

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

На правах рукопису

СУХАНОВА ХРИСТИНА ЮРІЇВНА

УДК 577.3+591.463.6:599.323.41

**МЕХАНІЗМИ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ В АРТЕРІАЛЬНИХ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ ПРИ АКТИВАЦІЇ
ІОНОТРОПНИХ ПУРИНОРЕЦЕПТОРІВ**

03.00.02 – біофізика

Дисертація

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Кандидат біологічних наук

Гордієнко Дмитро Валерійович

Київ-2016

ЗМІСТ

Перелік скорочень	6
ВСТУП	7
Актуальність теми.....	7
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами..	9
Мета і задачі дослідження.....	9
Наукова новизна отриманих результатів.....	11
Теоретичне та практичне значення отриманих результатів..	12
Особистий внесок здобувача.....	12
Апробація результатів дисертації.....	13
Публікації.....	13
Структура та обсяг дисертації.	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1. Кальцієва сигналізація в гладеньком'язових клітинах при активзації пуринорецепторів.....	15
1.2. Загальна характеристика P2 рецепторів.....	16
1.2.1. Класифікація P2X рецепторів.....	16
1.2.2. Молекулярна структура P2X рецепторів.....	16
1.2.3. Механізми десенситизації P2X рецепторів.....	17
1.2.4. Електрофізіологічні властивості P2X рецепторів.....	18
1.2.5. Фізіологічна роль P2X рецепторів в ГМК судин.....	19
1.3. Потенціалкеровані кальцієві канали. Загальна характеристика.....	20
1.3.1. Класифікація VGCC каналів.....	20
1.3.2. Молекулярна структура VGCC.....	21
1.3.3. Нова метаботропна функція L-VGCCs в ГМК судин.....	23

1.4. Роль саркоплазматичного ретикулума як накопичувача іонів кальцію.....	25
1.5. IP ₃ рецептори саркоплазматичного ретикулума.....	26
1.5.1. Загальна характеристика IP ₃ рецепторів.....	26
1.5.2. Класифікація та молекулярна структура IP ₃ рецепторів.....	27
1.5.3. ПСР – основний шлях вивільнення Ca ²⁺ із СР.....	28
1.5.4. Просторові і часові властивості IP ₃ R-опосередкованих [Ca ²⁺] _i сигналів.....	31
1.6. RyRs рецептори саркоплазматичного ретикулума.....	34
1.6.1. Загальна характеристика RyRs рецепторів.....	34
1.6.2. Класифікація RyRs	34
1.6.3. Молекулярні характеристики та структура RyRs.....	36
1.6.4. Фізіологічна роль RyR в клітинах гладеньких м'язів: STOCs та Ca ²⁺ спарки.....	37
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.....	39
2.1. Об'єкт дослідження.....	39
2.2. Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів.....	40
2.3. Виділення ізольованих артеріальних міоцитів.....	42
2.4. Візуалізація змін [Ca ²⁺] _i	43
2.5. Візуалізація саркоплазматичного ретикулуму.....	43
2.6. Імунодетекція RyRs і IP ₃ Rs.....	44
2.7. Конфокальні дослідження	45
2.8. Електрофізіологічні дослідження.....	47
2.9. Подача агоністів в камеру.....	48
2.10. Розчини та реактиви.....	49
2.11. Аналіз даних.....	50

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	51
3.1. Дослідження механізмів підвищення $[Ca^{2+}]_i$ в ізольованих артеріальних ГМК при активації P2X рецепторів.....	51
3.1.1. Активація P2X рецепторів викликає підмембранний $[Ca^{2+}]_i$ стрибок.....	53
3.1.2. Визначення відтворюваності амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнта, викликаного 10 мкМ $\alpha\beta$ -мєАТФ	55
3.1.3. Визначення впливу CPA на VGCC-опосередковані струми.	56
3.1.4. Визначення концентрації CPA для повного спустошення CP від Ca^{2+}	58
3.1.5. Визначення внеску P2X рецепторів і L-VGCCs у загальний $[Ca^{2+}]_i$ сигнал при активації P2X рецепторів.....	60
3.1.5.1. Визначення внеску P2X рецепторів у вивільнення Ca^{2+} із CP.....	61
3.1.5.2. Визначення внеску VGCC у вивільнення Ca^{2+} із CP	62
3.1.5.3. Порівняння підсилення P2X- та VGCC-опосередкованих Ca^{2+} сигналів при активації P2X рецепторів.....	65
3.1.6. Внесок RyRs та IP ₃ Rs у вивільнення Ca^{2+} із CP після активації P2X рецепторів.....	68
3.1.6.1. Визначення впливу дії 2-APB на трансмембранний вхід Ca^{2+}	68
3.1.6.2. Визначення впливу дії 2-APB на завантаження CP іонами Ca^{2+}	70
3.1.6.3. Внесок IP ₃ Rs у вивільнення Ca^{2+} із CP після активації P2X рецепторів.....	71
3.1.6.4. Внесок RyRs у вивільнення Ca^{2+} із CP після активації P2X рецепторів.....	72
3.1.7. Функціональний зв'язок між L-VGCCs та рецепторами CP..	75

3.2. Реєстрація скоротливої активності ГМК.....	83
3.2.1. Скоротливі відповіді м'язових смужок мезентеріальної артерії на АТФ та $\alpha\beta$ -меАТФ.....	83
3.2.2. Вплив інгібіторів IP ₃ Rs та RyRs на ізометричні фазні скорочення, викликані активацією P2X рецепторів.....	85
3.2.3. Особливості залучення трансмембранного входу іонів Ca ²⁺ до вивільнення Ca ²⁺ через RyRs і IP ₃ Rs саркоплазматичного ретикулуму.....	87
.....	
3.2.4. Порівняння внеску IP ₃ Rs та RyRs у фазне скорочення в контрольних умовах та при обмеженні входу Ca ²⁺ через L-VGCCs.....	89
3.3. Дослідження топології внутрішньоклітинних Ca ²⁺ депо.....	91
3.4. Підмембранний СР збагачений IP ₃ Rs.....	92
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	94
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	109

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

- ГМК – гладеньком’язові клітини;
- P2X рецептор – іонотропний пуринаргічний рецептор;
- CP – саркоплазматичний ретикулум;
- ПМ – плазматична мембрана;
- SERCA – Ca^{2+} - АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума;
- CPA – циклопіазонова кислота, зворотній інгібітор SERCA;
- SPCU (sub-plasmalemmal Ca^{2+} upstroke) – підмембранний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ стрибок;
- jSR – суб-плазмалемальний (“junctional”) саркоплазматичний ретикулум;
- IP_3 – інозитол 1,4,5-трифосфат;
- 2-APB – 2-аміно-етоксі-дифеніл борат;
- $[\text{IP}_3]_i$ – внутриклітинна концентрація IP_3 ;
- IP_3R – інозитол 1,4,5-трифосфатний рецептор;
- RyR – ріанодиновий рецептор;
- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутрішньоклітинна концентрації іонізованого кальцію;
- PLC – фосфоліпаза C;
- CCICR – Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} ;
- ICR – інозитол-індуковане вивільнення Ca^{2+} ;
- CCICR – канал Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} ;
- АТФ – аденозинтрифосфорна кислота;
- $\alpha\beta$ -меАТФ – $\alpha\beta$ -метиленаденозин-5’-трифосфорна кислота;
- VGCCs – потенціал-керовані Ca^{2+} канали;
- L-VGCCs – потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу;
- ДМСО – диметилсульфооксид;
- ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота;

ВСТУП

Актуальність теми.

Контроль загальної периферичної судинної резистивності, кровотоку і скорочення дрібних артерій опосередковується симпатичною нервовою системою через нейротрансмітери, які вивільнюються з нервових закінчень та активують постсинаптичні рецептори на плазматичній мембрані (ПМ) клітин гладеньких м'язів [1, 2, 3, 4]. Один з основних збуджуючих нейротрансмітерів – АТФ, що вивільнюється з симпатичних нервових закінчень, діє на артеріальні міоцити через активацію P2X пуринорецепторів [5, 6, 7]. В серцево-судинній системі P2X рецептори експресуються переважно на гладеньком'язових клітинах (ГМК) [3, 8, 9]. Збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію $[Ca^{2+}]_i$, викликане активацією P2X рецепторів, є результатом комбінованого внеску декількох пов'язаних процесів: входу Ca^{2+} через плазматичну мембрану безпосередньо через P2X рецептори, входу Ca^{2+} через потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу (L-type voltage-gated cation channels, L-VGCCs), які активуються P2X-рецептор-опосередкованою деполяризацією мембрани, і вивільненням Ca^{2+} із внутрішньоклітинних кальцієвих депо за механізмом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) [10, 11], залучаючи Ca^{2+} чутливі кальцієві канали саркоплазматичного ретикулуму (СР) ГМК. Проте, залучення CICR механізму в ГМК як і раніше викликає багато дискусій [3, 12, 13]. Дійсно, відносний внесок вивільнення Ca^{2+} із СР у внутрішньоклітинну $[Ca^{2+}]_i$ мобілізацію варіює в різних типах ГМК, і часто залежить від концентрації діючої речовини та засобу стимулювання. Хоча вивільнення Ca^{2+} із СР, викликане входом Ca^{2+} в клітину через VGCCs, було показано при фіксації потенціалу в експериментах, виконаних на різних типах вісцеральних та судинних ГМК [14, 15, 16, 17, 18], існує ряд досліджень [наприклад 19, 20],

які демонструють, що повне спустошення СР від Ca^{2+} не зменшує $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт, викликаний ступінчастою деполяризацією клітинної мембрани. Останнє означає, що CICR не залучається у цей механізм. Альтернативне пояснення, надане Бредлі та ін. [19], показує, що СР і сарколема можуть утворювати пасивний фізичний бар'єр для входу Ca^{2+} ("Ca²⁺ trap"), який зазвичай обмежує підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, викликане деполяризацією. Речовини, які сприяють вивільненню Ca^{2+} через інозитолтрифосфатні (inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), IP₃Rs) і р'янодинові (ryanodine receptors, RyRs) рецептори СР і полегшують витік Ca^{2+} із СР, зменшують вплив "Ca²⁺ trap", і можуть, таким чином, збільшити амплітуду $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнту, що призводить до входу Ca^{2+} через VGCCs навіть коли СР містить мало Ca^{2+} або СР спустошений [19].

Іншим важливим аспектом Ca^{2+} сигналізації в ГМК є різниця у здатності різних механізмів входу Ca^{2+} викликати вивільнення Ca^{2+} із СР. Ця варіабельність може виникнути як результат просторової організації та молекулярного складу внутрішньоклітинних субодиниць RyRs [21, 22, 23, 24, 25]. Візуалізація кальцієвих мікродоменів в міоцитах змінила наше розуміння Ca^{2+} сигналізації і надала прямі докази для підтвердження концепції, що замкнена система органел має специфічні біохімічні функції ("концепція локального контролю"; [26]). Нещодавно ця концепція еволюціонувала у гіпотезу, що ділянки клітини, які знаходяться між органелами, в наслідок їх наноструктури, є також функціонально спеціалізованими регіонами, що забезпечують важливі клітинні процеси [27, 28].

Проте, незважаючи на значну кількість експериментальних даних, на сьогодні залишається ще багато питань, щодо механізмів кальцієвої сигнальної системи міоцитів гладеньких м'язів, і, зокрема, архітектури $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідей на стимуляцію P2X рецепторів судинних ГМК.

Таким чином, детальна характеристика механізмів підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в артеріальних міоцитах у відповідь на активацію P2X

пуринорецепторів є актуальною проблемою, вивчення якої є основою ідентифікації потенціальних молекулярних мішеней терапії артеріальної гіпертензії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась згідно з тематичними планами науково-дослідної роботи Лабораторії молекулярної фармакології та біофізики клітинної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за темами «Механізми збуджувальної та гальмівної дії нейромедіаторів на гладенькі м'язи в нормі та патології» (2008-2010, (номер державної реєстрації 0107U005324), «Фармакологічна модуляція механізмів збудження-гальмування гладеньких м'язів у нормі та патології» (2011-2013, номер державної реєстрації 0110U004758), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2016, номер державної реєстрації 0113U007273).

Мета і задачі дослідження.

Мета роботи полягала у з'ясуванні мембранних та внутрішньоклітинних механізмів змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) при активації P_2X рецепторів артеріальних ГМК.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі **задачі**:

- Провести аналіз відносного внеску механізмів входу Ca^{2+} в клітину та його вивільнення із внутрішньоклітинних депо у підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) у відповідь на селективну стимуляцію P_2X рецепторів свіжоізольованих артеріальних міоцитів.

- Дослідити внесок L-VGCCs плазматичної мембрани, IP₃Rs і RyRs рецепторів CP у процес мобілізації Ca²⁺ при активації P2X рецепторів свіжоізольованих артеріальних міоцитів.
- Дослідити просторову організацію CP та просторову локалізацію IP₃Rs та RyRs поодиноких ГМК мезентеріальної артерії за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії.
- Дослідити відносний внесок механізмів мобілізації [Ca²⁺]_i, які залучаються до активації фазних скорочень мезентеріальної артерії морської свинки у відповідь на стимуляцію P2X пуринорецепторів.

Об'єкт дослідження:

- Кальцієві транзєнти, що викликаються активацією P2X рецепторів ізольованих артеріальних міоцитів;
- Скоротливі реакції кільцевих сегментів мезентеріальної артерії на активацію P2X рецепторів.

Предмет дослідження – динаміка змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ([Ca²⁺]_i) артеріальних гладеньком'язових міоцитів.

Методи дослідження – метод лазерної конфокальної мікроскопії, метод тензометрії, метод фіксації потенціалу «петч-клемп», методи статистичного аналізу отриманих даних.

Наукова новизна отриманих результатів.

В дисертаційній роботі за допомогою метода конфокальної мікроскопії та інгібіторів L-VGCCs, сарко/ендоплазматичної кальцієвої АТФ-ази (SERCA), IP_3Rs , $RyRs$, фосфоліпази C були детально досліджені зміни $[Ca^{2+}]_i$ та участь вищезазначених компонентів у збільшенні $[Ca^{2+}]_i$ при активації P2X рецепторів селективним агоністом $\alpha\beta$ -меАТФ. Вперше продемонстровано, що активація P2X рецепторів ГМК мезентеріальних артерій викликає паралельне включення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які розрізняються за своїм внеском у створенні загальної внутрішньоклітинної $[Ca^{2+}]_i$ відповіді: вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори. Вперше показано, що за близьких фізіологічних умов, коли в пуринаргічній сигналізації артеріальних міоцитів задіяні і P2X рецептори, і L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за участю і IP_3Rs , і $RyRs$. Було відмічено, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} в основному пов'язане з активацією L-VGCCs. Виявлено зміни амплітуди фазного ізометричного скорочення кільцевих де-ендотелізованих сегментів мезентеріальної артерії морської свинки, які підтвердили, що Ca^{2+} із CP вивільнюється через обидва типи рецепторів – IP_3Rs та $RyRs$ та бере участь у генерації фазного скорочення, викликаного пуринаргічною стимуляцією. Імунофлуоресцентне забарвлення IP_3Rs і $RyRs$ виявило, що IP_3Rs експресовані переважно у субплазмалемальному CP, в той час як $RyRs$ розміщені на центральних та навколоядерних елементах CP.

Таким чином, отримані результати істотно розвивають сучасні уявлення щодо механізмів кальцієвої сигналізації, які виникають при активації P2X рецепторів гладеньких м'язів судин.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Ця робота належить як до фундаментальних досліджень, так і має важливе практичне значення. З одного боку, отримані результати розширюють та поглиблюють розуміння клітинних і молекулярних механізмів регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів кровоносних судин та можуть бути включені в лекційні курси біофізики, фізіології та патофізіології. З іншого боку, отримані результати окреслюють потенціальні фармакологічні мішені для терапії захворювань серцево-судинної системи та інших захворювань пов'язаних з порушеннями регуляції кровообігу.

Особистий внесок здобувача.

Всі експерименти, описані в дисертаційній роботі, такі як виділення функціонально повноцінних ГМК та сегментів судин, обробка експериментального матеріалу були виконані особисто автором. Постановка задачі досліджень, обговорення та узагальнення результатів, формулювання висновків проводилась під керівництвом к.б.н., п.н.с. Д.В. Гордієнка, дослідження фазних скорочень кільцевих сегментів мезентеріальної артерії проводились спільно з к.б.н., с.н.с. В.О. Бурим.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення роботи доповідались та обговорювались на наукових міжнародних і національних конференціях та симпозіумах, зокрема на:

- Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, Україна, 2006),
- International Symposium «Calcium Channels and Transporters» (Manchester, Great Britain, 2007),
- Society's Vascular & Smooth Muscle Physiology Themed Meeting (King's College London, Great Britain, 2008),
- International Conference «Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling» (Kyiv, Ukraine, 2009),
- III Съезде физиологов СНГ, «Физиология и здоровье человека» (Ялта, Украина, 2011),
- The Main Meeting of the Physiological Society «Physiology 2012» (Edinburgh, Great Britain, 2012),
- XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, Україна, 2014),

а також на семінарах сектора молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Публікації.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано тринадцять праць - у шести журнальних статтях, в тому числі дві статті у наукових фахових виданнях України і чотири статті у наукових періодичних закордонних виданнях, та в тезах доповідей сіми наукових міжнародних та національних конференціях та симпозіумах.

Структура та обсяг роботи.

Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладання результатів дослідження, їх обговорення, висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 140 сторінках і проілюстрована 34 рисунками. Бібліографічний список включає 235 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Кальцієва сигналізація в гладеньком'язових клітинах при активації пуринорецепторів.

