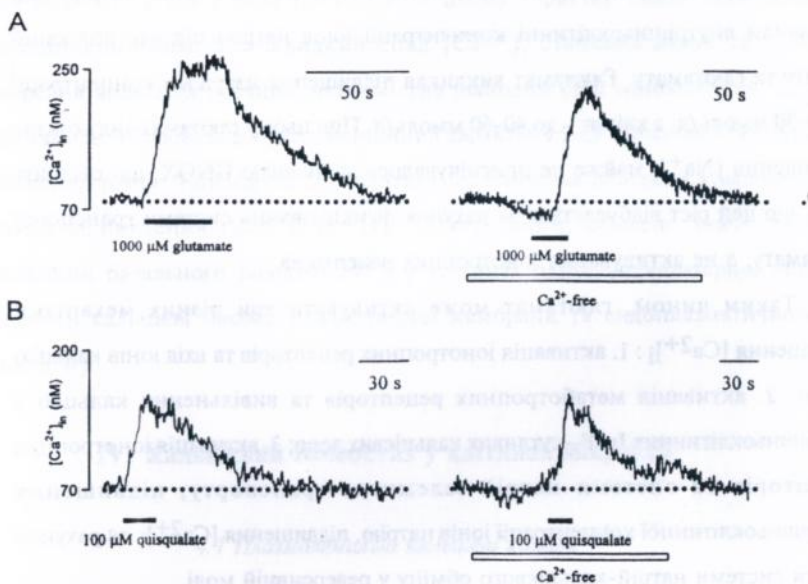
Дослідження ролі мітохондрій у кальцієвій сигналізації у клітинах БГ було ускладнене тим, що навіть коротка (10 сек.) аплікація незначної концентрації (1 мкмоль/л) мітохондріального блокатору СССР індукувала підвищення $[Ca^{2+}]_i$ до мікромолярного рівня. Такі концентрації не можливо вимірувати барвником fura-2. Висновком цих дослідів може бути твердження, що у мітохондріях присутня значна кількість кальцію, який може бути звільнений.

3.2.4. Глютамат-індуковане підвищення $[Ca^{2+}]_i$

Глютамат-індуковане підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію складається із багатьох компонентів. Як було згадано вище, клітини БГ експресують іонотропні глютаматні рецептори AMPA/KA - типу. З іншого боку, аплікація глютамату (1 ммоль/л) у розчині, який містив 10 мкмоль/л CNQX - блокатору іонотропних рецепторів, пригнічувала кальцієвий транз'єнт тільки на $20 \pm 9\%$ (n=19). Кайнат-індукована кальцієва відповідь у такому розчині була відсутня, вказуючи на відсутність активації іонотропних глютаматних-рецепторів. Аплікація транс-ACPD (до 100 мкмоль/л) викликала кальцієву відповідь тільки у 30% клітин, при цьому у всіх випадках ця відповідь повністю пригнічувалась у безкальцієвому розчині. Таким чином, транс-ACPD вірогідніше ініціює підвищення $[Ca^{2+}]_i$ за рахунок активації іонотропних рецепторів. Квисквалат (10-30 мкмоль/л) викликав підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (n=15), яке не пригнічувалося видаленням іонів кальцію із зовнішньоклітинного

розчину ($n=11$) і не було чутливе до блокатору іонотропних глутаматних рецепторів CNQX ($n=5$) (мал. 11). Таким чином, наведені результати вказують на існування метаботропного глутаматного рецептору типу GluR5 та/чи GluR1.

Але при цьому інкубування тонких зрізів мозочка у розчині, що містив тапсігаргін (1 мкмоль/л), хоча і пригнічувала кальцієві відповіді ($n=13$), але тільки на 50-60 відсотків. Більш того, діаліз клітин БГ розчином, до якого було додано 10 мкмоль/л гепарину, також не призводив до повного пригнічення



Мал. 11 Глутамат та квіскалат активують метаботропні рецептори у клітинах Бергманівської глії мозочка.

кальцієвого транзйєнту (амплітуда зменьшувалась на $40 \pm 11\%$ ($n=8$)). Навіть у клітинах, які шляхом діалізу були заповнені розчином з гепаріном, та знаходилися у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині, який містив тапсігаргін та CNQX, глутамат викликав кальцієві транзйєнти. Це показує, що існує якийсь інший компонент.

Оскільки гліальні клітини приймають активну участь в усуненні медіатора-глутамату з синаптичних щілин за рахунок натрій-залежного транспорту глутамату, можна припустити наявність активної ролі системи натрій-кальцієвого обміну. Дійсно, аплікація глутамату у розчині, який не містив натрію, пригнічувала кальцієвий сигнал на $24 \pm 7\%$ ($n=25$). Кайнат-індукований кальцієвий транз'єнт модулювався безнатрієвим розчином ще сильніше - на $56 \pm 13\%$. Таким чином, система натрій-кальцієвого обміну здатна значно підвищувати $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах БГ, під час активації глутаматних рецепторів.

За допомогою барвника SBFI, який є чутливим до іонів натрію, ми визначили внутрішньоклітинні концентрації іонів натрію під час аплікацій кайнату та глутамату. Глутамат викликав підвищення натрієвої концентрації до 20-30 ммоль/л, а кайнат - до 40-60 ммоль/л. При цьому глутамат-індуковане підвищення $[Na^+]_i$ майже не пригнічувалось аплікацією CNQX, що свідчить за те, що цей ріст відбувається за рахунок функціонування системи транспорту глутамату, а не активування іонотропних рецепторів.

Таким чином, глутамат може активувати три різних механізми підвищення $[Ca^{2+}]_i$: 1. активація іонотропних рецепторів та вхід іонів кальцію ззовні; 2. активація метаботропних рецепторів та вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних $InsP_3$ -чутливих кальцієвих депо; 3. активація іонотропних рецепторів та системи натрій-залежного транспорту, підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів натрію, підвищення $[Ca^{2+}]_i$ за рахунок роботи системи натрій-кальцієвого обміну у реверсивній моді.