Збільшення катіонної провідності при P2X-рецепторній активації призводить до деполяризації плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин (ГМК), що, в свою чергу, активує потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу (L-VGCCs) [29, 30]. Кальцій (Ca^{2+}), що проникає в клітину через активовані P2X рецептори та L-VGCCs викликає подальше вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних запасників. Це може відбуватися завдяки механізму Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR) через ріанодинові рецептори (RyRs) [31, 12] або через активацію інозитолтрифосфатних рецепторів (IP₃Rs) [31, 12] саркоплазматичного ретикулу (SR).

P2X рецептори опосередковують швидкий трансмембранний катіонний струм, внаслідок якого зростає внутрішньоклітинна концентрація іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) та деполяризується мембрана клітини. Безпосередній вхід зовнішньоклітинного кальцію через канал є важливим фактором, що збільшує його концентрацію в цитоплазмі. Однак, найбільш імовірно, що головну роль тут відіграють L-VGCCs які активуються внаслідок деполяризації мембрани. Оскільки такий механізм передачі сигналу не залежить від синтезу та дифузії вторинних посередників у цитозолі чи клітинній мембрані, то час спрацьовування такої системи надзвичайно малий. Саме тому P2X рецептори відіграють значну роль у швидкій міжнейронній сигналізації та регуляції скорочення м'язів.

1.2. Загальна характеристика P2 рецепторів.

1.2.1. Класифікація P2X рецепторів.

Наразі виявлено два підсімейства поверхневих P2 пуринорецепторів - іонотропні рецептори P2X, які являють собою неселективний катіонний канал, і метаботропні рецептори P2Y, які не проникні для іонів і пов'язані з клітинними G-білками. P2Y рецептори знайдені на клітинах ендотелію кровоносних судин. Стимуляція цих рецепторів призводить до вивільнення оксиду азоту і вазодилатації [32, 33].

P2X рецептори належать до родини ліганд-керованих іонних каналів, але вони істотно відрізняються від інших каналів цієї родини за їх молекулярною архітектурою та стехіометрією субодиничного складу [34]. Наразі відомо сім генів P2X₁₋₇, що кодують субодиниці з яких складаються P2X рецептори [35]. Ці субодиниці можуть бути зібрані в різних конфігураціях з утворенням функціональних гомо- або гетеромерних катіонних каналів [8, 36], утворюючи тримерні канали, що відкриваються у відповідь на зв'язування із зовнішньоклітинними молекулами АТФ [6, 35].

1.2.2. Молекулярна структура P2X рецепторів.

Припущення тримера як структурної одиниці P2X рецепторів було отримано за допомогою електрофізіологічних досліджень [37], а підтвердження отримали після опублікування даних про кристалічну структуру P2X₄ рецептору [38]. На сьогоднішній день відомо про існування 7 гомомерних та, щонайменше, 13 гетеромерних P2X рецепторів [38]. Кожна субодиниця складається з позаклітинної доменної петлі – ектодомену [39, 40, 41, 42, 43] і з двох трансмембранних доменів (TM1 і TM2), які перериваються послідовністю амінокислотних залишків, а NH₂- та COOH⁻ кінці знаходяться у цитоплазмі [34, 38, 44, 45]. Відмінності

підтипів рецепторів в основному відображаються в довжині С-кінцевого фрагмента молекули білка [46].

Внаслідок цього, обидва позитивно заряджені і гідрофобні амінокислотні залишки, які належать до різних структурних доменів рецептора, оточують АТФ-зв'язані молекули. Тому загальна структура кожної субодиниці рецептора нагадує «стрибаючого дельфіна», що виринає з океану - домени, що їх утворюють, складаються з верхньої частини тіла, нижньої частини тіла та спинного плавнику, а океан – плазматична мембрана. Вивчаючи кристалічну структуру P2X4 рецептора, група американських вчених [38] вперше детально описала так званий “лівий плавник” (left flipper), який представляє собою позаклітинну петлю – ектодомен. Вважається, що в межах «лівого плавнику» знаходиться сайт зв'язування з агоністом, формуючи специфічну застібку для утримання агоністу у сайті [38, 47, 48] і також сайти зв'язування для антагоністів та модуляторів [49, 50, 51].

Після зв'язування АТФ в ектодоміні, який довжиною близько 280 амінокислот, відбувається швидка і значна зміна конформації рецептора, що призводить до відкриття іонної пори [52, 53] і протікання неселективного катіонного струму в клітину [8, 54, 55].

1.2.3. Механізми десенситизації P2X рецепторів.

Особливістю іонотропних пуринових рецепторів є їх здатність до швидкої десенситизації, тобто втрати чутливості рецептора до агоніста при тривалому контакті з ним, і, як наслідок, припинення неселективного катіонного струму через рецептори. Наприклад, ензиматично стійкий синтетичний аналог АТФ - $\alpha\beta$ -метилен-АТФ, який використовують як селективний агоніст P2X1 рецепторів [35], викликає швидко скоротливу відповідь клітини і на порядок перевищує скоротливу відповідь на АТФ.

При цьому подальше додавання будь-яких агоністів P2X рецепторів вже не викликає ніякої реакції у відповідь значний проміжок часу.

В одних підтипах P2X рецепторів десенситизація спостерігається в інтервалі мілісекунд від початку аплікації (швидка десенситизація: P2X1, P2X3), у інших – в 100 – 1000 разів повільніше (повільна десенситизація: P2X2, P2X4). Десенситизація не спостерігається при малих концентраціях агоністу (менша чи еквівалентна EC_{50}), але стає вагомою при концентрації більшій 1 мкМ. Тривалість процесу повернення до вихідного стану активності каналу після десенситизації є довгою і повільною. Наступні аплікації АТФ або інших аналогів, які б викликали появу струму, можливо робити лише після 6-10 хвилин і довше [35].

1.2.4. Електрофізіологічні властивості P2X рецепторів.

Перші повідомлення про те, P2X рецептори проникні для іонів кальцію були отримані методом фіксації потенціалу «петч-клемп» на вушній артерії кролика [55, 57]. Пізніше стало відомо, що катіонні канали, які утворюють P2X-рецепторні субодиниці, мають схожу проникність для Na^+ і K^+ , і мають значну проникність для Ca^{2+} [8, 55], за винятком P2X5 рецептора, який крім того проникний для іонів хлору [44, 56, 58]. Наприклад, було зареєстровано для P2X1 і P2X4 рецепторів співвідношення проникності Ca^{2+} до Na^+ (P_{Ca}/P_{Na}), що відповідно складає 4,8 і 4,2 [35, 59]. Ця властивість входу Ca^{2+} мабуть є важливою складовою фізіологічної відповіді, яка опосередковується P2X рецепторами *in vivo*, і може викликати порушення нормального входу Ca^{2+} через P2X рецептори, що може також сприяти розвитку патологій, пов'язаних з P2X рецепторами. Слід зазначити, що АТФ-індуковані струми через P2X рецептори можуть модулюватися катіонами: так Mg^{2+} та Ca^{2+} пригнічують струми через деякі типи P2X рецепторів, можливо, знижуючи афінність

АТФ-зв'язуючого сайту за рахунок алостеричних змін структури рецептора [60, 61]. Модуляція активності АТФ-зв'язуючого сайту може відбуватися і за рахунок зовнішньоклітинних протонів (H^+): кисле рН призводить до збільшення, а лужне – до зменшення амплітуди струмів [62]. Це може бути особливо важливим для сигналізації, що опосередковується P2X рецепторами, за патологічних умов, коли внаслідок пошкодження чи запалення зовнішньоклітинне рН може різко змінюватися. Також амплітуда струмів через P2X3 рецептори залежить від температури [63].

1.2.5. Фізіологічна роль P2X рецепторів в ГМК судин.

У серцево-судинній системі P2X рецептори відіграють важливу роль в контролі судинного тону, кров'яного тиску і загальної периферичної судинної резистивності [64, 65, 66]. В артеріальних гладеньком'язових клітинах активація P2X рецепторів пуринергічними агоністами або АТФ, що вивільнюється з симпатичних нервів, призводить до мембранної деполяризації і звуження судин. Але у різних типах судин P2X рецептори можуть утворювати як гомомерні канали, так і різні варіації гетеромерних субодиниць каналів [36], часто комбінуючи наприклад, P2X2/3, P2X2/4 або P2X1/5 рецептори.

Використовуючи специфічні антитіла до P2X рецепторних ізоформ було підтверджено розподіл цих рецепторів в мембранах судин. За фармакологічними властивостями P2X рецептори мезентеріальних і церебральних артерій схожі до гомомерних P2X1 субодиниць, в той час як у коронарних судин P2X рецептори мають інший фенотип – P2X4 та P2X5 рецепторні ізоформи [67, 68]. Вищезазначені дослідження виявили цілий ряд подібностей та відмінностей в P2X-рецептор-опосередкованій відповіді цих судин і показують, що властивості P2X-рецептор-

опосередкованої вазоконстрикції залежать від типу досліджуваних судин і визначаються їх функціональними характеристиками.

Схожі реакції P2X -подібних відповідей були також описані на інших препаратах гладеньких м'язів [5, 8, 54]. Крім того дослідження на P2X-рецептор-дефіцитних трансгенних мишах показали, що P2X рецептори є важливою складовою P2X рецепторного фенотипу нативних гладеньких м'язів [69]. В імуногістохімічних дослідженнях було показано внесок P2X4 і P2X5 рецепторних субодиниць, однак, ще належить визначити які функції визначаються цим внеском.

1.3. Потенціал-керовані кальцієві канали. Загальна характеристика.

Артеріальні гладеньком'язові клітини активно реагують на вазоактивні стимули, змінюючи діаметр артерій і кровоток. Зміни тону судин є результатом фосфорилування легких ланцюгів міозину, процес, що динамічно регулюється входом Ca^{2+} із позаклітинного простору [7]. Потенціалкеровані Ca^{2+} канали є найбільш важливими мембранними структурами, що регулюють вхід позаклітинних іонів Ca^{2+} у відповідь на їх електричну активність, а отже є своєрідними інтеграторами та трансформаторами електричної активності у внутрішньоклітинні Ca^{2+} сигнали [70, 71, 72]. Більше того, L-VGCCs одночасно самі приймають участь у електричній активності, зокрема у формуванні потенціала дії, низькопорогових спайках, пачковій активності після деполяризації [71, 74].

1.3.1. Класифікація VGCC каналів.

Існує шість підтипів L-VGCCs, що різняться по чутливості до мембранного потенціалу та фармакологічним речовинам, а також по провідності: L-, T-, Q-, R-, N- і P-типи. Перші два типи каналів отримали назву по тривалості інактивації, а два останніх по типу клітин, де вони

були виявлені. В гладеньких м'язах присутні тільки L- та T-тип, причому T-тип Ca^{2+} -каналів присутній не в усіх клітинах, вони швидко інактивуються, і їх внесок в загальний кальцієвий струм, як правило, не значний [73]. Однак було відзначено важливу роль T-каналів у формуванні міогенного тонуусу церебральних артерій щурів [74]. Крім того, дані показують, що кожен струм сприяє, хоча нерівномірно, для підтримки міогенного тонуусу, ключовій фізіологічній реакції мозкового кровообігу. L-тип Ca^{2+} каналів вважається головним шляхом надходження Ca^{2+} в клітину [73].

Ca^{2+} канали L-типу швидко інактивуються впродовж тривалої деполяризації. Однак, гіперкалієва деполяризація викликає тривале збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та тривале скорочення. Електрофізіологічні дослідження показали, що деполяризація викликає Ca^{2+} струм, що досягає свого максимуму за 10 мілісекунд і далі спадає до низького рівня. Цей маленький вхідний струм називають «віконним струмом», що не інактивується і він відповідає за тривалі збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [75].

1.3.2. Молекулярна структура L-VGCC.

На основі розкриття послідовності формуючої макромолекули складових L-VGCCs була побудована загальна схема структурної композиції каналу, яку спочатку було розшифровано для кальцієвих каналів скелетних м'язів [76], але далі з'ясувалося, що вона принципово подібна і для інших типів таких каналів клітин будь яких тканин.

Всі кальцієві канали L-типу являють собою гетеро-олігомерні комплекси, які складаються з 5 субодиниць, основною з яких є α_1 — субодиниця, що формує пору та виконує функцію кальцієвого каналу і допоміжних субодиниць, які впливають на характеристики провідності [78].

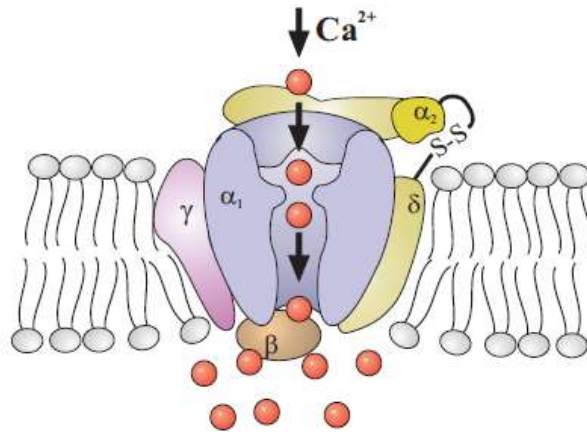


Рис. 1.1. Схема структури L-VGCC. Основна α_1 субодинаця являє собою трансмембранний білок, що містить іонопроникну пору, через яку іони кальцію можуть проходити при активації L-VGCC. α_1 -субодинаця регулюється також допоміжними субодинацями: внутрішньоклітинною β -субодинацею, трансмембранною γ -субодинацею і комплексом позаклітинних α_2 субодинаці і трансмембранною δ субодинацею, які з'єднані дисульфідним містком (S-S).[77]

На рис. 1 схематично представлена структура мембранного потенціалкерowanego каналу, а на рисунку 2 – запропонована схематична будова α_1 -субодинаці.

α_1 -субодинаця складається з чотирьох доменів, кожна з яких містить шість трансмембранних сегментів, S4 несе позитивний заряд, а петля між п'ятим і шостим сегментом утворює пору, що обумовлює іонну селективність [79, 80, 81].

Молекулярні дослідження виявили три класи α_1 -субодинаць (Cav₁₋₃), і в рамках кожної категорії є кілька підтипів. Cav₁/Cav₂ субодинаці відображають електричні властивості, характерні для високопорогових

Ca^{2+} каналів (до них відносять, L -P / Q-, N- і R-типу) [82]. На відміну від цього, Ca_v3 субодиниці кодуєть Ca^{2+} канали, що на основі потенціал-залежності активації відносяться до низькопорогових (до них відносять тип T Ca^{2+} каналів) [83, 84].

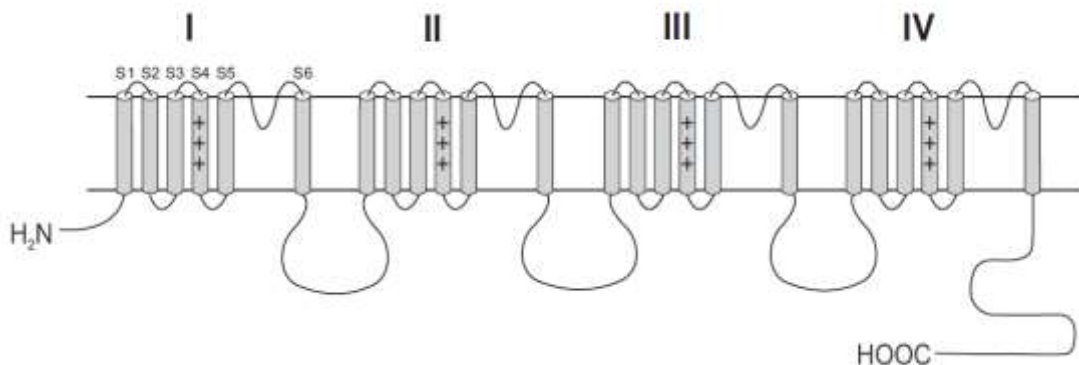


Рис. 1.2. Запропонована схематична будова α_1 -субодиниці VGCC.

α_1 субодиниця складається з чотирьох гомологічних доменів I-IV, кожен з яких містить шість трансмембранних сегментів S1-S6 і пору між сегментами S5 і S6. Передбачувані α_1 -спіралі показані у вигляді циліндрів. Четвертий трансмембранний сегмент S4 в кожному домені містить кількість залишків аргініну (в основному), що обумовлює позитивний заряд [77].

1.3.3. Нова метаботропна функція L-типу потенціалкеруваних Ca^{2+} каналів (L-VGCCs) в ГМК судин.

Хоча відома класична іонотропна роль L-типу потенціалкеруваних Ca^{2+} каналів (L-VGCCs), ми розглядаємо тут дані, що свідчать про нову метаботропну функцію L-VGCCs в гладеньком'язових клітинах судин [85]. Активація L-VGCCs може викликати вивільнення Ca^{2+} із СР у відсутність позаклітинного Ca^{2+} . Під час деполяризації, L-VGCCs можуть активувати G білки і фосфоліпазу C (phospholipase C, PLC)/інозитол 1,4,5-трифосфат

(IP₃) шлях, що веде до вивільнення Ca²⁺ із СР та скорочення артерій. Ця нова метаботропна функція L-VGCCs, названа як кальцій-канал-індуковане вивільнення кальцію (canal Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, CCICR), відіграє важливу роль в тонічній скоротливості судинних гладеньких м'язів та пов'язує тривалу деполяризацію мембрани і активацію Ca²⁺ каналу з метаботропним вивільненням Ca²⁺ із СР і тонічне скорочення гладеньких м'язів. Ця нова роль L-VGCCs може мати велику функціональну значимість для патогенезу спазмів судин, що опосередковуються деполяризацією мембрани і вазоактивних агентів, які можуть активувати L-VGCCs. Чітке розуміння CCICR могло б сприяти оптимізації фармакологічного лікування в клінічних умовах, де рекомендуються антагоністи Ca²⁺ каналів.