2.3. Механізми вилучення іонів кальцію

Для функціонування клітин принциповим є не тільки можливість підвищувати рівень $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на стимул, але й відновлювати рівень спокою. Для оцінки систем, які відповідають за відновлення базового рівня $[Ca^{2+}]_i$, підвищення його рівня викликали аплікацією АТФ чи кайнату.

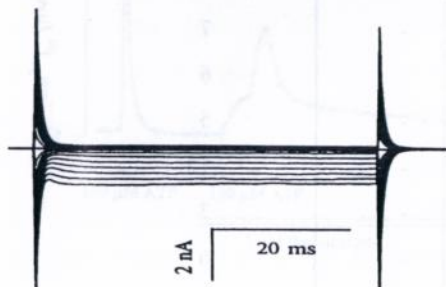
Інкубація клітин у розчині, що не містив натрій (еквімолярна заміна на

NMDG) ($n=15$) підвищувала рівень $[Ca^{2+}]_i$ на 55 ± 10 нмоль/л, але не змінювала кінетик кальцієвих транзєнтів, які були індуковані аплікацією 100 мкмоль/л АТФ. Наведені дані вказують на те, що система натрій-кальцієвого обміну приймає участь у стабілізації базового рівня $[Ca^{2+}]_i$, але у відновленні базального рівню $[Ca^{2+}]_i$ її внесок незначний.

Зовнішньоклітинна аплікація 3 ммоль/л La^{3+} - антагоністу кальцієвих насосів плазматичної мембрани - уповільнювала процес відновлення базового рівня $[Ca^{2+}]_i$ у 1.5-2 рази ($n=17$). При цьому характер спаду залишався двоекспоненційним, але швидкий спад $[Ca^{2+}]_i$ становив лише 10-15%. Попередня аплікація розчину, який містив ріанодин (100 мкмоль/л) ($n=12$), практично не змінювала двоекспоненційний характер спаду кальцієвих сигналів до базового рівня. Тапсігаргін (1 мкмоль/л) пригнічував швидкий компонент процесу відновлення $[Ca^{2+}]_i$ ($n=11$). Таким чином, основне значення у відновленні базального рівню $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах олігодендроцитарної лінії відіграють кальцієві насоси плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму.

IV. Кальцієвий гомеостаз у клітинах мікроглії

4.1 Плазмалемальні кальцієві канали



Мал. 12. Електрофізіологічні характеристики клітин мікроглії.

Клітини мікроглії, які належать до макрофагів, не експресують потенціал-

залежних кальцієвих каналів (мал. 12). Єдиний відомий іонотропний рецептор належить до пуринорецепторів, який активується як АТФ, так і АДФ і може бути заблокований сураміном (100 мкмоль/л), тобто - до P₂-типу іонотропних пуринорецепторів.

На той же час майже відсутні дані про наявність внутрішньоклітинних кальцієвих депо та функціонування механізмів регуляції $[Ca^{2+}]_i$.

4.2 Внутрішньоклітинні кальцієві депо

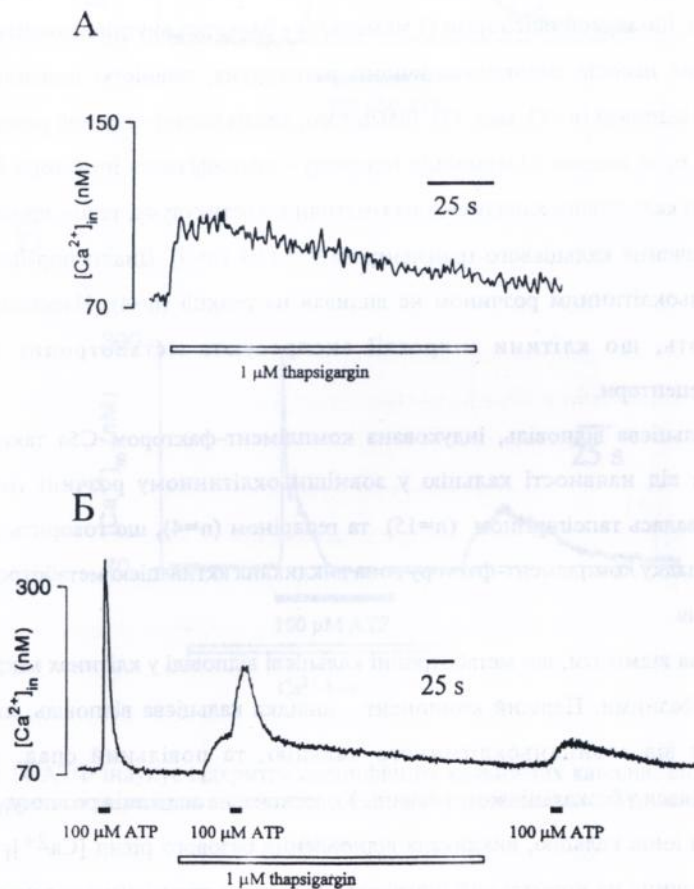
4.2.1 Інозітолтрифосфат-чутливе кальцієве депо

Методом флуоресцентної кальцієвої мікроскопії були протестовані такі медіатори:

Таблиця 2.

	Концентрації	$[Ca^{2+}]_i$	Число клітин
Аспарат	10 - 1000	-	7
АТФ	10 - 1000	+	41
Брадикінін	0.1 - 10	-	6
Допамін	10 - 1000	-	8
Адреналін	0.1 - 10	-	11
ГАМК	10 - 1000	-	5
C5a	1 - 10	+	25
Гистамін	1 - 1000	-	7
Гомоцистеат	10 - 1000	-	7
Каїнат	10 - 1000	-	6
Норадреналін	0.1 - 10	-	5
Оксітоцин	1 - 10	-	12
Серотонін	10 - 1000	-	3
Соматостатін	1 - 10	-	6
Субстанція Р	1 - 10	-	11
Вазопресін	1 - 10	-	15

Як показано у табл.2 окрім вищезгаданного АТФ жодна речовина, окрім комплемент-фактору C5a, не викликала підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах мікроглії. C5a- та АТФ-індуковані кальцієві транзєнти були дозо-залежні : порогова концентрація дорівнювала 1 мкмоль/л для АТФ і 0.5 нмоль/л для C5a , а 10 мкмоль/л АТФ і 1.5 нмоль/л C5a викликали кальцієві транзєнти напівмаксимальної амплітуди.