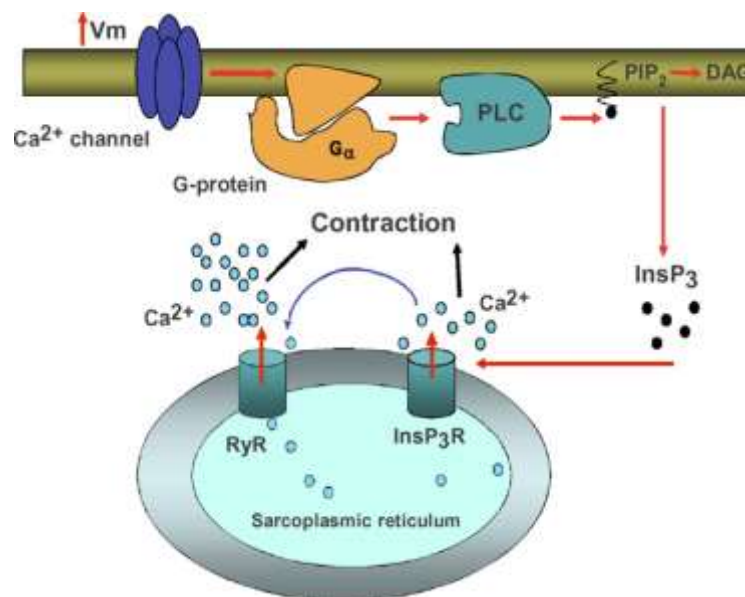


Рис.1.3. Схематична модель ілюструє молекулярний механізм, що лежить в основі кальцій канал-індукованого вивільнення Ca²⁺ [85].

Зважаючи на вище визначене, групою іспанських вчених, була запропонована схема потенціалкерованих конформаційних змін L-типу Ca²⁺ каналів, пов'язаних з активацією G-білка і з подальшою стимуляцією

PLC та синтезу IP_3 [85]. Цей месенжер дифундує в цитозолі і шляхом зв'язування з IP_3 рецепторами викликає вивільнення Ca^{2+} із СР. Підсилення Ca^{2+} сигналу досягається подальшою активацією ріанодинових рецепторів, таким чином, збільшується $[Ca^{2+}]_i$, що призводить до скорочення міоцитів. ССІСР пояснює чому скорочення судин може відбуватися без необхідності входу позаклітинного Ca^{2+} в клітину, явище, яке неодноразово спостерігалось в численних попередніх публікаціях.

Таким чином, були підсумовані дані, які показують несподівану функцію потенціалкерованих Ca^{2+} каналів в артеріальних міоцитах і новий механізм сигналізації від клітинної мембрани до СР. На додаток до їх відомої іонотропної функції, Ca^{2+} канали можуть діяти в якості сенсорів напруги, здатних швидко викликати G-білок-залежне вивільнення Ca^{2+} із СР, що веде до скорочення клітин артерій. Цікаво, що ССІСР може модулюватися АТФ, вазоактивним агентом, який вивільняється з симпатичних нервових терміналів або з клітин крові після крововиливу. Дійсно, позаклітинний АТФ сприяє скороченню артеріальних міоцитів, яке було викликане ССІСР селективною активацією L-типу Ca^{2+} каналів [91]. Одночасна активація Ca^{2+} каналів навіть незначною мембранною деполаризацією і агоністами Ca^{2+} каналів (наприклад, як АТФ) може призвести до потужних ССІСР сигналів, здатних викликати аномальні артеріальні скорочення або навіть спазми при патологічних ситуаціях.

1.4. Роль саркоплазматичного ретикулула як накопичувача іонів Ca^{2+} .

Сарко/ендоплазматичний ретикулум є структурою, роль якої у зміні часових та амплітудних характеристик кальцієвих сигналів добре вивчена. Сарко/ендоплазматична мережа СР/ЕР) є основним запасником іонів кальцію та має канали на своїй поверхні для вивільнення внутрішньоклітинних іонів кальцію (Ca^{2+}) у багатьох збудливих клітин. СР являє собою трубчасту мережу, яка в гладеньких м'язах (ГМ) клітини

розташована близько до периферії клітини (поверхневий СР) і в більш глибоких частинах клітини (глибиний СР). В останній час увага була зосереджена на регуляції функції клітин за допомогою поверхневого СР, які можуть виступати в якості буфера, а також в якості регулятора мембранних каналів і транспортерів. Ca^{2+} вивільнюється із СР за допомогою двох типів іонних каналів – ріанодинових (RyRs) і інозитол 1,4,5-трифосфатних (IP₃Rs) рецепторів, а накопичення іонів Ca^{2+} із цитоплазми відбувається виключно за допомогою помпи - енерго-залежної сарко-ендоплазматичної транспортної Ca^{2+} -АТФази (SERCA). Ці Ca^{2+} -АТФази накопичують Ca^{2+} в просвіті СР в достатньо високій концентрації. Так як просвіт містить високі концентрації Ca^{2+} зв'язуючих білків (*а в СР іони Ca^{2+} зв'язані з різними білками*), то загальна кількість Ca^{2+} в просвіті може бути >1 мМ; концентрація вільного Ca^{2+} , за оцінками, становить від 100 до 700 мкМ [92, 93, 94]. На противагу цьому, концентрація Ca^{2+} в цитоплазмі не стимульованої клітини становить від 50 до 100 нМ, тобто на 3-4 порядку нижче, ніж у просвіті СР. Ця низька концентрація підтримується за допомогою Ca^{2+} насосів та інших транспортерів Ca^{2+} , розташованих в СР а також в плазмі, мембранах.

Після накопичення в СР, Ca^{2+} переходить в слабозв'язану форму і доступний до вивільнення. Однак, двовалентний катіон не існує в іонізованій формі, оскільки це призвело б до інгібування SERCA, як згадувалося вище.

1.5. IP₃Rs саркоплазматичного ретикулума

1.5.1. Загальна характеристика IP₃Rs.

Інозитол- 1,4,5-трифосфатні (IP₃) рецептори (IP₃Rs) являють собою родину кальцієвих каналів, локалізованих переважно в ендоплазматичній мережі всіх типів клітин. Регуляція численних клітинних фізіологічних

процесів відбувається завдяки функціонуванню цих рецепторів - при вивільненні Ca^{2+} в цитоплазму у відповідь на IP_3 створюються складні локальні і глобальні Ca^{2+} сигнали. IP_3Rs це кальцій-селективні катіонні канали, які регулюються не тільки IP_3 , а й іншими лігандами, а також, зокрема, цитоплазматичними іонами Ca^{2+} , внутрішньоклітинним АТФ та інше. За останнє десятиліття, отриманні данні про функціонування IP_3Rs і їх регулювання лігандами та білками. В цьому розділі будуть розглянуті узагальнення даних літератури, що стосуються структури і функцій IP_3Rs .

1.5.2. Класифікація та молекулярна структура IP_3Rs .

До сімейства IP_3Rs належить, щонайменше, три ізоформи, тип 1 ($\text{IP}_3\text{R1}$), тип 2 ($\text{IP}_3\text{R2}$), і тип 3 ($\text{IP}_3\text{R3}$), кожен кодується окремим геном та має однакову гомологію амінокислотних залишків - від 60 до 70% [95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102]. Ці ізоформи, кожна приблизно по 300 кДа, мають однакову структурну та функціональну організацію [95, 98, 103]: опуклий ліганд-зв'язуючий домен в N-кінцевій частині (приблизно 24% всієї молекули рецептора), велика «муфта» (яка відповідає за регуляцію та модуляцію рецептора), середня частина (приблизно 60% молекули), яка відповідає за передачу сигналу від місця зв'язування з лігандом і також має місце зв'язування для Ca^{2+} , АТФ, і фосфорилування протеїнкінази, і короткий домен Ca^{2+} каналу в C-кінцевій частині. Тривимірна структура $\text{IP}_3\text{R1}$ була визначена за допомогою електронної кріомікроскопії і одночасткових реконструкцій з використанням імунологічно очищених і функціональних $\text{IP}_3\text{R1}$, виділені з бичачого мозочка [104]. Як і очікувалося, канал утворює тетрамер симетричної структури, розділений на ділянки, що нагадують закручені лопаті пропелера – pinwheel, які займають біля 80% загального обсягу тетрамера, та розташованої центральної ділянки – квадрата, що займає 20% залишок від обсягу тетрамера).

Ділянка *pinwheel*, ймовірно, розміщується в цитоплазмі, тоді як квадратна ділянка включає в себе трансмембранний домен і повернута в просвіт *CP* так, що приблизно 89% тетрамера розміщено в цитоплазмі, і лише частина в трансмембранному домені каналу. Модель також передбачає місця зв'язування з IP_3 в певних регіонах *pinwheel* тетраметру, який розміщений в цитоплазматичній області IP_3R1 , що призводить до низки конфірмаційних перетворень, кінцевою ланкою якої становить відкриття каналу.

Будь яка ізоформа IP_3Rs складається із 6 протомер, кожна з яких перетинає мембрану *CP*, що нагадує будову потенціалкерованих або ліганд-керованих іонних каналів в плазматичній мембрані [105]. Ці протомери IP_3Rs з'єднуються по С-кінцю в гомотетрамери, або, на відміну від протомер *RyR*- ізоформ, в гетеротетрамерні канали. Досі неясно, які відмінності в складі ізоформи впливають на зв'язування з лігандом або на властивості каналів вивільнювати Ca^{2+} [103, 106, 107, 108]. IP_3Rs локалізуються в кавеолах гладеньких м'язів судин і ендотеліальних клітин [109], і їх розподіл може бути пов'язаний з актином [110]. В мозку щільність IP_3Rs в 100 разів більше, ніж гладеньких м'язах, але було показано, що це не впливає на спорідненість рецептора до ліганду (2,1 в порівнянні з 2,4 нМ) [111, 112].

1.5.3. ПСР – основний шлях вивільнення Ca^{2+} із *CP*.

Іно повідомив, що механізм інозитол-трифосфатного вивільнення Ca^{2+} (1,4,5-trisphosphate (IP_3)-induced Ca^{2+} release, ПСР) в гладеньких м'язах посилюється субмікромолярними концентраціями цитоплазматичного Ca^{2+} [113, 114]. Пізніше було показано, що активність IP_3Rs залежить від цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} і ця залежність двофазна, з максимумом близько 300 нМ [115]. Присутність іонів Ca^{2+} має миттєвий вплив на швидкість вивільнення Ca^{2+} , викликаного IP_3 [116].

Пізніші дослідження групи Iino продемонстрували, що наявність IP_3 , навіть при дуже високих концентраціях, є сама по собі не достатня, щоб активувати IP_3Rs і що для активації IP_3Rs одночасно потрібні як IP_3 , так і Ca^{2+} [117]. Таким чином, очевидно, що IP_3Rs чутливі до одночасного збільшення IP_3 і Ca^{2+} таким чином, що Ca^{2+} підсилює ПСР без зміни спорідненості IP_3Rs до IP_3 ; підвищення цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} від 100 нМ до 300 нМ викликає майже 7-кратне збільшення вивільнення Ca^{2+} при наявності IP_3 [117]. Однак, мікромольні концентрації Ca^{2+} зменшують спорідненість IP_3Rs ; 0,3 мкМ Ca^{2+} призводить до 50% інгібування рецепторів [118]. Також було продемонстровано, що для IP_3Rs такі високі концентрації Ca^{2+} регулюють перегрупування периферійного регіону молекули [119]. Таким чином підсумовуючи, можна зробити висновок, що ці дані мають особливе значення для розуміння генерації і поширення Ca^{2+} хвиль [117].

У більшості типів гладеньком'язових клітин збуджуючі агоністи (наприклад, нейротрансмітери) пов'язані з певним класом протеїнів плазматичної мембрани (GPCR), з G_q - або G_{q11} протеїнами. Активація фосфоліпази C ($PLC-\beta$ і $PLC-\gamma$) за допомогою широкого спектра стимулів, включаючи взаємодію ліганду з білками типу G або тирозинкіназою пов'язані з цими рецепторами. PLC гідролізує мембранний ліпід фосфатидилинозитол 4,5-бісфосфат (IP_2) із утворенням інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) [120, 121].

Синтезований таким чином водорозчинний IP_3 дифундує в цитоплазмі від плазматичної мембрани до СР, зв'язується з IP_3Rs в мембрані СР, що призводить до відкриття Ca^{2+} каналу IP_3Rs і вивільнення Ca^{2+} за механізмом ПСР [122, 123]. Таким чином після зв'язування IP_3 із IP_3Rs останній переходить із закритого у відкритий стан, забезпечуючи шлях для дифузії Ca^{2+} за електрохімічним градієнтом від просвіту СР в цитоплазму. Ca^{2+} в цитоплазмі рухається шляхом пасивної дифузії, зі швидкістю, яка зменшується рухомими і нерухомими Ca^{2+} зв'язуючими

білками, що діють в якості буферів. Як наслідок, мікродомени з надмірними градієнтами Ca^{2+} концентрації можуть швидко утворюватися і розсіюватися біля гирла IP_3Rs Ca^{2+} каналу. Концентрація Ca^{2+} безпосередньо біля до відкритого каналу, може бути 100 мкМ або більше, в той час як концентрація на відстані 1-2 мкм від каналу може бути нижче 1 мкМ [124, 125, 126]. Таким чином, Ca^{2+} має тільки обмежений "діапазон дії", порядку 5 мкм [127]. Коефіцієнт дифузії IP_3 в цитоплазмі дорівнює 283 мкм²/с без урахування можливого метаболізму специфічними фосфатазами і кіназами; часовий проміжок дії IP_3 обмежується його деградацією приблизно в 1с, що робить ефективним дію цього вторинного месенжера в області біля 24 мкМ [97]. IP_3Rs має один високоафінний сайт зв'язування (значення $K_D = 80$ нМ), і, за оцінками, для половини від максимального вивільнення Ca^{2+} із СР потрібно 40 нМ IP_3 .

Чутливість IP_3R -ізоформ до IP_3 відрізняється в залежності від розмірів каналу: $\text{IP}_3\text{R1} > \text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R3}$ (значення K_D 1.5, 2.5, 22.4 нм відповідно), що узгоджується з чутливістю до ПСР клітинних ліній, в яких експресуються переважно гомотетрамерні форми будь-яких з цих ізоформ [128].

Іони Ca^{2+} в просвіті СР керують чутливістю IP_3Rs до вивільнення Ca^{2+} за механізмом ПСР таким чином, що зменшення іонів Ca^{2+} також знижує чутливість до ПСР [129]. Більш того, помірне збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ підвищує чутливість до ПСР, в той час як подальше збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ має блокуючу дію [115, 116]. Фармакологічна модуляція чутливості IP_3Rs відбувається при використанні тімеросала, який збільшує спорідненість рецептора до IP_3 [130, 131]. Було відзначено, що ПСР має квантову природу [132, 133], в результаті чого при максимальній концентрації IP_3 з СР вивільнюється до 40% вмісту Ca^{2+} у свіжевиділених ГМК собак [134] і біля 84% вмісту Ca^{2+} з культивованих ГМК людини [135].

Процес ПСР може поєднуватися з агоніст-активованими механізмами входу Ca^{2+} в клітину та внеском в глобальні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигнали і

подальшою скорочувальною активністю. CICR може бути слідством просторово - локалізованого збільшення $[Ca^{2+}]_i$ - так званих « Ca^{2+} puffs» (спонтанне вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs), які є аналогічними Ca^{2+} спаркам (спонтанне вивільнення Ca^{2+} через $RyRs$) [136, 137, 138]. У відповідь на « Ca^{2+} puffs» може відбуватись або ініціювання Ca^{2+} хвиль, які потім можуть бути підсилені CICR при активації $RyRs$ з подальшим розвитком скорочувальної активності (дивись вище), або зміна Ca^{2+} -активованих провідностей плазматичної мембрани (SK і BK канали), що сприяє релаксації (або скоротлива активність кальцій-залежних хлорних каналів Cl_{Ca}), подібно як сприяють релаксації клітини Ca^{2+} спарки. Що стосується CICR, тип реагування на « Ca^{2+} puffs» визначається просторовим розташуванням IP_3Rs на CP, яке може залежати від типу гладеньких м'язів.

Цікаву теорію запропонував McCarron, яка полягає в тому, що IP_3 викликає скоротливу активність гладенької мускулатури, пригнічуючи STOCs які виникають через $RyRs$, що сприяє деполяризації мембрани, та приводить до входу Ca^{2+} через активовані потенціалкервані Ca^{2+} канали [139].

1.5.4. Просторові і часові властивості IP_3R -опосередкованих $[Ca^{2+}]_i$ сигналів.