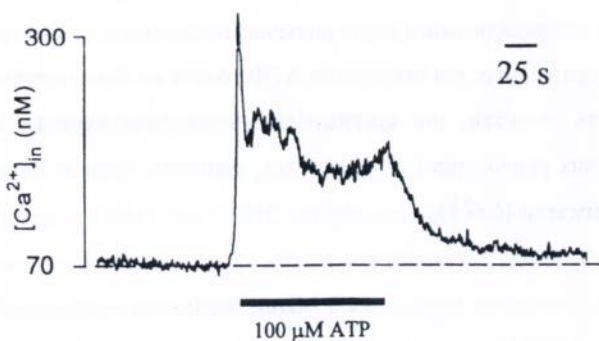
Мал.13 Тапсігаргін викликає підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та пригнічує АТФ-індуковану кальцієву відповідь у клітинах мікроглії.

Щоб відокремити іонотропний та метаботропний кальцеві компоненти АТФ-індукованого кальцевого підвищення $[Ca^{2+}]_i$, всі досліди по ідентифікації типу метаботропного рецептора були проведені у безкальцевому розчині. Сурамін (100 мкмоль/л) зменшував амплітуду кальцевого сигналу на $82 \pm 15\%$ ($n=9$). Аплікації аденозину, аденозинмонофосфату (АМФ), аденозиндифосфату (АДФ) та урідинтрифосфату (УТФ) дали наступні результати : АДФ=АТФ >> УТФ=АМФ=аденозин ($n=5$). Тобто, рецептор, експресований у клітинах мікроглії, належить до метаботропних P_{2Y} пуринорецепторів. Інкубація у розчині, що містив тапсігаргін (1 мкмоль/л) - блокатор внутрішньоклітинних кальцевих насосів ендоплазматичного ретикулуму, повністю пригнічувала кальцеві відповіді ($n=13$, мал. 13). Більш того, діаліз клітин мікроглії розчином, до якого було додано 10 мкмоль/л гепарину - специфічного інгібітора $InsP_3$ -чутливого кальцевого каналу ендоплазматичного ретикулуму, також призводив до пригнічення кальцевого транзйенту на $95 \pm 12\%$ ($n=9$). Діаліз нормальним внутрішньоклітинним розчином не впливав на реакції ($n=4$). Наведені дані показують, що клітини мікроглії експресують метаботропні P_{2Y} - пуринорецептори.

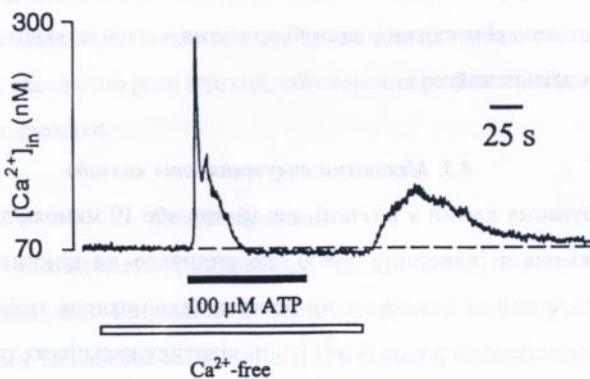
Кальцева відповідь, індукована комплімент-фактором $C5a$ також не залежала від наявності кальцію у зовнішньоклітинному розчині ($n=21$), пригнічувалась тапсігаргіном ($n=15$) та гепаріном ($n=4$), що говорить за те, що і у випадку комплемент-фактору вона викликана активацією метаботропних рецепторів.

Слід відмітити, що метаботропні кальцеві відповіді у клітинах мікроглії були двофазними. Перший компонент - швидка кальцева відповідь, яка не залежала від зовнішньоклітинного кальцію, та повільний спад, який пригнічувався у безкальцевому розчині. Короткочасна аплікація розчину, який не містив іонів кальцію, викликала відновлення базового рівня $[Ca^{2+}]_i$, але заміна розчину на нормальний індукувала додаткове транзйентне підвищення кальцевої концентрації (мал. 14). Базуючись на цих даних, можна припустити, що вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо індукує відкриття

А



Б



Мал.14 АТФ індукує відкриття специфічних кальцієвих каналів, що відбувається внаслідок вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо.

плазмалемальних кальцієвих каналів, які відомі під назвою - CRAC (calcium release activated channels).

4.2.2 Ріанодин-чутливе кальцієве депо

Ні аплікація кофеїну (до 40 ммоль/л, $n=6$), ні ріанодину (до 100 мкмоль/л, $n=4$) не викликали зміни рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Кальцієві транзйенти, які індукували АТФ, також не були модульовані. Це дає можливість вважати, що клітини мікроглії практично не експресують ріанодинових рецепторів і, як результат, ріанодин-чутливе депо не приймає участі у регуляції $[Ca^{2+}]_i$.

4.2.3 Мітохондрії

Аплікація 10 мкмоль/л CCCP ($n=11$) - блокатора мітохондріального транспорту протонів - викликала значне, транзйентне підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$, що говорить за те, що мітохондрії мають значну кількість зв'язаного кальцію. Кальцієва відповідь не залежала від наявності зовнішньоклітинного кальцію, вказуючи на внутрішньоклітинне походження кальцію, який був вивільнений. Тобто, у мітохондріях клітин мікроглії присутня значна кількість кальцію, який може бути звільнений.

4.3. Механізми вилучення іонів кальцію

Інкубування клітин у розчині, що містив або 10 мкмоль/л CCCP ($n=7$), або 10 мкмоль/л ріанодину ($n=5$), не впливало на кінетики кальцієвих відповідей. Аплікація безнатрієвого розчину (еквімолярна заміна на NMDG) ($n=8$) не змінювала ні рівню $[Ca^{2+}]_i$, ні кінетику кальцієвих транзйентів, які були індуковані аплікацією АТФ. Наведені дані вказують на те, що роль мітохондрій, ріанодин-чутливого депо та системи натрій-кальцієвого обміну у відновленні базального рівню $[Ca^{2+}]_i$ незначна.