Розподіл і концентрація Ca^{2+} -зв'язуючих білків і каналів вивільнення Ca^{2+} , а також складні властивості останніх, в тому числі IP_3R -опосередковані $[Ca^{2+}]_i$ сигнали мають різні просторові і часові властивості, які обумовлюють відповідь клітини, що робить цю сигнальну систему дивно міцною. Отже, незважаючи на експресію IP_3Rs імовірно у всіх клітинах організму, ця сигнальна система може забезпечити специфічні сигнали, які регулюють різні клітинні фізіологічні процеси. Аналіз IP_3R -опосередкованих $[Ca^{2+}]_i$ сигналів в ізольованих клітинах показав їх складність. У часовій області, ця складність проявляється як

повторюваність спарків або осциляцій з частотами, як правило, відповідними до рівня стимуляції, припускаючи, що $[Ca^{2+}]_i$ сигнали можуть бути перетворені шляхом кодування частоти, а також амплітуди. У просторовій області, $[Ca^{2+}]_i$ сигнали можуть ініціюватися в певних місцях і залишатися вельми локалізованими або розповсюджуватися у вигляді хвиль [26, 140, 141, 142]. Таким чином IP_3 -опосередковані $[Ca^{2+}]_i$ сигнали часто виникають і забезпечують різні сигнали в дискретних частинах клітини. Висока роздільна здатність оптичних зображень флуоресцентних барвників Ca^{2+} індикаторів в непошкоджених клітинах дозволили припустити, що IP_3 -опосередковані $[Ca^{2+}]_i$ сигнали можна описати трьома рівнями. Кожен рівень може забезпечити різні функції сигналізації і слугує в якості будівельного блоку для $[Ca^{2+}]_i$ сигналів на наступному рівні [26, 143, 144]. На першому рівні, "фундаментальні" Ca^{2+} сигнали призводять до відкриття одиничних IP_3Rs . Слабка активація низької концентрації $[IP_3]$ викликає локалізоване збільшення цитоплазматичного $[Ca^{2+}]_i$, яке виникає стохастично і автономно в дискретних місцях вивільнення Ca^{2+} . Ca^{2+} сигнали мають різний розмір, від маленьких, так званих «сплесків» ("blips") [144], які виникають, можливо, при вивільненні іонів Ca^{2+} через один або декілька IP_3Rs . На наступному рівні, "елементарні" сигнали виникають при одночасному узгодженому відкритті декількох груп каналів. Великі події ("puffs") включають узгоджене відкриття декількох груп каналів IP_3Rs , об'єднаних в кластери. [145]. Скоординоване відкриття декількох каналів ініціюється вивільненням Ca^{2+} з одного каналу, що діє як активуючий ліганд для стимулювання вивільнення Ca^{2+} із сусідніх каналів через процес Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) (обговорення см нижче приблизно акти- колокалізації з ефекторними білками дозволяє просторово обмежені фундаментальні та елементарні сигнали, щоб надати специфіку клітинних реакцій [143, 146]. На третьому рівні, висока концентрація $[IP_3]$ пов'язана із сильною позаклітинною стимуляцією агоніста, що викликає вивільнення Ca^{2+} з

одного сайту кластера IP_3Rs , потім вивільнення Ca^{2+} в суміжних ділянках за механізмом CICR, що призводить до генерації Ca^{2+} хвиль, які поширюються подібно стрибку [147, 148, 149] при швидкостях кілька десятків мікрон за секунду послідовних циклів вивільнення Ca^{2+} , дифузії та CICR [26, 150]. Просторова організація IP_3 -рецепторних каналів в кластері і розподіл кластерів, разом з позитивним регулюванням IP_3Rs , яке відбувається за рахунок IP_3 і Ca^{2+} (ICR), робить можливим розповсюджувати локальні та глобальні Ca^{2+} сигнали в залежності від функціонування окремих IP_3Rs . Якщо цитоплазму описати як збудливе середовище: сукупність місць вивільнення Ca^{2+} пов'язані з месенджером дифузії (Ca^{2+}) і автокаталітичним процесом (CICR) [151], то IP_3Rs є фундаментальним будівельним блоком цього збудливого середовища. Тим не менш, вищевідзначене не враховує всі властивості IP_3R -опосередкованого Ca^{2+} сигналу в клітинах. Регенеративна дія CICR, як правило, призводить до відповіді «все або нічого» бінарна клітинна Ca^{2+} відповідь. Суттєва відстань між місцями вивільнення Ca^{2+} може обмежувати ефективність CICR, в залежності від збудливості системи, але існують додаткові механізми, які також відіграють роль в градації вивільнення Ca^{2+} в залежності від інтенсивності стимулу, а також в залежності від припинення вивільнення Ca^{2+} , у тому числі стохастичного виснаження [152], Ca^{2+} інгибування за типом зворотного зв'язку та інактивації. IP_3 -опосередковані сигнали Ca^{2+} є прикладом, в якому кінцеві коливання на мікроскопічному рівні (один канал) призводять до сигналів, які можна спостерігати на макроскопічному (цитоплазматичному) рівні [153]. Вірогідність виникнення глобальних Ca^{2+} сигналів сильно залежить від властивостей одноканальних IP_3Rs . Детальне знання мікроскопічних властивостей окремих IP_3Rs каналів вивільнення Ca^{2+} є необхідним для розуміння різноманітних Ca^{2+} сигналів пов'язаних з IP_3 -сигнальними шляхами.

1.6. Ріанодинові рецептори (RyRs) саркоплазматичного ретикулула

1.6.1. Загальна характеристика RyRs.

Ріанодинові рецептори (RyRs) це родина Ca^{2+} каналів, які експресуються на мембрані ендо/саркоплазматичного ретикулула клітини. Ріанодин це рослинний алкалоїд, який зв'язується із високою спорідненістю і селективністю по відношенню до рецепторів CP, блокує їх, і тому ці рецептори класифікують як RyRs [154]. Наявність RyRs в гладеньких м'язах вперше припустили, ґрунтуючись на дослідженнях, в яких кофеїн викликав транзйентні скорочення гладеньком'язових волокон у відсутність позаклітинного Ca^{2+} [155]. Було показано, що кофеїн призводить до відкриття цих рецепторів і вивільнення Ca^{2+} в цитозоль, що веде до збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і подальшого скорочення клітин [156]. Дія кофеїну повинна приводити до збільшення Ca^{2+} транзйента, що викликає короткочасне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і відбувається за рахунок вивільнення Ca^{2+} із CP. Однак, було показано, що кофеїн може також активувати Ca^{2+} проникні катйонні канали плазматичної мембрани шлункових клітин гладеньких м'язів [157, 158, 159].

Мікромольні концентрації ріанодину в комбiнації з кофеїном приводять до повного виснаження кофеїн-чутливих Ca^{2+} депо в скiнованих гладеньких м'язах легеневої артерії, ворітної вени і ободочної кишки морської свинки [160]. Аналогічні результати були отримані на ізольованих ГМК морської свинки сечового міхура [161] і ГМК дванадцятипалої кишки миші [162].

1.6.2. Класифікація RyRs.

Молекулярним клонуванням було доведено існування трьох ізоформ RyRs, які кодуються різними генами (RyR1, RyR2 і RyR3) [163]. Тим не менше,

доведено, що для скелетних м'язів притаманні RyR1, для серцевих м'язів – RyR2, для нервової тканини – RyR3. Крім того, RyR3 експресуються в основному в ембріональних тканинах, але під час розвитку їх рівень зменшується [164]. Було продемонстровано *in vitro*, що RyR1 і RyR3 значно відрізняються за провідністю та активацією каналу. При цьому дослідження, проведені на ізольованих ГМК показали, що немає домінуючої ізоформи RyRs для гладеньких м'язів, тобто для ГМ притаманні всі види ізоформи RyRs [165]. Всі три типи RyRs були виявлені в РНК, виділеної з гладеньких м'язів [165], але домінуючими ізоформами в гладеньком'язових клітинах є RyR2 і RyR3 [166]. Цікаво, що хоча всі три ізоформи RyR присутні в гладеньких м'язах судин у новонароджених мишей, але повноцінне функціонування RyRs не відбувається до повної зрілості тварин [167]. Існують також просторові відмінності в експресії комбінацій з трьох ізоформ RyR в клітинах гладенької мускулатури різних органів. Наприклад, для генерації Ca^{2+} спарків необхідні RyR2, але з будь-яким або мінімальним [168], або інгібуючим [169] внеском RyR3.

Були також виявлені два альтернативних варіанти сплайсинга RyR1 і один варіант RyR2. Були розроблені моделі нокаутних мишей за відсутністю RyR: у мишей, позбавлених RyR3, зберігалися скоротливі реакції на кофеїн і NE [170], беручи до уваги те, що при цьому амплітуда Ca^{2+} сигналу значно збільшувалася [171]. Летальний вислід спостерігався у нокаутних мишей з відсутніми RyR2 через аномалію розвитку серцевих м'язів [172]. Цікавий підхід був використаний Dreja [172], щоб звести до мінімуму функції RyRs: при використанні клітинної культури (4 дні, 10 - 100 М ріанодину), був виділений і реконструйований білок RyR, але при цьому RyR були не функціональні. Цікава знахідка цього дослідження полягає в тому, що хоча внутрішньоклітинні депо можна відновити після багаторазової інкубації з ріанодином, активність RyR є суттєва для

активності Ca^{2+} спарків, але не для розповсюдження Ca^{2+} хвиль або Ca^{2+} осциляцій [172].

1.6.3. Молекулярні характеристики та структура RyRs.

RyRs представляє собою канал із чотирьох однакових субодиниць (протомерів) - гомотетрамерних протеїнів з загальною молекулярною масою приблизно 2.24 МД. Топологічно, різні дослідження показують, що RyR виявляють істотну гомологію своєї молекулярної структури і є каналоформувальними тетраметрами, кожна з субодиниць яких містить чотири трансмембранних сегменти і довгий N-термінал, спрямований у бік цитоплазми, який утворює «головку» рецептора - чотирилисник. Сформована центральна кальцій-проникна пору має діаметр від 2 нм до 3 нм. У структурі каналу ідентифіковані Ca^{2+} – зв’язуючі місця, що зумовлює відкривання каналів під час CICR. Для ріанодину ідентифіковано два місця зв’язування з різними K_D , тому за низьких концентраціях ріанодину (<10 мкМ) він переважно фіксує канал у напівпровідному стані і знижує частоту його відкривання, за високих (порядку 100 мкМ) повністю блокує його відкривання. Кофеїн призводить до зміщення кривої активації каналу Ca^{2+} у бік нижчих концентрацій цих іонів у цитоплазмі. Слід зазначити, що аденіннуклеотиди (аденозин, АДФ, АТФ) також активують ці канали, причому і за відсутність іонів Ca^{2+} , тому в разі їх наявності виникнення CICR значно полегшується [70, 165]. RyRs з’єднуються з мембраною 4, 10 або 12 разів [97], формуючи таким чином зв’язаний з мембраною іонний канал, який, певно, в більшості локалізуються на карбоксильному терміналі (20% білку), а решта - на аміно-кінцевій області білка утворює великий цитоплазматичний домен, що передбачає форму чотирилисника [163, 173, 174]. RyRs «кріпиться» до CP за допомогою Ca^{2+} зв’язуючого білка мембрани ретикулума – калсеквестрина.

За характером розподілу RyRs по поверхні мембрани ретикулуму впливає, що RyRs знаходяться на поверхні CP та звернені в цитоплазму, як було продемонстровано на аорті в морської свинки шляхом маркування ріанодиноним маркером [175].

1.6.4. Фізіологічна роль RyRs в клітинах гладеньких м'язів: STOCs та Ca^{2+} спарки.

Вхід іонів Ca^{2+} через L-VGCCs, вважається, завантажує кальцієві депо CP, які при досягненні критичного рівня завантаження [176] розряджаються викидами іонів Ca^{2+} через RyRs, що в більшості гладеньких м'язів створює транзйентні високі локальні концентрації примембранних іонів Ca^{2+} , які відкривають Ca^{2+} -залежні калієві канали високої провідності (ВК), експресовані в достатку в клітинній мембрані гладеньких м'язів. Швидкі короткочасні відкривання цих ВК каналів можна спостерігати у вигляді спонтанних транзйентних вихідних струмів (spontaneous transient outward currents, STOCs) у потенціал-фіксованих ГМК [16, 177, 178]. У судинних гладеньких м'язах, завантажених флюоресцентним Ca^{2+} індикатором, швидкі короткочасні локалізовані примембранні збільшення концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) можна спостерігати у вигляді спалахів випромінюваного світла ("спарків") [179, 180]. Було виявлено, що транзйентні ВК струми викликають гіперполяризацію мембрани і тим самим зменшують вхід іонів Ca^{2+} через L-VGCCs, що спричиняє зниження темпів завантаження іонів Ca^{2+} до депо CP та зниження напруженості [180, 181]. Вірогідно, Ca^{2+} спарки є негативним зворотнім механізмом, який спрацьовує при перевантаженні депо, і регулює напруженість судинних міоцитів, оскільки вони не схильні до глобального підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, але здатні до створення високих локальних примембранних $[\text{Ca}^{2+}]_i$, які запускають залежне від мембранного потенціалу ослаблення напруженості через відкривання ВК каналів [182].

Хоча вивільнення Ca^{2+} із СР, викликане входом Ca^{2+} в клітину через L-VGCCs, було показано при фіксації потенціалу в експериментах, виконаних на різних типах вісцеральних та судинних ГМК [14, 16, 18, 183, 184], існує ряд досліджень [19, 20], які демонструють, що повне спустошення СР від Ca^{2+} не зменшує $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт, викликаний ступінчастою деполяризацією клітинної мембрани. Останнє означає, що CICR не залучається у цей механізм. Альтернативне пояснення, надане Бредлі та ін. [19], показує, що СР і сарколема можуть утворювати пасивний фізичний бар'єр для входу Ca^{2+} (" Ca^{2+} trap"), який зазвичай обмежує підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, викликане деполяризацією. Речовини, які відкривають RyRs або IP₃Rs і полегшують витік Ca^{2+} із СР, зменшують вплив " Ca^{2+} trap", і можуть, таким чином, збільшити амплітуду $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнту, що призводить до входу Ca^{2+} через L-VGCCs навіть коли СР містить мало Ca^{2+} або СР спустошений [19].

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження.

Всі експерименти виконувались згідно положення Міжнародної конвенції про захист тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою [185], а також відповідно положенням Комітету про біоетику Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Основну частину досліджень було проведено на свіжоізолюваних кільцевих сегментах та на поодиноких гладеньком'язових клітинах (ГМК) мезентеріальної артерії морської свинки (250 – 350 г). Після зміщення хребців шийного відділу, морських свинок декапітували та видаляли мезентеріку тонкого кишечника - складку очеревини, між листками якої містяться кровоносні і лімфатичні судини, нерви, лімфатичні вузли і жирова тканина (Рисунок 2.1, А). Відлік порядкового номеру гілочок мезентеріальної артерії починають від аорти.

Частина експериментів була виконана на резистивних артеріях нирок щурів (150 – 200 г). Щурів лінії Вістар декапітували за допомогою гільйотини, нирки виділяли і очищували від жирової тканини в охолоджену розчині Кребса (на льоду).

А

Б

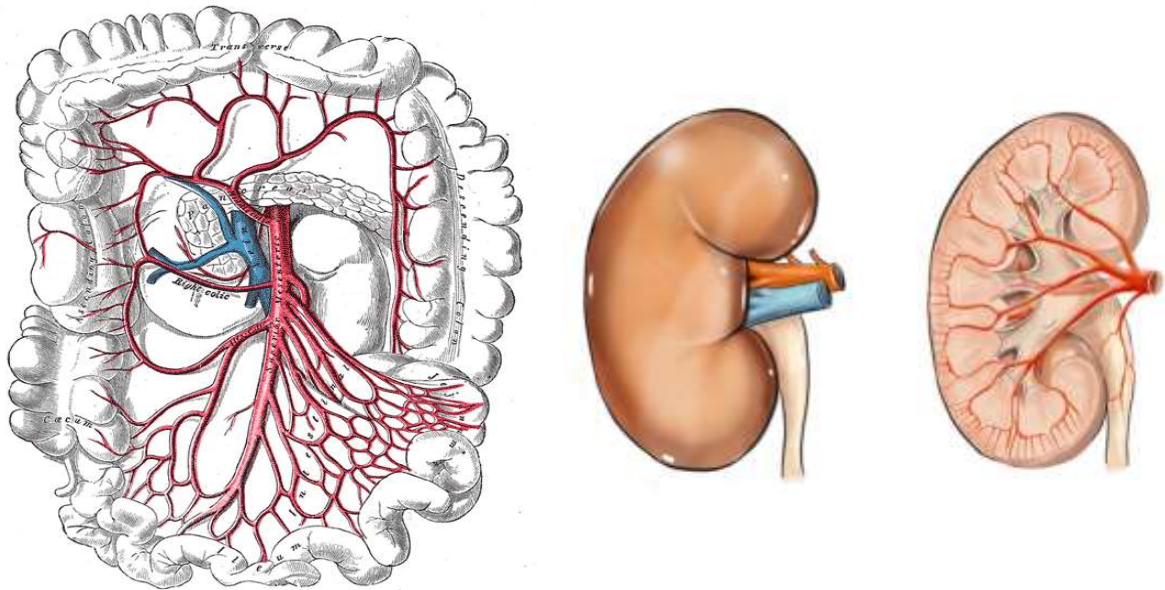


Рисунок 2.1. Схематичне зображення анатомічної будови мезентеріальної артерії (А) та артерій нирок (Б).

2.2. Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів.

Кільцеві сегменти мезентеріальної артерії 3-го порядку довжиною біля 2 мм та діаметром до 0,5 мм натягували з силою до 5 мН в проточній термостатованій камері об'ємом 50 мкл при температурі 36°C. Ендотелій кожного кільця руйнували механічно.

Скоротливі відповіді реєстрували в режимі близькому до ізометричного за допомогою тензометричного датчика, до якого кріпили лігатуру кільцевого сегменту мезентеріальної артерії. Блок-схему тензометричної установки зображено на Рисунку 2.2. Сигнал з тензометричного датчика оцифровувався за допомогою аналого-цифрового перетворювача L761 («L-Card», Росія) і в цифровій формі зберігався для подальшого аналізу.

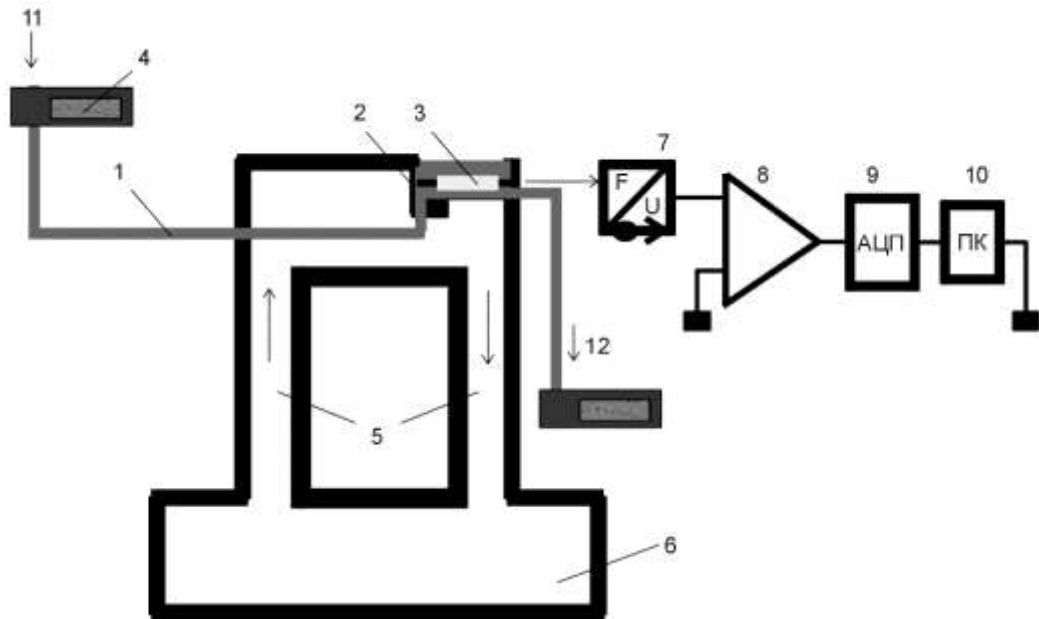


Рисунок 2.2. Блок-схема тензометричної установки

1. - Сіліконова трубка для подачі фізіологічного розчину;
2. - Робоча камера установки;
3. - Гладеньком'язевий кільцевий сегмент;
4. - Система подачі розчину;
5. - Силиконові трубки для подачі підігрітої води;
6. - Термостат;
7. - Тензометричний датчик;
8. - Електричний підсилювач сигналів;
9. - Аналогово-цифровий перетворювач (АЦП);
10. - Персональний комп'ютер (ПК);
- 11.- Фізіологічний розчин;
12. - Злив.

2.3. Виділення ізольованих артеріальних міоцитів.

Поодинокі ГМК отримували за допомогою методу ферментативно-механічної ізоляції як описано раніше [186]. Мезентеріальну артерію 3-7 порядку відділяли від жирової та сполучної тканини, отримані сегменти довжиною 2-3 мм після 10-хвилинної інкубації в холодному ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) безкальцієвому розчині, переносили до розчину, який містив (мг/мл): колагеназу (тип 1A) 1.0, протеазу (тип X) 0.5, соєвий інгібітор трипсину (тип II-S) 0.5, та бичачий альбумін 1.0, і витримували при 37°C на протязі 20-25 хвилин. Далі сегменти тканини відмивали від ферментів протягом 10 хвилин при кімнатній температурі в безкальцієвому розчині Кребса. Функціонально повноцінні ізольовані міоцити отримували шляхом багаторазового пропускання сегментів артерій через пастерівські піпетки з різними діаметрами кінчиків у свіжому номінально безкальцієвому розчині, який містив 0.2% бичачого сироваткового альбуміну.

Процедура виділення ГМК артерій нирок щурів суттєво не відрізнялася від наведеної вище для мезентеріальної артерії морських свинок. Нирку розрізали навпіл як показано на рис. 2.1, гілочки артерій ізолювали і проводили подальшу процедуру ізоляції клітин.

Суспензію клітин переносили в експериментальні камери, де вони зберігалися при 4°C у нормальному розчині Кребса. Експерименти проводилися при кімнатній температурі ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) на протязі 8 годин після ізоляції клітин.

2.4. Візуалізація змін $[Ca^{2+}]_i$.

Візуалізація змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) здійснювалася за допомогою високоафінного ($k_d = 390$ нМ) Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3 AM (максимуми збудження/емісії = 506 нм/526 нм), який був розчинений в диметилсульфоксиді (DMSO, 0.125 % (v/v)) з додаванням Pluronic F-127 (0.025 % (w/v)) та збовтаний в ультрасонікейтері на протязі 5 хвилин з подальшим додаванням до нормального розчину Кребса до кінцевої концентрації 5 мкМ. ГМК завантажували цим барвником на протязі 20 хвилин і відмивали 40 хвилин у розчині Кребса для повної де-естерифікації при кімнатній температурі. Щоб запобігти скороченню клітин за 10 хвилин до вимірів у камеру додавали вортманін в кінцевій концентрації 40 мкМ. Міоцити стимулювали 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ через систему локальної подачі агоністів (див. пункт 2.8.)

2.5. Візуалізація саркоплазматичного ретикулуму.

Візуалізація просторової організації внутрішньоклітинних кальцієвих запасників здійснювалася за допомогою низько-афінного ($k_d = 42$ мкМ) Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3FF (максимуми абсорбції/емісії = 462 нм/526 нм). Цей барвник не чутливий до Mg^{2+} і має високу фото-стабільність. ГМК завантажували 5 мкМ Fluo-3FF AM протягом 30 хвилин та відмивали протягом 60 хвилин при кімнатній температурі. Візуалізація просторової організації саркоплазматичного ретикулуму здійснювалася за допомогою Brefeldin A BODIPY (максимуми абсорбції/емісії = 558 нм/568 нм) [187]. ГМК завантажували 2 мкМ Brefeldin A BODIPY протягом 20 хвилин та відмивали протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Детальний протокол завантаження барвників

для візуалізації CP та просторової організації RyRs і IP₃Rs в ГМК був описаний нами в попередній публікації [25].

2.6. Імунодетекція RyRs and IP₃Rs.

У цих експериментах ГМК фіксували шляхом інкубації у фізіологічному розчині, який містив 4% параформальдегіду, на протязі 5-10 хвилин при 4°C. Імунозabarвлення проводили за непрямим флуоресцентним методом. Неспецифічне зв'язування блокувалося шляхом інкубації ГМК у розчині з 3% бичачого сироваткового альбуміну та 0.3% Triton X-100 (речовина, що пермебіалізує клітини) на протязі 60 хвилин при кімнатній температурі. Первинні та вторинні антитіла розбавляли у розчині, який містив 3% бичачого сироваткового альбуміну, 0.3 % Triton X-100, 20 одинць/мл пеніциліну та 20 мкг/мл стрептоміцину. Щоб візуалізувати внутрішньоклітинну локалізацію IP₃Rs, ми використовували антитіла специфічні до IP₃R типу 1, оскільки IP₃Rs є найбільш розповсюдженими у різних тканинах [188]. Ці антитіла виробляли (Sigma-Aldrich Co., RBI, Natick, MA, USA) у кролі за допомогою синтетичного пептиду отриманого з послідовності амінокислот 1829-1848 цитоплазматичної C-термінального домену IP₃R типу 1 людини. Селективність цих антитіл в імунодетекції IP₃Rs раніше була продемонстрована на інших типах ГМК [189]. Щоб візуалізувати внутрішньоклітинну локалізацію RyRs, ми використовували моноклональні анти- RyR антитіла, які отримували (Sigma-Aldrich Co., RBI, Natick, MA, USA) з 34С гібридами (яку отримували шляхом злиття клітин мієломи P3X 63 Ag8.653 та клітин селезінки миші) з використанням RyRs грудного м'язу курки як імуногену. ГМК інкубували у присутності первинних анти- IP₃R типу 1 та анти- RyR антитіл (розведених 1:300 та 1:480, відповідно) на протязі 16 годин при 4°C. Після чотирьох 10-

хвилинних відмивань у фізіологічному розчині, який містив 3% бичачого сироваткового альбуміну, специфічне зв'язування первинних атитіл виявлялося шляхом 2-годинної інкубації ГМК при кімнатній температурі з Alexa Fluor 633 кон'югованою з курячим анти-кролячі IgG (у розведенні 1:300, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) та з Alexa Fluor 488 кон'югованою з козячим анти-мишиним IgG (у розведенні 1:300, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). У контрольних експериментах первинні антитіла не додавалися у розчин, у якому клітини інкубувалися на протязі перших 16 годин.

2.7. Конфокальні дослідження.

Експериментальну камеру з клітинами (об'ємом 500 мкл) розміщували на предметному столику інвертованого мікроскопа Axiovert 200M до якого було прилаштовано лазерний сканер LSM 5 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Конфокальні зображення отримували за допомогою об'єктиву Zeiss plan-Apochromat 40×1,4 Ч.А. (масляна імерсія). Для оптимізації якості флуоресцентного сигналу у процесі іміджингу $[Ca^{2+}]_i$ пінхол було встановлено так, щоб забезпечити конфокальний оптичний зріз менш ніж 1,2 мкм (що вимірювали за допомогою флуоресцентних кульок діаметром 0,2 мкм). Візуалізація змін $[Ca^{2+}]_i$ на субклітинному рівні здійснювалась за допомогою послідовного двох-вимірного сканування при фіксованому фокусуванні, що дозволяло отримувати послідовність 1000 двовимірних (x-y) зображень з частотою 13-32 Гц. Візуалізація тривимірної просторової організації кальцієвих депо здійснювалась за допомогою послідовного двох-вимірного (x-y) сканування флуоресцентного сигналу з фокальної площини товщиною 0.7-0.8 мкм при послідовному зміщенні фокусування з постійним кроком (0.35-0.40 мкм) вздовж z осі - протокол z-секціонування. У процесі цього протоколу отримували 35-40 індивідуальних

оптичних секцій клітини. Флуоресценція Fluo-3AM та Fluo-3FF збуджувалась хвилею 488 нм іонного аргонного (200 мВт) лазеру (Laser-Fertigung, Hamburg, Germany).

Щоб уникнути перехестного засвічування/флуоресценції у експериментах з подвійним імунозабарвленням та забарвленням CP, ми використовували флуоресцентні барвники з гарно відособленими спектральними характеристиками: Alexa Fluor 488 (максимуми абсорбції/емісії = 495 нм / 519 нм), Alexa Fluor 633 (максимуми абсорбції/емісії = 632 нм / 647 нм) та Brefeldin A BODIPY 558/568 (максимуми абсорбції/емісії = 558 нм / 568 нм). Потрійне збудження флуоресценції у мултітрековій конфігурації LSM 510 META (послідовна реєстрація зображень на 3 оптичних каналах) здійснювалась за допомогою 488 нм лінії аргонного лазеру та 543 нм та 633 нм лініях двох гелій-неонових лазерів, відповідно. Флуоресцентні сигнали фільтрувалися за допомогою полосного (505-550 нм) фільтру емісії (для візуалізації зеленої флуоресценції, що відображала локалізацію RyRs), за допомогою довгохвильового (>650 нм) фільтру емісії (для візуалізації червоної флуоресценції, що відображала локалізацію IP₃Rs) та за допомогою полосного (560-615 нм) фільтру емісії (для візуалізації жовтої флуоресценції, що відображала структури CP). Необхідна інтенсивність випромінювання кожного з лазерів встановлювалася за допомогою акусто-оптичного фільтру. Усереднення 4-6 зображень використовувалося для покращення відношення сигнал/шум. Шляхом послідовного підсилюювання зелений, жовтий і червоний сигнали доводили до однакової інтенсивності. Адекватність протоколу сканування у трьохканальному режимі після потрійного забарвлення перевірялась у експериментах з поодиноким забарвленням.

Щоб керувати конфокальним мікроскопом використовували програму LSM5 Pascal, Zeiss, Oberkochen, Germany), яка була встановлена

на персональному комп'ютері сполученому з мікроскопом через SCSI інтерфейс.

2.8. Електрофізіологічні дослідження.

Електричні записи виконували, як описано раніше [25]. Стисло, мембранні струми реєстрували за допомогою модифікації “perforated patch” методу “patch-clamp” з використанням антибіотика амфотеріцина Б (200 мкг/мл) та за допомогою підсилювача Multiclamp 700A (Molecular Devices Co.). Опір піпеток, заповнених внутрішнім розчином, складав 1-3 МОм. Для утворення гігаомного контакту, мікропіпетку підводили до поверхні клітини та створювали незначний від'ємний тиск. Внаслідок дифузії відбувалась заміна моновалентного іонного складу внутрішньоклітинного середовища на внутрішньопіпетковий розчин. Для генерації імпульсів напруги і оцифровки трансмембранних струмів використовували АЦП DigiData 1322A під управлінням програмного забезпечення pClamp 8,2 (Molecular Devices Co., США). Потенціалкеровані струми викликали 500 мс деполяризацією до 0 мВ від підтримуваного потенціалу -80 мВ. Щоби збільшити низькоамплітудні струми через L-VGCCs, в цих експериментах в якості носія заряду використовували Ba^{2+} (5 мМ) замість Ca^{2+} .

Позаклітинний розчин складається з (в ммоль/л): NaCl 135, CsCl 5,8, BaCl₂ 5, MgCl₂ 1,2, D-глюкози 10, 10 HEPES (pH доводили до 7,4 с CsOH). Внутрішній розчин піпеток містив (в ммоль/л): CsCl 126, NaCl 5, HEPES 10 (pH доводили до 7,4 с CsOH).

2.9. Подача агоністів в камеру.

В дослідях з тензометричними вимірюваннями, за виключенням АТФ і $\alpha\beta$ -меАТФ, всі реактиви розводили в перфузуючому розчині Кребса в необхідній концентрації. З метою раціонального використання агоніста $P2X_1$ рецепторів $\alpha\beta$ -меАТФ, його аплікація здійснювалась шляхом ін'єкції 200 мкл агоніста в притічну трубку, через яку перфузуючий розчин надходить в робочу камеру. Тривалість ін'єкції була підібрана такою, щоби вона закінчувалась після завершення фазного скорочення. Таким же чином проводилась аплікація АТФ. Концентрація кожного з агоністів в розчині була підібрана щоби викликати субмаксимальне фазне скорочення і становила 1 мМ для АТФ або 10 мкМ для $\alpha\beta$ -меАТФ. Оскільки для $P2X$ рецепторів характерна тривала десенситизація, подальші аплікації агоністів проводили через інтервали, не коротші ніж 25 хв. Щоб пересвідчитися в відтворюваності результатів, контрольну аплікацію $\alpha\beta$ -меАТФ проводили двічі. За контрольну амплітуду приймали середню величину фазних скорочень двох послідовних аплікацій. Амплітуду фазного скорочення в присутності антагоністів нормалізували до усередненої контрольної амплітуди.

В конфокальних дослідях, суспензію клітин розміщували в експериментальній камері об'ємом 500 мкл із скляним дном (мікроскопні покривні скельця Menzel 22x22x0,08-0,12мм) та витримували 30 хвилин для прикріплення клітин до скла. Для дослідів вибирали розслаблені видовжені клітини із гладенькою поверхнею. Гладенькомязові клітини стимулювали короткими аплікаціями агоністу (≤ 300 мс), який подавали під тиском через скляну мікропіпетку, яку розташовували на відстані 100 – 200 мкм від поверхні клітини за допомогою Picospritzer III (Intracel Ltd., Велика Британія). Після кожної аплікації агоніста камеру промивали розчином Кребса та витримували 10 хвилин між аплікаціями для

перезавантаження депо. Відповідні до протоколу блокатори додавали у камеру для досягнення потрібної концентрації.

2.10. Розчини та реактиви.

В дослідах з тензометричними вимірюваннями використовували модифікований розчин Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl - 120; KCl - 5,9; NaHCO₃ - 15,5; NaH₂PO₄ - 1,2; MgCl₂ - 1,2; CaCl₂ - 2,5; глюкоза - 11,5.

Для ізольованих клітин використовували розчин Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl - 120; KCl - 6; CaCl₂ - 2,5; MgCl₂ - 1,2; глюкоза - 12; HEPES- 10; рН доводили до 7,4 за допомогою NaOH.

Безкальцієвий розчин готували на основі розчину Кребса для ізольованих клітин без додавання CaCl₂.

В роботі використовували реактиви: колагеназа (тип 1A); протеаза (тип X); соєвий інгібітор трипсин (Type II-S); бичачий сироватковий альбумін отримані від Invitrogen Ltd (Paisley, Велика Британія); Fluo-3AM acetoxymethyl ester (Fluo-3 AM); Fluo-3FF acetoxymethyl ester; плуронік F-127, Brefeldin A BODIPY та DiOC₆ - отримані від TefLabs, Austin, Texas, USA, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES); dimethyl sulfoxide (DMSO); 1,3,7-trimethylxanthine (кофеїн); вортманін - отримані від Sigma Chemical Co., Poole, Dorset, Велика Британія, аденозин 5'-трифосфат, натрієва сіль (АТФ); α,β -метіленаденозин 5'-трифосфат, літієва сіль ($\alpha\beta$ -меАТФ); тетракаїн гідрохлорид; нікардипін – від Sigma-Aldrich, США, 2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB; cyclopiazonic acid, CPA-від Calbiochem, США, параформальдегід, Triton X-100, Alexa Fluor 633 кон'югованою з курячим анти-кролячі IgG (у розведенні 1:300, отримані від Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) та з Alexa Fluor 488

кон'югованою з козлячим анти-мишиним IgG (у розведенні 1:300, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA).

2.11. Аналіз даних.

Комп'ютерну обробку зображень здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою програми Widget, яка написана на програмній мові IDL (The IDL Virtual Mashine, Distribution Platform for IDL Application). Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у іміджах отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася кольором (шкала F/F_0).

Тривимірну реконструкцію здійснювали за допомогою програми LSM5 Pascal, яка дозволяє представити результати цієї реконструкції у вигляді стерео зображень. Кінцеві малюнки отримували за допомогою програм MicroCal Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, Massachusetts, USA) та CorelDraw 7.0 (Corel Corporation, Canada).

Результати статистичної обробки експериментальних даних представлені як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення середнього арифметичного, n - кількість досліджених клітин або гладеньком'язових кільцевих сигментів. Порівняльний аналіз груп даних виконувався за допомогою t -тесту Стюдента для парних або непарних проб, в залежності від протоколу дослідження, з порогом статистичної достовірності 0.05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження механізмів підвищення $[Ca^{2+}]_i$ в ізольованих артеріальних ГМК при активації P2X рецепторів.