Зовнішньоклітинна аплікація 3 ммоль/л La^{3+} - антагоністу кальцієвих насосів плазматичної мембрани - значно уповільнювала процес відновлення базового рівня $[Ca^{2+}]_i$ ($n=8$). Тапсігаргін (10 мкмоль/л) також викликав зниження швидкості цього процесу (1.3 ± 0.2 , $n=5$). Таким чином, основне

значення у відновленні базального рівню $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах олігодендроцитарної лінії відіграють кальцієві насоси плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Незважаючи на той факт, що у ЦНС співвідношення кількості гліальних клітин до кількості нейронів становить 10 : 1, механізми регуляції $[Ca^{2+}]_i$ у глії майже не охарактеризовані. У даній роботі було виконано пряме дослідження основних механізмів кальцієвого гомеостазу у трьох основних типах гліальних клітин центральної нервової системи : астроцитах, олігодендроцитах та мікроглії. За результатами перегляду літератури можна стверджувати, що дана робота являє собою перше детальне дослідження механізмів внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації у гліальних клітинах.

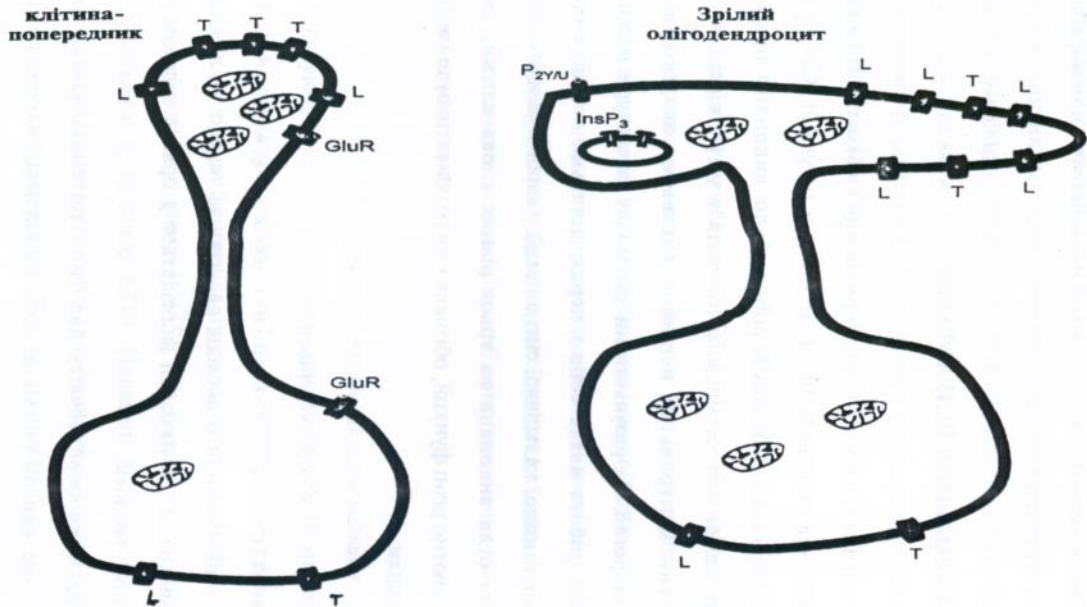
Оскільки робота була виконана на трьох різних типах клітин, які виконують у ЦНС абсолютно різні функції, обговорення результатів буде також поділене на три підрозділи.

Олігодендроцити

На мал.15 узагальнені результати наших досліджень клітин олігодендроцитарної лінії. Результати дослідів свідчать за те, що у клітинах цієї лінії механізми кальцієвої сигналізації знаходяться у прямій залежності від фази онтогенетичного розвитку.

Клітини-попередники експресують два типи потенціал-залежних кальцієвих каналів, а саме, канали з низьким порогом активації - очевидно Т-тип, та з високим порогом активації - L-тип. При цьому, Т-тип концентрується майже виключно у відростках клітин. У зрілих олігодендроцитах якщо і експресовані канали Т-типу, то їх густина дуже мала, а канали, що мають високий поріг активації, знову ж таки концентруються у відростках. Такий розподіл каналів може бути віддзеркаленням функціональної ролі клітин цієї

лінії - а саме, мієлінізації аксонів. На ранній стадії формування ЦНС співвідношення міжклітинного об'єму до об'єму клітин значно більше, тобто



Мал. 15 Механізми генерації кальцієвих сигналів у клітинах олігодендроцитарної лінії. У ході онтогенетичного розвитку змінюється репертуар та розподіл кальцієвих каналів (L- та T- типи), проходить експресія метаботропних P_{2Y/U} рецепторів, зникають іонотропні глутаматні рецептори та змінюється розподіл мітохондрій.