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію $[Ca^{2+}]_i$, викликане активацією P2X рецепторів, є результатом комбінованого внеску декількох пов'язаних процесів: входу Ca^{2+} через плазматичну мембрану безпосередньо через P2X рецептори, входу Ca^{2+} через потенціалкервані Ca^{2+} канали (VGCCs), які активуються P2XR-опосередкованою деполяризацією мембрани, і вивільненням Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму (CP), яке було викликане цим входом Ca^{2+} [12, 29, 31]

Протокол наших експериментів для оцінки внеску вищезазначених процесів у загальну Ca^{2+} мобілізацію базувався на блокуванні входу Ca^{2+} через VGCCs L-типу (L-VGCCs) використовуючи нікардіпін, блокатор L-VGCCs, та/або на усуненні викиду Ca^{2+} з CP шляхом спустошення внутрішньоклітинного Ca^{2+} депо за допомогою циклопіазонової кислоти (cyclopiazonic acid, CPA), оборотного інгібітора Ca^{2+} -АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума (SERCA). В контрольних умовах, при повному заповненні іонами Ca^{2+} внутрішньоклітинних кальцієвих депо, блокування L-VGCCs дозволяє оцінити або відносний внесок механізмів входу Ca^{2+} безпосередньо через P2X рецептори, або участь L-VGCCs в генерації загальної Ca^{2+} відповіді. Дійсно, внесок кожного механізму, що оцінюється за допомогою вищезазначеного підходу, складається із двох основних компонентів Ca^{2+} сигналу – (1) входу Ca^{2+} в клітину крізь плазматичну мембрану через пори відповідного каналу і (2) вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних запасників.

З іншого боку, коли депо спустошене за допомогою CPA, загальний Ca^{2+} сигнал складається тільки з входу Ca^{2+} через плазматичну мембрану. При комбінації CPA з антагоністом L-VGCCs можна відокремити Ca^{2+} сигнали, пов'язані із входом Ca^{2+} через самі P2X рецептори і через L-VGCCs.

В даній роботі ми не ідентифікували з яких субодиниць складаються P2X рецептори, але згідно з даними літератури в мезентеріальній артерії морської свинки P2X рецептори переважно схожі до гомомерних P2X₁ рецепторів [32, 67] і в артеріях нирок щурів ідентифіковані гомомерні P2X₁ рецептори і гетеротримерні P2X_{1/4} рецептори [32, 190].

3.1.1. Активація P2X рецепторів викликає підмембранний $[Ca^{2+}]_i$ стрибок.

Високошвидкісне двовимірне (x-y) (рис. 3.1) та лінійне (рис. 3.2) конфокальне сканування Ca^{2+} виявили, що у відповідь на стимуляцію P2X рецепторів 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ клітин мезентеріальної артерії морської свинки спостерігається швидке підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у підмембранних – субплазмалемальних (суб-ПМ) регіонах клітини - підмембранний $[Ca^{2+}]_i$ стрибок (sub-plasmalemmal Ca^{2+} upstroke, SPCU).

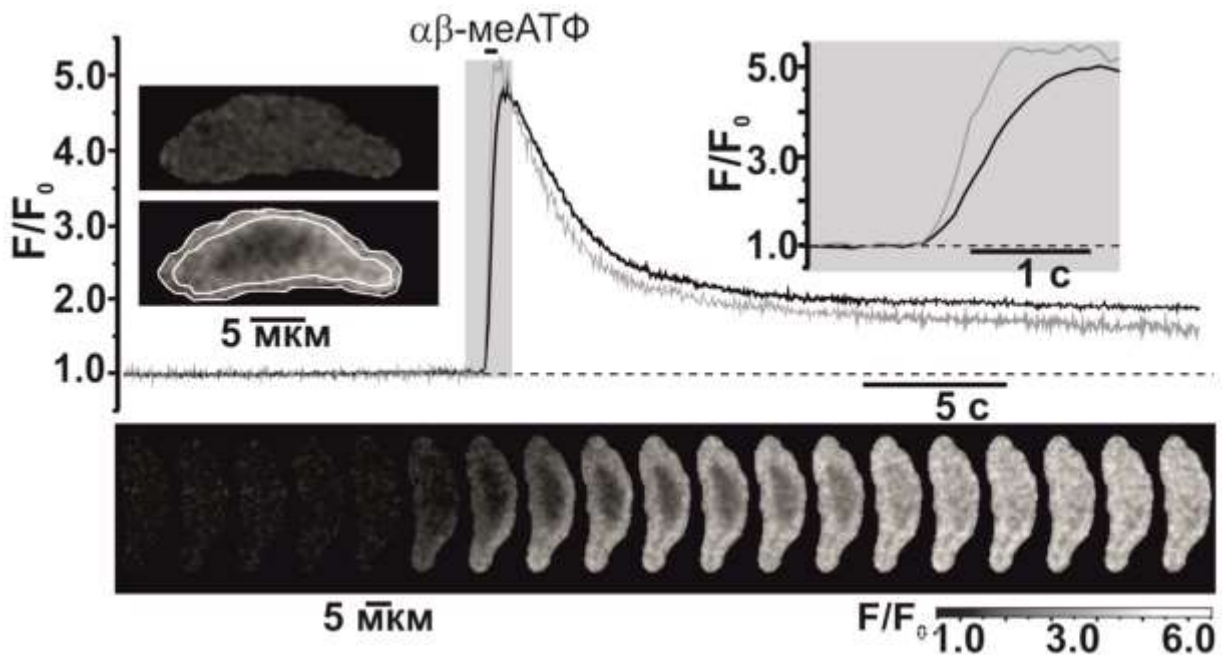


Рис. 3.1. $\alpha\beta$ -меАТФ-індукована $[Ca^{2+}]_i$ хвиля зареєстрована при двовимірному (x-y) скануванні артеріальних ГМК при активації P2X рецепторів. На кривих реєстрації показано часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3, з усередненням (сірий колір) у суб-ПМ регіонах ініціації (вставка ліворуч) і в межах загального конфокального оптичного зрізу ГМК (чорна лінія). Різниця в кінетиці відповідей на периферії та у центрі клітини виділяється на розтягнутій шкалі часу (вставка справа). Галерея показує, конфокальні зображення, зняті за період, відмічений сірим фоном на кривій (сірий колір).

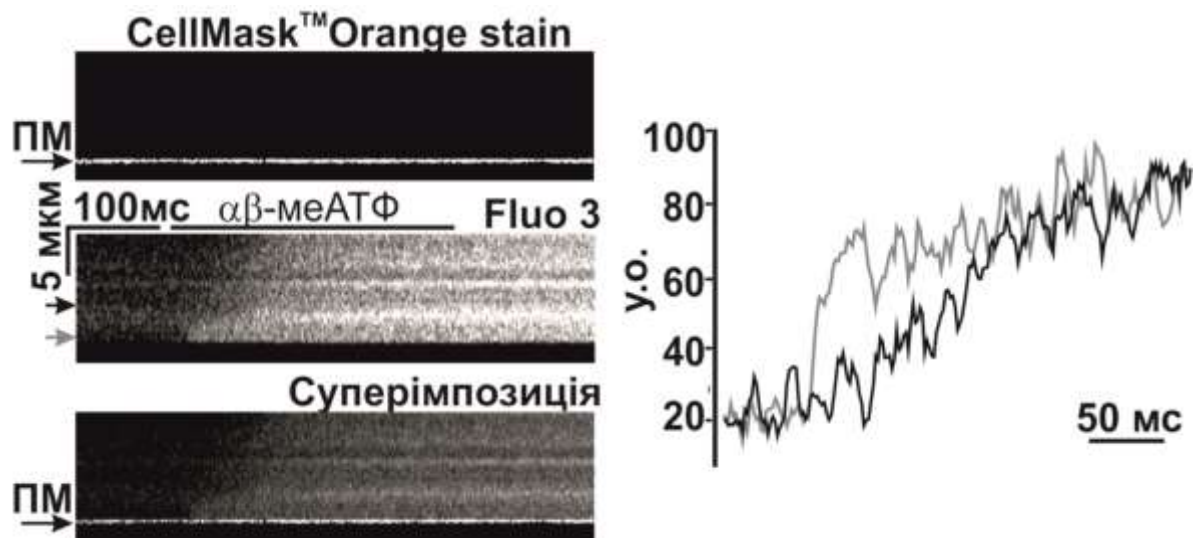


Рис. 3.2. $\alpha\beta$ -меАТФ-індукована $[Ca^{2+}]_i$ хвиля зареєстрована при лінійному скануванні. Конфокальні зображення, отримані при лінійному скануванні CellMask™Orange (вгорі) і Fluor 3 (в центрі) флуоресценції і їх накладення один на одний - суперімпозиція (знизу) ілюструють, що $\alpha\beta$ -меАТФ -індукована $[Ca^{2+}]_i$ хвиля розпочинається з суб-ПМ регіонів і поширюється в центр клітини. Кінетика відповідей як зміна у часі нормованої інтенсивності флуоресценції Fluor-3 (в середньому 4 пікселі) на ділянках, зображені чорною і сірою стрілками на зображеннях при лінійному скануванні (в середині), показана на графіку (праворуч) відповідного кольору.

Тому в подальших дослідженнях ми аналізували динаміку зміни $[Ca^{2+}]_i$ в цих підмембранних регіонах ініціації, які показано на вставленому конфокальному зображенні над кривими реєстрації (рис. 3.1) як часовий хід нормованої інтенсивності Fluor-3 флуоресценції (F/F_0).

3.1.2. Визначення відтворюваності амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнта, викликаного 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ.

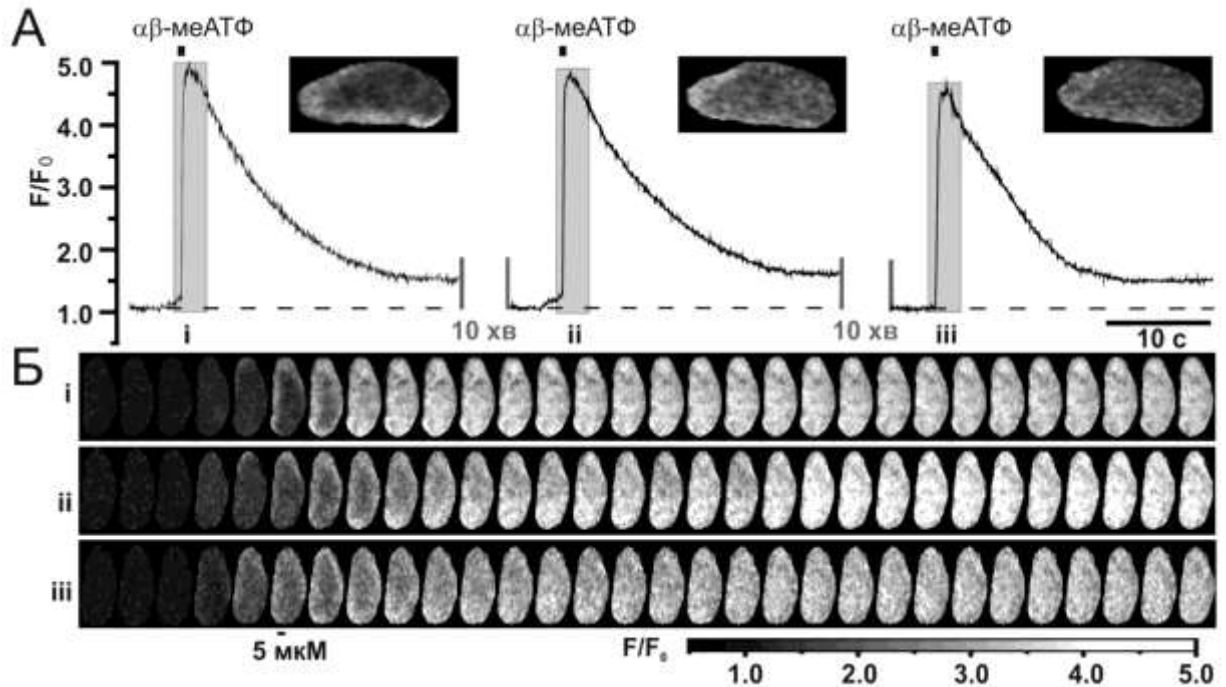


Рис. 3.3. Відтворюваність амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнта, викликаного 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ, в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки.

(А) Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Flio-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації.

(Б) Галереї під кривими демонструють конфокальні іміджі послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i-iii,) після повороту на 90° . Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у зображеннях, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Наш експериментальний підхід потребує щонайменше три послідовні аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ, селективного агоніста P2X рецепторів, і вимагає високої відтворюваності $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ тринзйєнта. Тому ми провели серію експериментів, в яких реєстрували

амплітуду відповіді на 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ при повторних послідовних аплікаціях через 10-хвилинні інтервали (для забезпечення перезавповнення Ca^{2+} депо і усунення P2X рецепторної десенситизації) (рис.3.3).

Відтворюваність відповіді на повторні аплікації 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ вимірювали як співвідношення амплітуди SPCU наступної відповіді до попередньої [25]. При такій стимуляції вона дорівнювала $81 \pm 1.4\%$ ($n = 52$)

3.1.3. Визначення впливу CPA на VGCC-опосередковані струми.

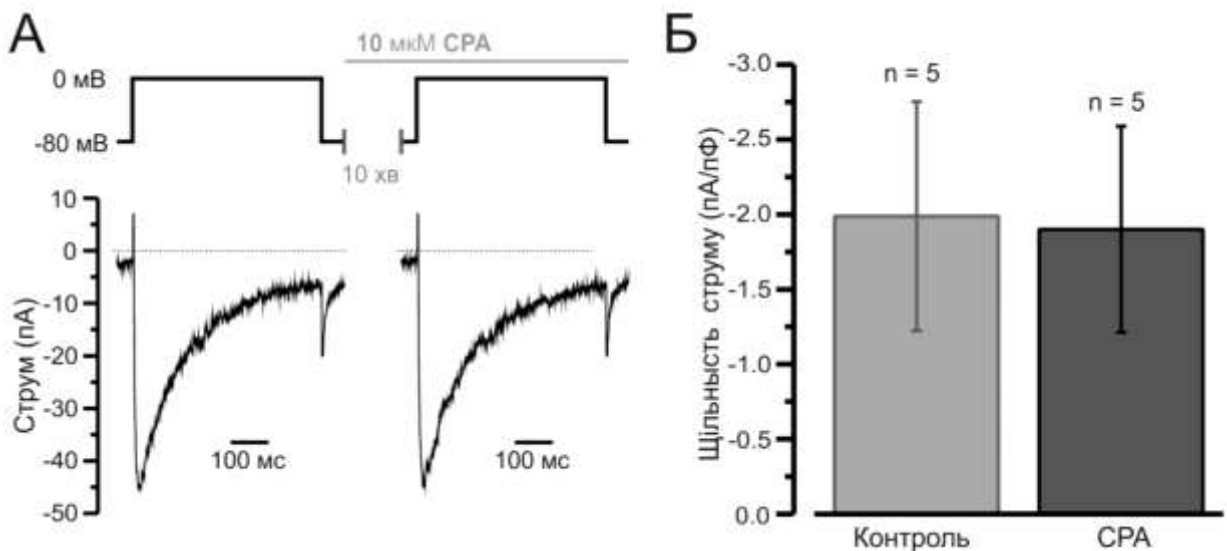


Рис. 3.4. Десятихвилинна інкубація ГМК в 10 мкМ CPA не впливає на кальцієвий струм через L-VGCCs. Оригінальні записи реєстрації кальцієвих струмів були отримані на одному міоциті до- та після 10 хвилинної інкубації ГМК в 10 мкМ CPA (експериментальний протокол відображено над записами) (А). Аналіз даних не вказав на статистично достовірні відмінності ($p = 0.35569$) пікової амплітуди щільності струмів після інкубації ГМК в CPA (Б).

Один з важливих аспектів нашої експериментальної стратегії полягав у визначенні селективності CPA та концентрації цього блокатору, необхідної для повного спустошення депо від Ca^{2+} .

Раніше повідомлялося, що циклопіазонова кислота (CPA), оборотний інгібітор SERCA, не впливає на L-VGCCs, Ca^{2+} -залежні K^+ канали або потенціалзалежні K^+ канали [191, 192]. Проте, беручи до уваги, що будь-яка дія CPA на L-VGCCs може спотворити амплітуду $\alpha\beta$ -меАТФ – індукованого ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) транз'єнта (див. нижче), ми перевірили ефект 10 хвилинної інкубації 10 мкМ CPA на VGCC-опосередковані струми в серії експериментів при фіксації потенціалу (рис.3.4)

Стимуляція міоцитів з кроком напруги до 0 мВ від підтримуваного потенціалу -80мВ призводить до активації швидких вхідних трансмембранних струмів із середньою піковою щільністю струму -1.99 ± 0.34 пА/пФ ($n = 5$). Властивості отриманого струму відповідали характеристикам струму через L-тип VGCCs, раніше описаним на цьому типі клітин [193]. Інкубація клітин з 10 мкМ CPA не змінювала кінетики струму і не мала ніякого статистично значимого ефекту ($p = 0.35569$) на амплітуді струмів: пік щільності струму в присутності CPA був в середньому -1.90 ± 0.31 пА/пФ ($n = 5$).

3.1.4. Визначення концентрації CPA для повного спустошення CP від Ca^{2+} .

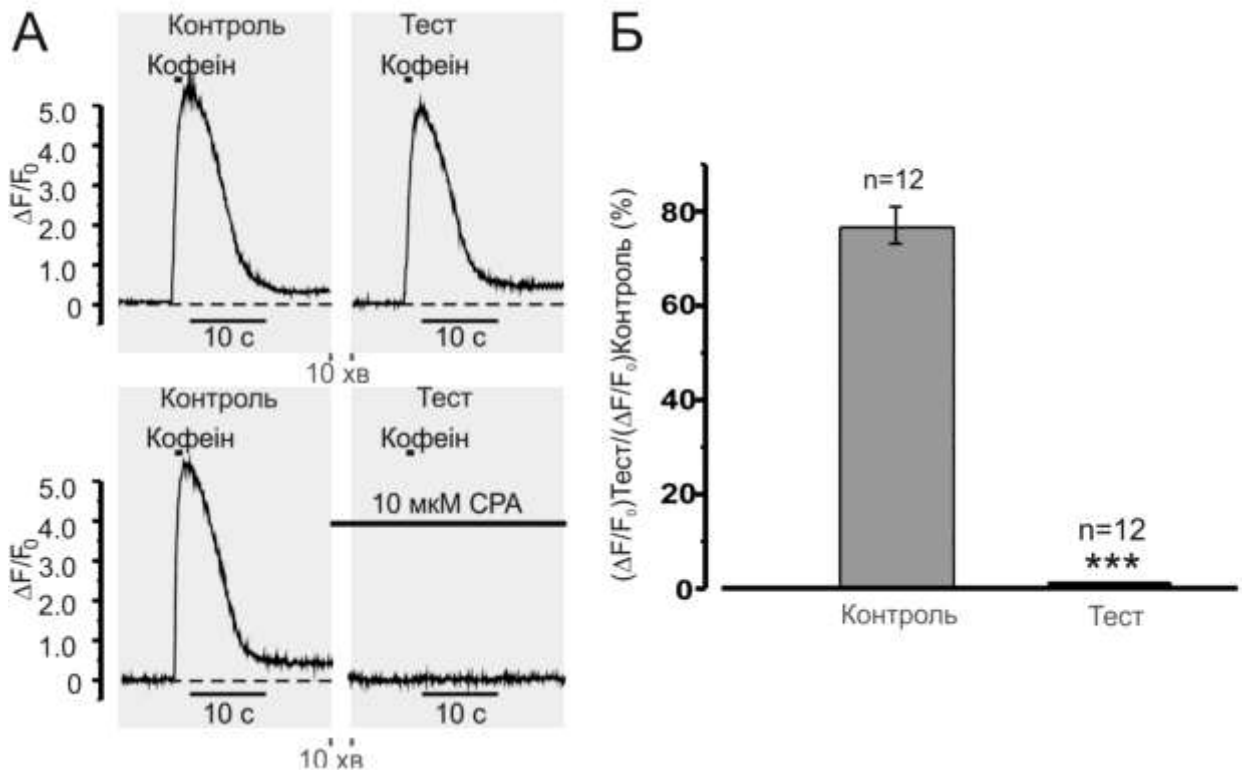


Рис.3.5. Десятихвилинна інкубація з 10 мкМ CPA повністю виснажує внутрішньоклітинні Ca^{2+} депо ГМК мезентеріальної артерії морської свинки. (А). Відповідь на другу стимуляцію (тест) співвідносили з відповіддю на першу стимуляцію (контроль). Тестова відповідь була отримана або в контрольних умовах (верхня панель; "Контроль") або після 10-хвилинної інкубації з 10мкМ CPA (нижня панель). (Б) Діаграма порівняння нормалізованих амплітуд $(\Delta F/F_0)$ тестової відповіді до контрольної відповіді. *** $p < 0.001$

Після того, як було підтверджено, що CPA не впливає на VGCC-опосередкований вхідний Ca^{2+} струм, залишилося питання, чи повністю спустошується депо від Ca^{2+} в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки за 10 хвилин інкубації міоцитів з 10 мкМ CPA. Раніше було

показано, що у досліджуваних ГМК мезентеріальної артерії морської свинки депо є спільним для процесів CICR і PCR [12, 225]. Заповнення СР іонами Ca^{2+} були протестовані за допомогою 3мМ кофеїну. Результати цих експериментів представлені на рис. 3.5 та на рис. 3.6.

Показано, що за 10 хвилин інкубації міоцитів з 10 мкМ СРА повністю пригнічувало $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт, який був викликаний 3 мМ кофеїну, тоді як у відсутність СРА (через 10 хвилин відмиву у нормальному розчині Кребса) амплітуда повторної відповіді на 3 мМ кофеїну складала $76 \pm 3 \%$ (рис. 3.5, А і В, $n = 12$).

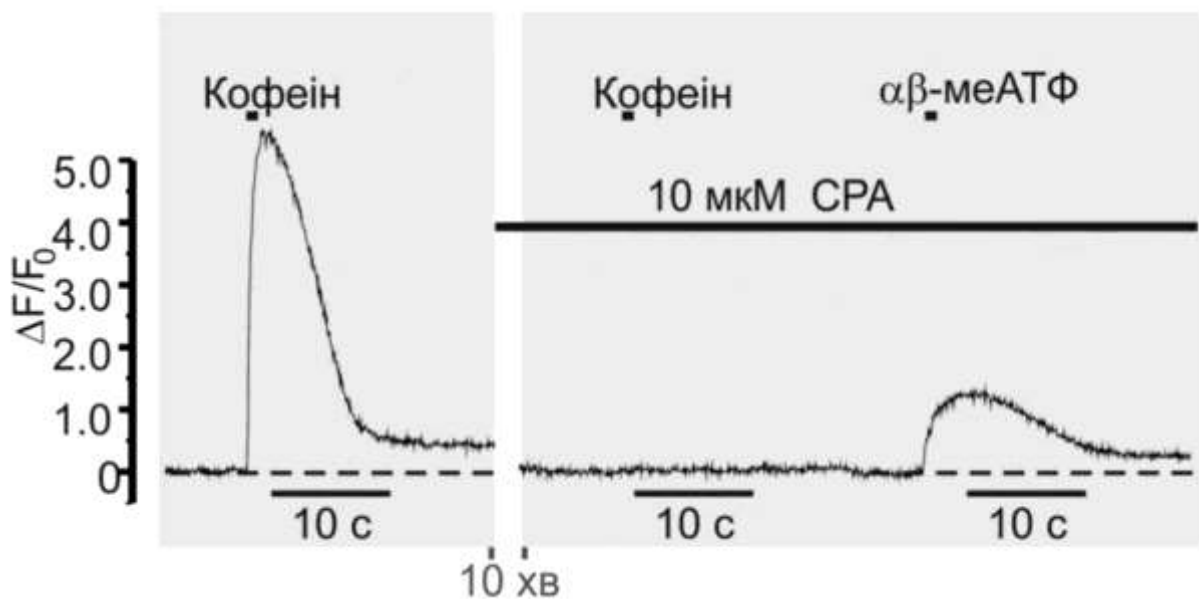


Рис.3.6. 10 мкМ СРА повністю виснажує СР від Ca^{2+} – підтверджується відсутністю реакції на повторну аплікацію кофеїну, однак не впливає трансмембранний вхід Ca^{2+} в клітину - підтверджується $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтом на $\alpha\beta$ -меАТФ.

Слід зазначити, що в дослідженнях, які проводилися на судинних ГМК [27], показано, що Ca^{2+} сигнал, викликаний одиничною аплікацією

кофеїну в мілімолярній концентрації перевищив 90% і це підтверджує, що кофеїн в діапазоні мілімолярних концентрацій можна використовувати в якості адекватного фармакологічного інструменту для перевірки завантаження Ca^{2+} СР. Проте, якщо повторна аплікація 3 мМ кофеїну на фоні дії СРА не викликала $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь, аплікація 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ на тому ж міоциті призводила до $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнта, який був результатом сумарного входу Ca^{2+} через обидва типи каналів P2X і L-VGCCs (рис. 3.6).

В цілому, проведені експерименти підтверджують, що СРА можна використовувати як селективний фармакологічний інструмент для оцінки внеску вивільнення Ca^{2+} в загальну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ мобілізацію, викликану стимуляцією P2X рецепторів ГМК мезентеріальної артерії.

3.1.5. Визначення внеску P2X рецепторів і L-VGCCs у загальний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигнал при активації P2X рецепторів.

Як обґрунтовувалося вище, щоб оцінити внесок участі P2X рецепторів і внесок участі L-VGCCs у загальний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигнал в результаті трансмембранного входу Ca^{2+} і відносної здатності цих двох механізмів, які запускають вхід Ca^{2+} в клітину, викликати вивільнення Ca^{2+} із СР, ми співвідносили амплітуди $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ (з 10-хвилинним інтервалом між аплікаціями) у присутності 5 мкМ нікардіпіна, 10 мкМ СРА та їх комбінації, з амплітудами, які реєстрували на тому ж самому міоциті перед інкубацією з вищезазначеним інгібітором або з інгібіторами. Типові результати цих експериментів показані на рис. 3.7 та рис.3.8. Щоб звести до мінімуму можливий ефект блоку VGCC на перезавантаження СР кальцієм, нікардіпін додавали до суспензії клітин за 30 с до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ.

3.1.5.1. Визначення внеску P2X рецепторів у вивільнення Ca^{2+} із СР.

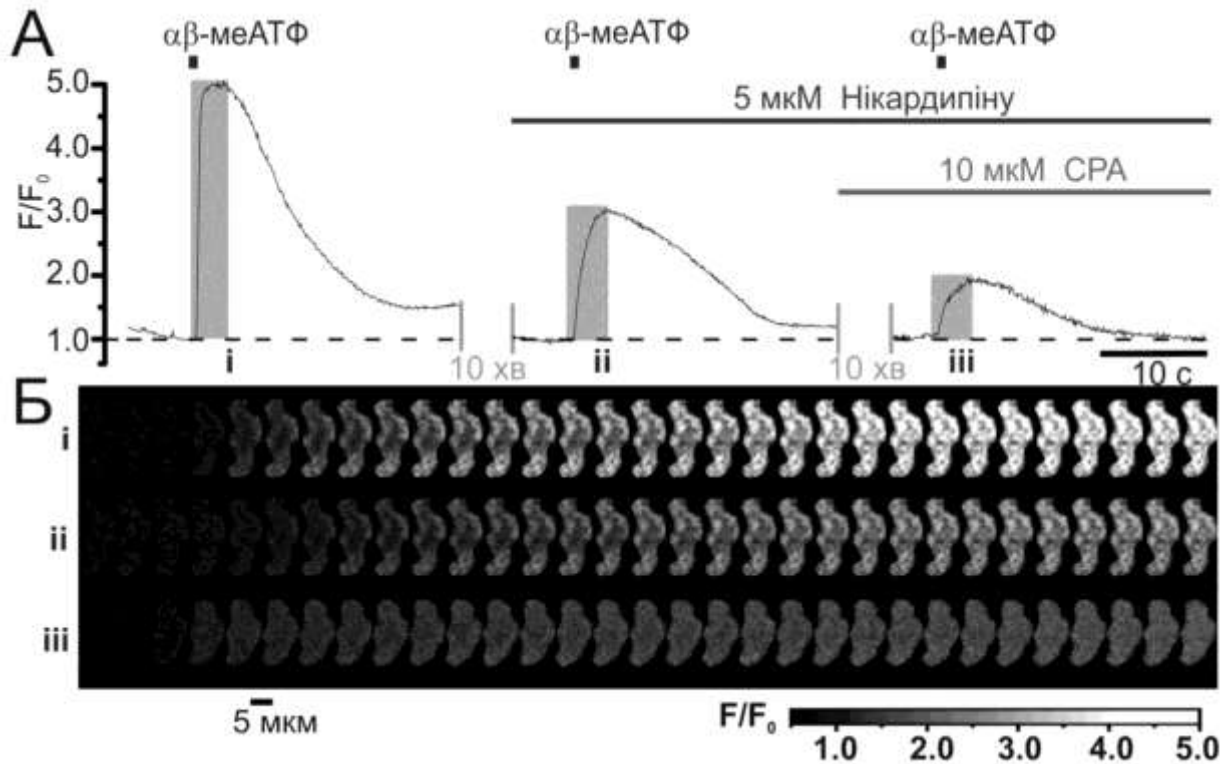


Рис. 3.7. Вхід Ca^{2+} через L-VGCCs після активації P2X рецепторів ГМК мезентеріальної артерії морської свинки викликає вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо. Вплив блоку L-VGCCs із подальшим спустошенням Ca^{2+} депо на $\alpha\beta$ -меАТФ – викликаний Ca^{2+} сигнал.

(А) Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у SPCU суб-ПМ регіонах ініціації. (Б) Галереї під кривими демонструють конфокальні зображення послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i-iii,) після повороту на 90° . Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у зображеннях, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

При блокуванні нікардіпіном L-VGCCs амплітуда ($\Delta F/F_0$) $\alpha\beta$ -меАТФ – індукованого SPCU зменшувалася в середньому на $64 \pm 2\%$ ($n = 22$)

(рис. 3.7). Нікардипін-нечутлива фракція відповіді відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори плюс індуковане цим входом вивільнення Ca^{2+} із СР і складає $\sim 36\%$ від загальної Ca^{2+} відповіді.

3.1.5.2. Визначення внеску VGCC у вивільнення Ca^{2+} із СР.

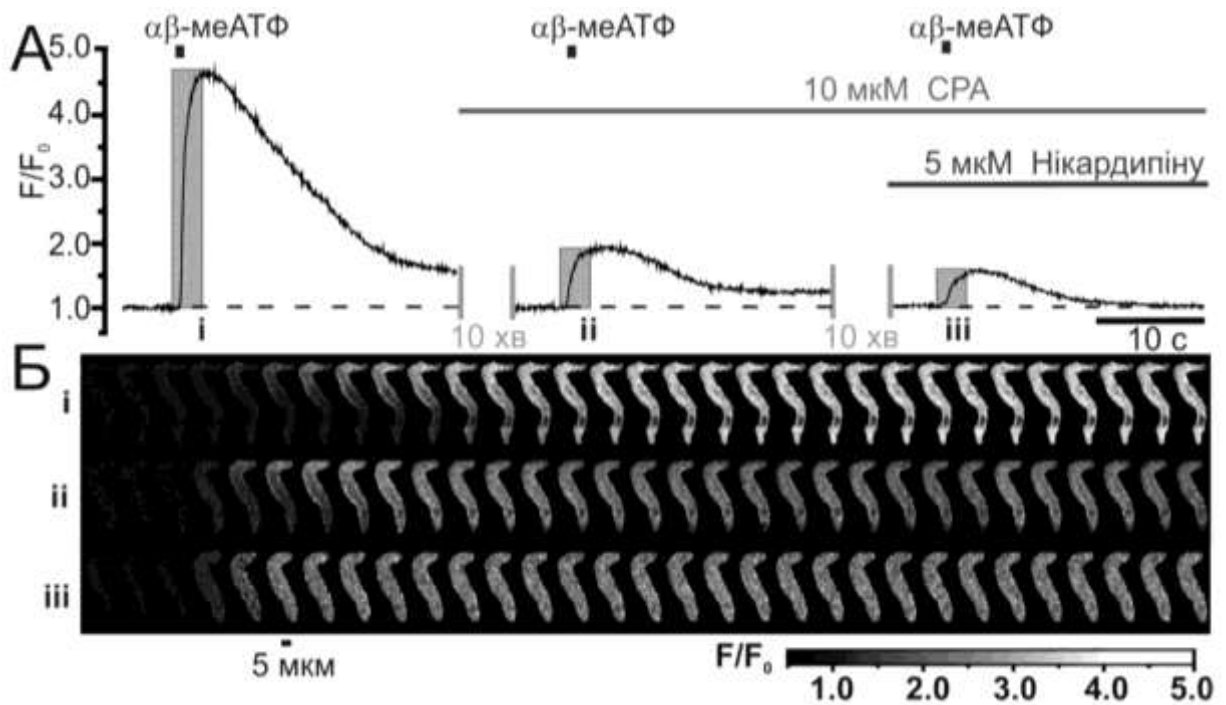


Рис.3.8. Спустошення СР з подальшим блокуванням L-VGCCs відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, що були активовані 10 μM $\alpha\beta$ -меАТФ.

(А) Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у SPCU суб-ПМ регіонах ініціації. (Б) Галереї під кривими демонструють конфокальні зображення послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i-iii,) після повороту на 90° . Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у іміджах, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Спустошення внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо за 10 хвилин інкубації клітин з 10 мкМ CPA достовірно ($p < 0.001$) знижує амплітуду $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованого сигналу ($\Delta F/F_0$) (рис. 3.8).

При повному спустошенні депо амплітуда сигналу зменшувалась на 81%. Залишкова фракція відповіді в цих умовах, представлена амплітудою Ca^{2+} сигналу, відображає загальний вхід Ca^{2+} в ГМК, викликаний активацією P2X рецепторів, за рахунок обох джерел - P2X рецепторів і L-VGCCs і складає $19 \pm 0.8 \%$ ($n = 24$) від загальної Ca^{2+} відповіді. Для оцінки Ca^{2+} сигналу, що виникає тільки за рахунок входу Ca^{2+} через P2X рецептори, ми усували VGCC – опосередкований вхід Ca^{2+} за допомогою нікардіпіну в ГМК із спустошеним Ca^{2+} депо. Решта частини відповіді за цих умов була значно менше ($P < 0.00001$), ніж залишається після спустошення Ca^{2+} депо (див. вище). Ця фракція відображає прямий вхід Ca^{2+} через P2X рецептори і складає $11 \pm 1.4 \%$ ($n = 14$) від загальної Ca^{2+} відповіді. Таким чином, активація P2X рецепторів, викликана $\alpha\beta$ -меАТФ, запускає два механізми входу Ca^{2+} в клітину, які забезпечують порівняно схожий внесок Ca^{2+} в клітину: P2X - опосередкований ($\sim 11 \%$) і VGCC - опосередкований ($\sim 8 \%$).

Щоб оцінити здатність VGCC-опосередкованого входу Ca^{2+} , викликаного активацією P2X рецепторів, до подальшого вивільнення Ca^{2+} із депо, ми порівняли ефект спустошення депо з наступним блоком L-VGCCs, що забезпечувався нікардіпіном із ефектом спустошення депо у відсутність нікардіпіну (рис. 3.9).