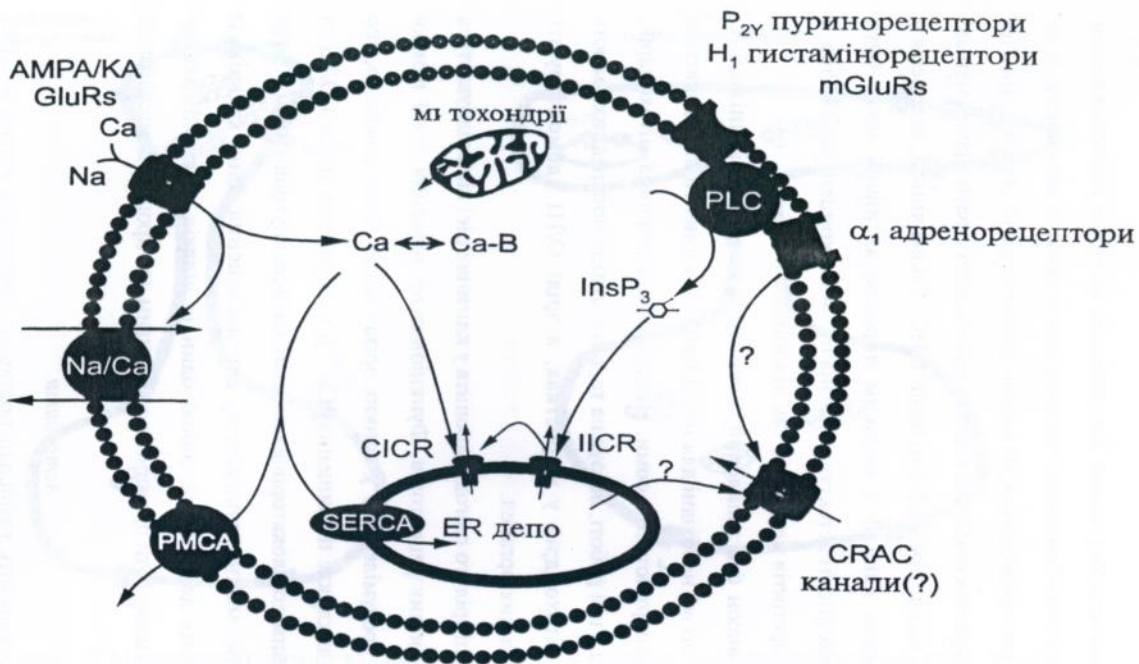
зовнішньоклітинного простору більше. Базуючись на тому, що відростки клітин олігодендроцитарної лінії “шукають” аксони, детектуючи їх активність, а це можуть бути зміни зовнішньоклітинної концентрації калію. можна стверджувати, що на ранніх стадіях ці клітини мусять детектувати значно менші зміни концентрації калія, ніж у сформованій ЦНС. Таким чином, експресія у відростках кальцієвих каналів з низьким порогом активації може бути відображенням необхідності детектувати незначні зміни концентрації калію, а для зрілих олігодендроцитів це вже не так принципово.

По тому, як аксон був знайдений, починається процес мієлінізації. Із літератури відомо, що всі необхідні для мієлінізації компоненти виробляються на місці, а не транспортуються з соми. Неоднорідний розподіл мітохондрій, який був показаний у цій роботі, вказує на те, що клітини-попередники мають значну кількість мітохондрій у відростках, а зрілі ОЛЦ демонструють однорідний розподіл цих органел.

Тільки на етапі зрілого олігодендроцита у клітинах цієї лінії відбувається експресія метаболічних рецепторів. Функціональне значення такої пізньої активації не дуже зрозуміле, але у тонких зрізах мозку було показано, що активність аксона викликає підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відростках зрілого ОЛЦ за механізмом, чутливим до блокаторів кальцієвих насосів внутрішньоклітинних депо. Таким чином, можна припустити, що вивільнення іонів кальцію із внутрішньоклітинних депо являє собою один із шляхів взаємодії аксон-олігодендроцит, що може бути принципово важливим для процесу демієлінізації.

Астроцити

Астроцити утворюють найбільш поширену популяцію клітин у ЦНС. Деякі принципові функції астроцитів було показано: активна роль у регуляції зовнішньоклітинної концентрації іонів калію; постачання глюкози нейронам; вилучення нейротрансмітерів із зовнішньоклітинного середовища. Основні механізми, які приймають участь у регуляції рівня $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах БГ мозочку, та їх взаємодія зображені на мал. 16.

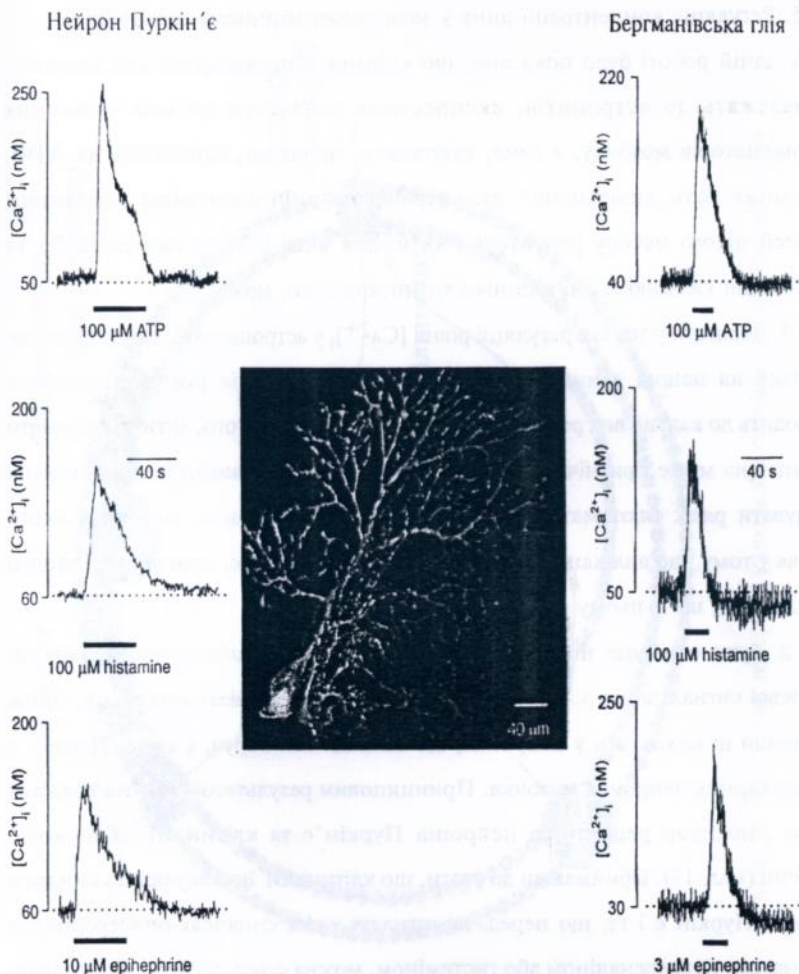


Мал. 16 Механізми генерації кальцієвих сигналів у клітинах Бергманівської глії мозочка.

За літературними даними фізіологічні реакції, які можуть регулюватися внутрішньоклітинною концентрацією кальцію у астроцитах, можна поділити

на такі категорії:

1. Формування та вивільнення у зовнішньоклітинне середовище біологічноактивних речовин, наприклад, арахідонової кислоти, NO, глутамату



Мал. 17 Нейрони Пуркін'є та Бергманівської глії експресують ідентичні рецептори. В центрі - зображення нейрона Пуркін'є і клітини БГ, які були заповнені барвником Люціфером жовтим, у тонкому зрізі мозку.

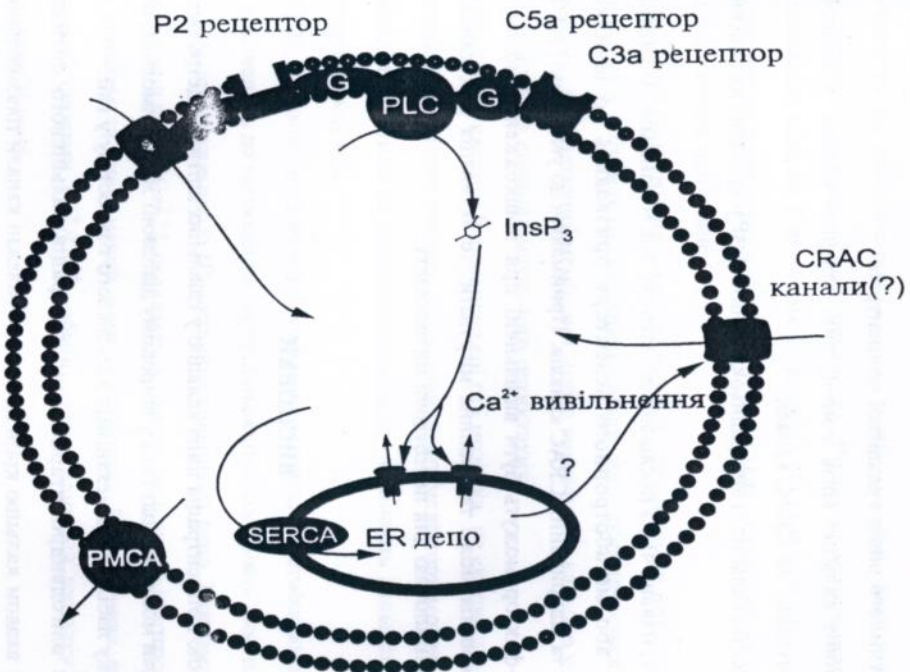
та інших.

2. Перетворення глікогену на глюкозу.
3. Регуляція об'єму гліальних клітин, і, як наслідок, регулювання об'єму синаптичної щілини.
4. Зміна буферних властивостей гліального синцитію.
5. Регуляція концентрації іонів у зовнішньоклітинному середовищі.

У даній роботі було показано, що клітини Бергманівської глії мозочку, які належать до астроцитів, експресують рецептори до всіх основних нейромедiatorів мозочку, а саме, глутамату, гистаміну, адреналіну та АТФ, який може бути вивільнений як котрансмітер. Фізіологічним значенням експресії цілого набору рецепторів, активація яких ініціює синтез InsP_3 та вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо, може:

1. полягати у тонкій регуляції рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у астроцитах. Це припущення базується на наших даних, які показують, що активація різних рецепторів призводить до кальцієвих реакцій різної амплітуди. Більш того, активація одного з рецепторів може пригнічувати відповіді на інші. За нашими даними можна побудувати ряд: глутамат = адреналін > АТФ > гистамін, значення якого полягає у тому, що аплікація медіаторів, що вказані лівише, пригнічує відповіді на медіатори, що у цьому ряду стоять правіше.

2. бути основою нейрон-гліальної взаємодії. Досліджуючи механізми кальцієвої сигналізації у клітинах БГ мозочку у тонких зрізах мозку, ми також перевірили ці механізми у нейронах, що знаходяться поруч, а саме, Пуркін'є та гранулярних нейронах мозочку. Принциповим результатом можна вважати те, що репертуар рецепторів нейронів Пуркін'є та клітин БГ абсолютно ідентичні (мал. 17). Приймаючи до уваги, що клітини БГ інкапсують синапси нейронів Пуркін'є і те, що передача сигналів у цих синапсах опосередована глутаматом, норадреналіном або гистаміном, можна стверджувати, що клітини БГ здатні "відчувати" всі синаптичні входи нейронів Пуркін'є і навіть регулювати процеси передачі шляхом захвату нейромедiatorів та зміни об'єму



Мал. 16 Механізми генерації кальцієвих сигналів у клітинах мікроглії.

Мікроглія являє собою один з найзагалговіших типів клітин ЦНС, навіть походження цих клітин все ще становить тему дискусії. Але найбільшу увагу

науковців привертає питання активації мікроглії, тобто переходу її у макрофаг. Із літератури відомо тільки, що всі активатори мікроглії викликають також підвищення рівню $[Ca^{2+}]_i$, а це, у свою чергу, ініціює перебудову цитоскелета.

На мал. 18 зображені механізми регуляції $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах мікроглії. Існує два основних механізми, які викликають підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцієвої концентрації:

1. Вхід іонів кальцію крізь хемо-чутливі кальцієві канали, у нашому випадку АТФ-чутливі, та CRAC канали;

2. Вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних $InsP_3$ -чутливих кальцієвих депо.

При цьому, наявна чітка послідовність запуску цих механізмів. Активація іонотропного або метаботропного рецептору призводить до швидкої десенситизації та відкриття CRAC каналів. Приймаючи до уваги, що і АТФ, і комплемент-фактор можуть бути вивільнені при пошкодженні мозку, а активована мікроглія може та повинна мігрувати, то активація цих каналів може бути принциповою для перебудови цитоскелету..

ВИСНОВКИ

1. У стані спокою концентрація іонів кальцію у гліальних клітинах центральної нервової системи може знаходитися у широкому діапазоні 30–300 нмоль/л, що вказує на високу лабільність механізмів кальцієвого гомеостазу у глії.

2. У клітинах олігодендроцитарної лінії генерація кальцієвого сигналу забезпечується входом кальцію крізь потенціал-залежні канали плазматичної мембрани та вивільненням із внутрішньоклітинних інозітолтрифосфат-чутливих депо. На різних стадіях розвитку клітини цієї лінії змінюють репертуар експресованих каналів, але незалежно від стадії кальцієві канали концентруються у відростках клітин.

3. Вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо відбувається внаслідок активації P_2 пуринорецепторів, які контролюють рівень внутрішньоклітинного інозітолтрифосфату. Пуринорецептори експресуються тільки на більш пізніх стадіях розвитку олігодендроцитів і відсутні у клітинах-попередниках.

4. Блокування транспорту протонів у клітинах олігодендроцитарної лінії призводить до вивільнення кальцію із мітохондрій, вказуючи на високу концентрацію кальцію у цих органелах. Розподіл мітохондрій з низьким потенціалом спокою ("активних") залежить від стадії розвитку: у клітинах-попередниках вони концентруються у відростках, а у зрілих олігодендроцитах розподіляються однорідно.

5. Зниження концентрації кальцію до рівня спокою після його росту внаслідок активності у клітинах олігодендроцитарної лінії забезпечується кальцієвими насосами: плазматичної мембрани, тобто виведенням кальцію у позаклітинне середовище, та ендоплазматичного ретикулулу.

6. Астроцити, клітини Бергманівської глії мозочка, не експресують потенціал-залежних кальцієвих каналів. Всі основні нейромедіатори мозочка - глутамат, адреналін, гістамін та аденозинтрифосфат - ініціюють кальцієві транзєнти у Бергманівській глії.

7. АТФ, гістамін та адреналін активують відповідні метаботропні рецептори, що призводить до підвищення внутрішньоклітинного рівня інозітолтрифосфату та вивільнення кальцію із IP_3 -чутливих кальцієвих депо. Глутамат-індуковане підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ складається з входу кальцію по іонотропним АМРА/КА каналам та вивільнення його із клітинних IP_3 -чутливих депо, а також активації системи Na^+/Ca^{2+} - обміну, що в данному випадку функціонує у реверсивній моді.

8. Вперше показано існування в астроцитах ріанодин-чутливих кальцієвих депо. Активація всіх вище названих шляхів підвищення $[Ca^{2+}]_i$ також додатково викликає вивільнення Ca^{2+} цих депо.

9. Зниження концентрації кальцію до рівню спокою після його росту внаслідок

активності у клітинах Бергманівської глії забезпечується кальцієвими насосами плазматичної мембрани, тобто виведенням кальцію у позаклітинне середовище, та сплоплазматичним ретикулоном.

10. Мікроглія не експресує потенціал-залежних кальцієвих каналів. АТФ та комплімент-фактор C5a активують відповідні метаботропні рецептори, що призводить до підвищення внутрішньоклітинного рівня інозітолтрифосфату та вивільнення кальцію з IP_3 -чутливих кальцієвих депо. АТФ також активує іонотропні кальцієві канали.

11. Вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо викликає активацію специфічних кальцієвих каналів плазматичної мембрани - CRAC-каналів.

12. Експресія чисельних рецепторів до всіх основних нейромедіаторів у клітинах глії може складати основу нейрон-гліальної взаємодії. АТФ, який активує кальцієві сигнали у всіх типах макро- та мікроглії, є одним з найвірогідніших претендентів на посередника цієї взаємодії.

СПИСОК РОБІТ, ЯКІ ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. S.Kirschuk, H.Kettenmann & A.Verkhratsky (1994): Calcium signalling in oligodendrocytes. *Neurophysiology/Neirofizjologia*, v. 26, No. 2, p. 26 - 31.

2. S.Kirschuk, J.Sherer, H.Kettenmann & A.Verkhratsky (1994) ATP-induced cytoplasmic Ca^{2+} release via activation of $InsP_3$ -sensitive channels in oligodendrocytes. *Proceedings of the First European Meeting on glial cells function in health and disease*. Heidelberg, March 24 - 27, p. 113

3. S.Kirschuk, J.Sherer, H.Kettenmann & A.Verkhratsky (1994) ATP-triggers Ca^{2+} mobilization in Bergmann glial cells via activation of P_2 purinoreceptors. *Proceedings of the First European Meeting on glial cells function in health and disease*. Heidelberg, March 24 - 27, p. 113

4. S.Kirschuk, J.Sherer, H.Kettenmann & A.Verkhratsky (1994) Subcellular heterogeneity of voltage-gated Ca^{2+} channels in cells of the oligodendrocyte lineage. *Proceedings of the First European Meeting on glial cells function in health and disease*.

Heidelberg, March 24 - 27, p. 114

5. S.Kirischuk, H.Kettenmann & A.Verkhatsky (1994) ATP-triggered Ca^{2+} release from $InsP_3$ -sensitive stores in oligodendrocytes. *Journal of Physiology (London)*, 477P, 9P

6. S. Kirischuk, H. Kettenmann & A. Verkhatsky (1994) ATP triggers Ca^{2+} release from $InsP_3$ -sensitive stores in oligodendrocytes. *European Journal of Neuroscience, suppl. 7, Proceedings of the 16th Annual ENA Meeting*, p. 187.

7. S. Kirischuk & A. Verkhatsky (1995) Mechanisms of Ca^{2+} mobilization in cerebellar Bergmann glial cells. *Journal of Physiology, London*, v. 483P, 35P.

8. A.Verkhatsky, S. Kirischuk & H. Kettenmann (1995): Metabotropic purinoreceptors and calcium signalling in glial cells. Proceedings of 23rd Gottinger Neurobiologentagung, March 24 - 26, 123P.

9. P.Kostyuk, P.Belan, A.Shmigol, S.Kirischuk, A.Verkhatsky (1993) Basic mechanisms of calcium signal generation in nerve cells. *Proceedings of the IUPS Congress, Glasgow*, P.51.

10. S.Kirischuk, N.Voitenko, H.Kettenmann & A.Verkhatsky (1994) Mechanisms of cytoplasmic calcium signalling in cerebellar Bergmann glial cells. *Neurophysiology (Kiev)*, v. 26, p. 417 - 419.

11. S.Kirischuk, J.Sherer, A.Verkhatsky & H.Kettenmann (1995) Subcellular heterogeneity of voltage-gated Ca^{2+} channels in cells of the oligodendrocyte lineage. *Glia*, v.13, p.1 - 12

12. S.Kirischuk, J. Sherer, H.Kettenmann and A.Verkhatsky (1995) Activation of P_2 purinoreceptors triggers Ca^{2+} release from $InsP_3$ -sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J.Physiol. (London)*, v. 483.1, pp.41-57

13. S.Kirischuk, J.Neuhaus, A.Verkhatsky and H.Kettenmann (1995) Preferential localization of active mitochondria in process tips of immature retinal oligodendrocytes. *Neuroreport*, v.6, p. 737-741.

14. S. Kirischuk, T. Moller, N. Voitenko, H. Kettenmann, & A.Verkhatsky (1995): ATP-triggered calcium mobilization in cerebellar Bergmann glial cells. *Journal*

15. Kirischuk S., Voitenko N., Kostyuk P., Verkhratsky A. (1996) Calcium signalling in granule neurones studied in cerebellar slices. *Proceedings of first meeting of Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Berlin, 1996, p.59.
16. Kirischuk S., Tuschick S., Verkhratsky A., Kettenmann H. (1996) Monoamines and histamine induced calcium mobilization in Bergmann glia. *Proceedings of first meeting of Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Berlin, 1996, p.59.
17. Verkhratsky A., Kirischuk S., Moller T., Kettenmann H. (1996) Purinoreceptors and calcium signalling in glia. *Proceedings of first meeting of Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Berlin, 1996, p.68.
18. Kirischuk S., Matiash V., Kulic A., Kostyuk P., Verkhratsky A. ATP, epinephrine and histamine induced calcium mobilization in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of first meeting of Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Berlin, 1996, p.69.
19. Kirischuk S., Voitenko N., Kostyuk P., Verkhratsky A. (1996) Calcium signalling in granule neurones studied in cerebellar slices. *Cell Calcium*. v. 19, 59-71.
20. S.Kirischuk, H. Kettenmann, A.Verkhatsky (1996) Metabotropic receptors involved in calcium signalling in Bergmann glial cells. *Proceedings of the meeting of the Physiological Society of The UK*, Bristol, p. 77.
21. S.Kirischuk, V.Matiash, A.Kulic, A.Verkhatsky ATP, epinephrine and histamine induced calcium mobilization in mouse cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the meeting of the Physiological Society of The UK*, Bristol, p.78.
22. S. Tuschick, S. Kirischuk, A. Verkhratsky, H. Kettenmann (1996) Mouse cerebellar Bergmann glial cells express ET_B endothelin receptors linked to the intracellular Ca²⁺ release from intracellular stores. *Proceedings of the meeting of the Physiological Society of The UK*, Manchester, 25P.
23. S. Kirischuk, N. Voitenko, P. Kostyuk, A Verkhratsky (1996) Calcium signalling in granule neurones studied in cerebellar slices : developmental changes. *Proceedings of the meeting of the Physiological Society of The UK*, Manchester, 67P.
24. S. Kirischuk & A.Verkhatsky (1996): [Ca²⁺]_i recordings from neural cells

in acutely isolated cerebellar slices employing differential loading of membrane permeant form of calcium indicator fura-2. *Pflugers Archiv*, in press.

25. S. Kirischuk, S. Tuschick, A. Verkhratsky & H. Kettenmann (1996) Epinephrine and histamine-induced Ca^{2+} signalling in Bergmann glia. *Eur. J. Neurosci.*, in press.

26. S. Kirischuk, V. Matiash, A. Kulik, N. Voitenko, P. Kostyuk, A. Verkhratsky (1996) Activation of P_2 -purino-, α_1 -adreno- and H_1 -histamine receptors triggers cytoplasmic calcium signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci.*, (in press).

Kirischuk S.I. Mechanisms of calcium signalling in glial cells from central nervous system. The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of doctor of biological sciences in the speciality 03.00.05. - Biophysics, A.A.Bogomoletz Institute of Physiology. National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

Mechanisms of calcium signalling were investigated in experiment on different types of glial cells of central nervous system (namely, oligodendrocytes, astrocytes and microglial cell) both in culture and in thin slices. It was shown that in spite of nonexcitability these cells express full spectrum of receptors, which were for long time supposed to be characteristic for neurones. Oligodendrocytes - the cells which are responsible for myelination - during development showed dramatic differences in both receptor expression pattern and their spatial distribution. Higher density of the receptors in processes could be suggested to be a sensor system for the beginning of either myelination process or demyelination if an axon was broken. Cerebellar astrocytes showed absolutely the same repertoire of receptors as neighbouring neurones. Such a similarity of receptor expressed allows to suppose that these cells are not only the element engulfing synapses; but an active partisipator of synaptic transmission processes. Microglia express receptors which are activated if there is a damage of a brain. Activation of them induces opening of CRAC channels what could be a system for the support of cytoskeleton transformation. Numbers of glial receptors and complexity of glial reactions are strongly in favour of denying the definition of glial cells as a passive element of brain. Neuron-glial interaction seems to be extremely important for brain functioning.

Киришук С.И. Механизмы генерации кальциевых сигналов в глиальных клетках центральной нервной системы млекопитающих. Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.05 - Биофизика, Институт физиологии им.А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 1996.

Исследования проводились на трех основных типах глиальных клеток центральной нервной системы - олигодендроцитах, астроцитах и микроглии. В качестве объекта использовались как культуральные клетки, так и клетки в тонких срезах мозга. Показано, что в клетках олигодендроцитарной линии и репертуар экспрессированных рецепторов, и их пространственное распределение зависят от стадии развития. При этом плотность рецепторов значительно выше в отростках, что может являться основой для начала как процесса миелинизации, так и демиелинизации, в случае если аксон был поврежден. Астроцитарные клетки, Бергманновские клетки мозжечка, экспрессируют тот же набор рецепторов, что и нейроны Пуркинье, расположенные в том же слое. Такая идентичность рецепторов позволяет предположить, что глиальные клетки не только инкапсулируют синапсы, но и являются активными участниками в процессе синаптической передачи. Микроглиальные рецепторы могут быть активированы веществами, образующимися при повреждении. Высвобождение кальция из депо приводит к активации специфических CRAC-каналов. Нейрон-глиальные взаимодействия, по-видимому, являются жизненно важными для функционирования ЦНС.

Ключові слова: олігодендроцити, астроцити, мікроглія, кальцієвий гомеостаз, нейрон-гліальна взаємодія.

AB 34.457