Цей експериментальний підхід (див. графіки, ліва панель), виявив, що ефект спустошення Ca^{2+} депо на $\alpha\beta$ -меАТФ-індукований $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт значно ($P < 0.0013$) послаблюється наступним блоком L-VGCCs (див. діаграму; праву панель). Дійсно, в контрольних умовах інкубації з CPA зменшили $\alpha\beta$ -меАТФ-викликаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт ($\Delta F/F_0$) на $81 \pm 0.8\%$ ($n = 24$), в той час, при початковому блокуванні L-VGCCs, інкубація з CPA зменшила $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт ($\Delta F/F_0$) лише на

$58 \pm 2\%$ ($n = 8$). Значне ослаблення ефекту спустошення кальцієвого депо на амплітуду Ca^{2+} сигналу при блокуванні L-VGCCs означає, що вивільнення Ca^{2+} із CP в наслідок активації P2X рецепторів викликається головним чином входом Ca^{2+} через L-VGCCs.

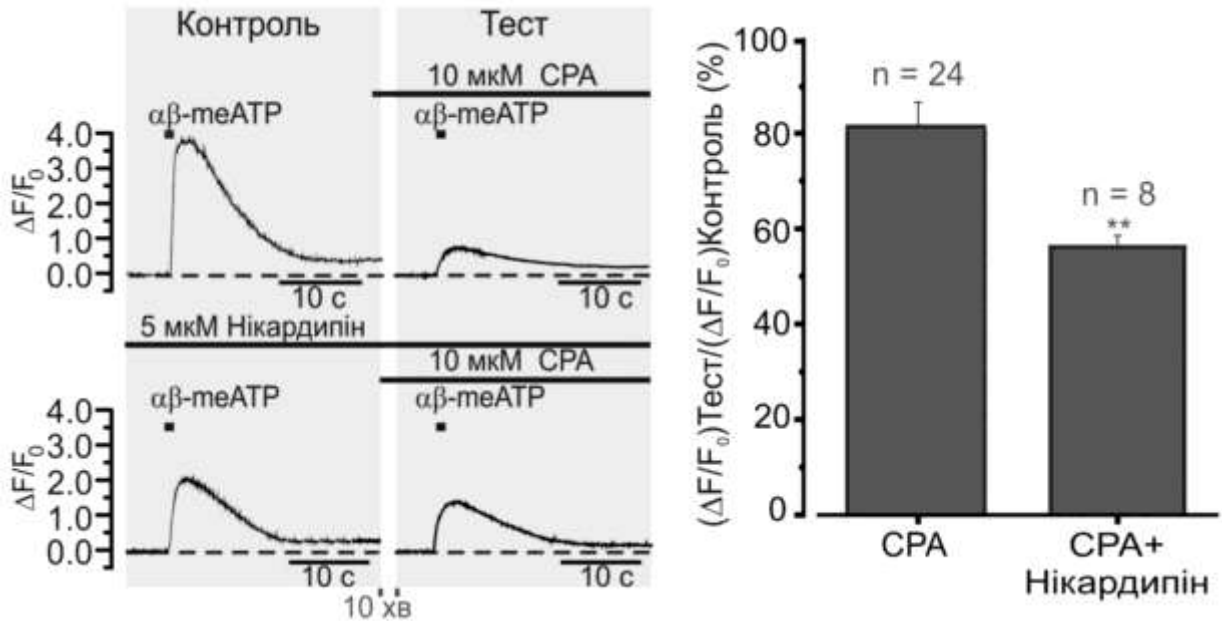


Рис. 3.9. Ефект спустошення CP від Ca^{2+} на $\alpha\beta$ -meATP-індукований $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигнал послаблюється наступним блоком L-VGCCs.

(А) Співвідношення амплітуд $\Delta F/F_0$ транз'єнтів до (Контроль) та після (Тест) спустошення CP від Ca^{2+} в порівнянні в контрольних умовах та після блоку L-VGCCs. (Б) На діаграмі показано, що ефект спустошення CP від Ca^{2+} на $\alpha\beta$ -meATP-індукований $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигнал послаблюється наступним блоком L-VGCCs. ** $P < 0.0013$

3.1.5.3. Порівняння підсилення Ca^{2+} сигналів після входу іонів Ca^{2+} через P2X рецептори і через L-VGCCs при активації P2X.

Слід зазначити, що спустошення Ca^{2+} депо за допомогою CPA знижує амплітуду Ca^{2+} сигналу значно ($p < 0.00001$) сильніше, ніж блок L-VGCCs, що дозволяє припустити, що вивільнення Ca^{2+} з CP частково було викликане входом Ca^{2+} в клітину через P2X рецептори. Одночасне блокування L-VGCCs при спустошеному Ca^{2+} депо зменшило $\alpha\beta$ -меАТФ-викликану $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь значно більше ($P < 0.00001$), ніж тільки спустошення Ca^{2+} депо, і це може означати, що вхід Ca^{2+} через L-VGCCs робить значний внесок у $\alpha\beta$ -меАТФ-викликану Ca^{2+} мобілізацію. Порівняння середніх амплітуд сигналів ($\Delta F/F_0$) у $\alpha\beta$ -меАТФ-викликаний сигнал у міоцитів із спустошеним депо в присутності і відсутності нікардіпіну показує, що вхід Ca^{2+} через VGCC дорівнює $\sim 8\%$ від загальної Ca^{2+} відповіді. Враховуючи відтворюваність амплітуд Ca^{2+} сигналів у відповідь на 10 мкм $\alpha\beta$ -меАТФ і при порівнянні амплітуди Ca^{2+} сигналів при використанні фармакологічного підходу, описаного вище, ми підсумували внесок декількох механізмів, що відповідають за підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, викликане активацією P2X рецепторів у мезентеріальній артерії ГМК (рис. 3.10). Ми проаналізували два основних джерела входу Ca^{2+} в клітину, через P2X рецептори і через L-VGCCs. Частка Ca^{2+} сигналу ($\Delta F/F_0$), відповідна до кожного з цих двох джерел (в тому числі відповідних компонент CICR) відображена на діаграмі поряд з діаграмою відповідної фракції входу Ca^{2+} в клітину. будується поруч з його чистою компонента входу Ca^{2+} і співвідноситься із загальною $\alpha\beta$ -меАТФ-викликану відповіддю. Для кожного джерела були розраховані коефіцієнти підсилення CICR (показано на графіку) як співвідношення середніх максимальних амплітуд відповідних фракцій, які зберігалися або усувалися наступною інкубацією з нікардіпіном та/або CPA (див. вище). Цей підхід показав, що вхід Ca^{2+} через L-тип VGCCs підсилюється CICR

значно більше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, хоча окремий внесок кожного з цих двох механізмів, що обумовлюється входом Ca^{2+} в клітину, істотно не відрізняється.

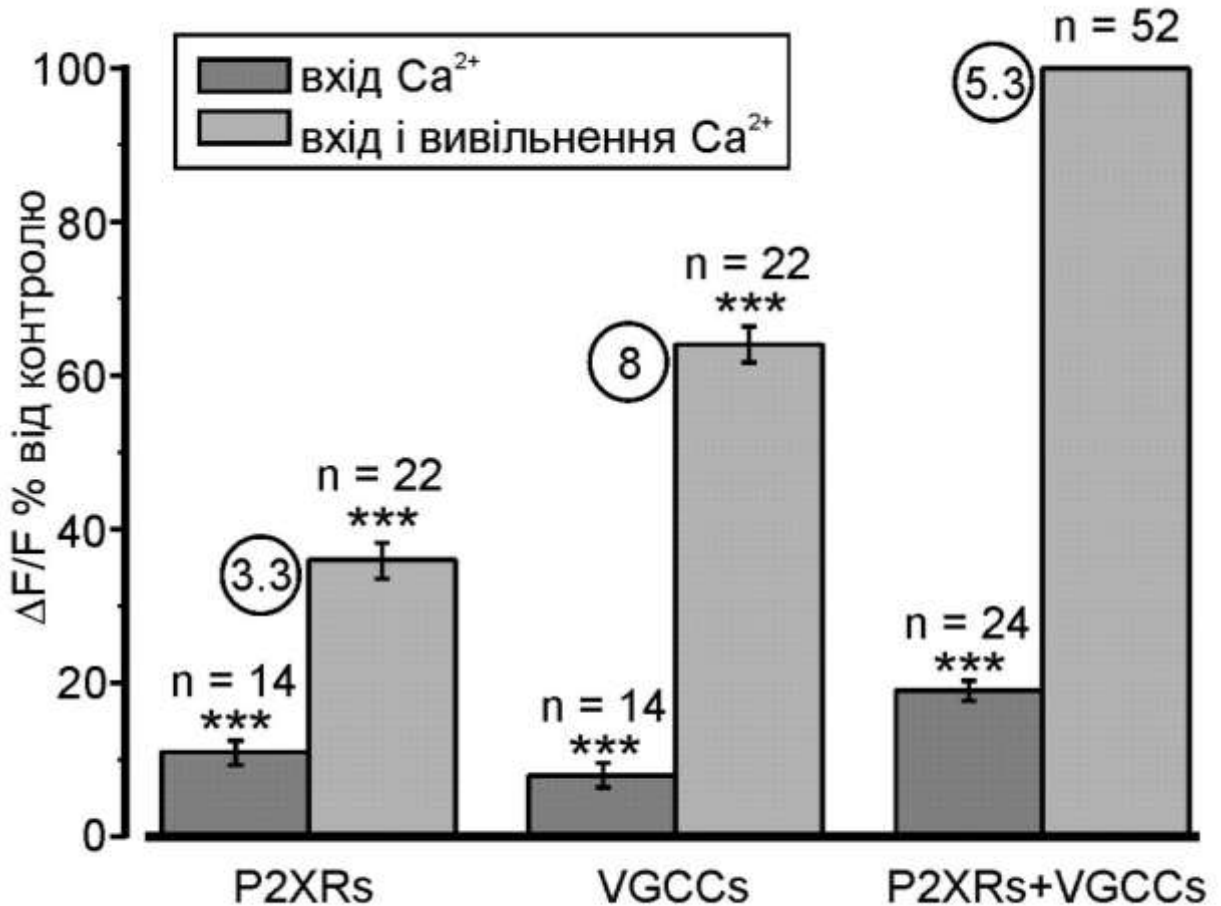


Рис.3.10. Порівняння підсилення Ca^{2+} сигналів після входу іонів Ca^{2+} через P2X рецептори і через L-VGCCs при активації P2X рецепторів за механізмом CICR. Коефіцієнти підсилення CICR обведені колом.

P2XRs – P2X рецептор-опосередкований вхід Ca^{2+} і викликане ним вивільнення із депо;

VGCCs – VGCC-опосередкований вхід Ca^{2+} і викликане цим входом вивільнення Ca^{2+} із CP

P2XRs+VGCCs – трансмембранний вхід Ca^{2+} і викликане цим входом вивільнення Ca^{2+} із CP

На рис. 3.10 проаналізовано амплітуду ($\Delta F/F_0$) наступних фракцій $\alpha\beta$ -меАТФ -індукованої відповіді, що спостерігаються в контрольних умовах: (i) фракція, що залишається після блоку L-VGCCs (відображає P2X рецептор-опосередкований вхід Ca^{2+} плюс викликане цим входом вивільнення Ca^{2+} із СР), (ii) фракція, що відповідає зменшенню Ca^{2+} сигналу при блокуванні L-VGCCs (відображає VGCC опосередкований вхід Ca^{2+} плюс викликане цим входом вивільнення Ca^{2+} із СР), (iii) фракція, що залишається після спустошення СР (відображає загальний вхід Ca^{2+} і через P2X рецептори, і через L-VGCCs), (iv) фракція, що відповідає блоку L-VGCCs при спустошеному СР (відображає вхід Ca^{2+} через L-VGCC) і (v) фракція, що зберігається після блоку L-VGCCs при спустошеному СР (відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори). Коефіцієнти підсилення CICR (обведені колом) розраховувалися як співвідношення середніх максимальних амплітуд відповідних фракцій. Зауважимо, що для ілюстрації загальний Ca^{2+} сигнал, викликаний $\alpha\beta$ -меАТФ, прийнято, як 100% (хоча відтворюваність відповіді в контрольних умовах була в середньому 81%) і всі фракції були перераховані відповідно. *** $P < 0,001$ порівняно із загальною $\alpha\beta$ -меАТФ -викликанною відповіддю в контрольних умовах. Як було зазначено вище (див. підрозділ 3.1), відтворюваність амплітуди SPCU, яка була викликана повторно після 10 хвилинного інтервалу стимуляцією клітин мезентеріальної артерії морської свинки 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ, становила $81 \pm 1.4\%$ ($n = 52$). Враховуючи це, ми тестували дію блокаторів RyRs, IP₃Rs, фосфоліпази С (PLC) та L-VGCCs на $\alpha\beta$ -меАТФ –викликану $[Ca^{2+}]_i$ відповідь в цих ГМК.

3.1.6. Внесок RyRs та IP₃Rs у вивільнення Ca²⁺ із саркоплазматичного ретикулуму після активації P2X рецепторів.

Для того, щоб оцінити внесок RyRs та вірогідну участь IP₃Rs процес вивільнення Ca²⁺ з саркоплазматичного ретикулуму після активації P2X рецепторів, ми використовували тетракаїн [25, 139, 194] або ріанодин [25, 195] для блокування RyRs та 2-аміно-етоксі-дифеніл борат (2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB) [25, 195] для блокування IP₃Rs. Для спустошення кальцієвого депо ми блокували Ca²⁺-АТФазу сарко-/ендоплазматичного ретикулума (SERCA) [25, 27, 191, 192, 195] за допомогою циклопіазонової кислоти (CPA) [25, 195].

3.1.6.1. Визначення впливу дії 2-APB на трансмембранний вхід Ca²⁺.

Нещодавно повідомлялося, що 2-APB може впливати на механізми внутрішньоклітинного Ca²⁺ гомеостазу, такі як інгібування катіонних каналів і SERCA [196, 197], тому важливим аспектом наших досліджень було протестувати дію 30 мкМ 2-APB на завантаження CP (рис.3.11) та на механізми, які залучаються при вході Ca²⁺ в клітину при активації P2X рецепторів клітин мезентеріальної артерії (рис.3.12).

Щоб перевірити чи впливає 2-APB на механізми входу Ca²⁺, який мобілізується при активації P2X рецепторів, ми спустошували внутрішньоклітинні кальцієві депо на протязі 10 хвилин інкубацією клітин в 10 мкМ CPA [195]. Таким чином, якщо кальцієве депо спустошене, то $\alpha\beta$ -меАТФ-викликаний [Ca²⁺]_i транз'єнт виникає внаслідок тільки трансмембранного надходження Ca²⁺ і, як показано на рис.3.11, не чутливий до 30 мкМ 2-APB (n = 7).

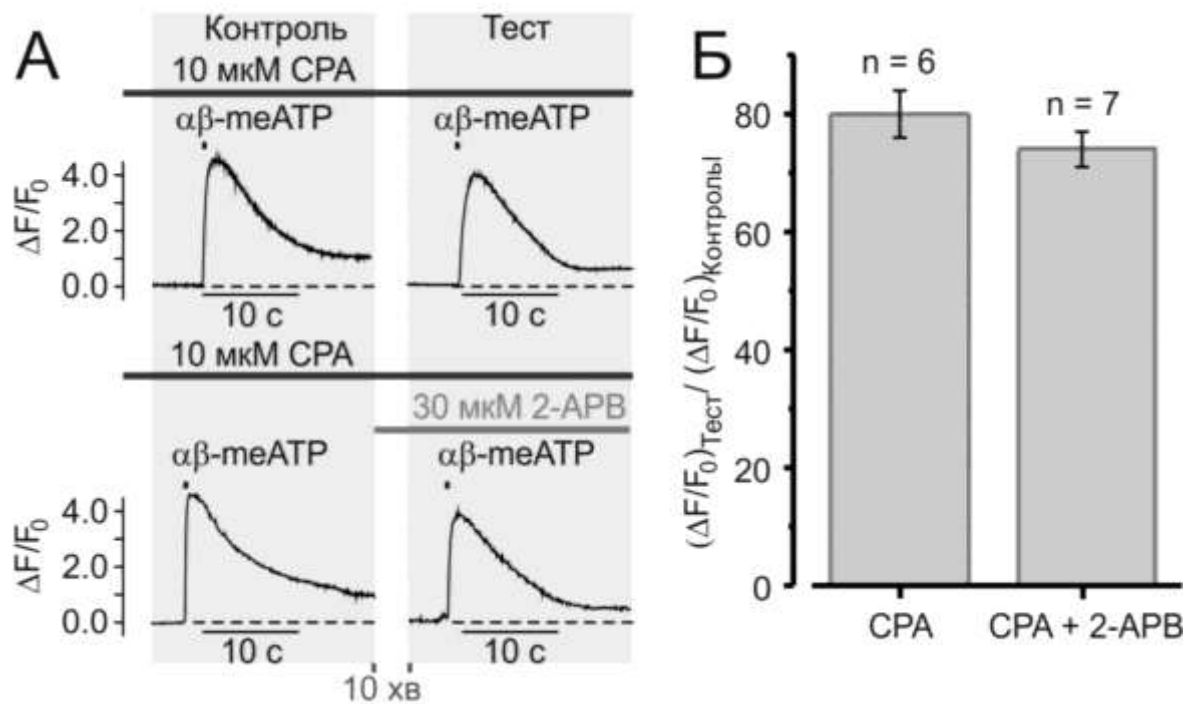


Рис. 3.11. 2-APB (30 мкМ) не впливає на механізми входу Ca^{2+} , викликані активацією P2X рецепторів.

Ліві панелі (А) ілюструють експериментальний протокол. Спустошення CP від кальцію за допомогою 10 мкМ CPA виявляє трансмембранний вхід Ca^{2+} , викликаний стимуляцією P2X рецепторів.

Амплітуда відповіді на кофеїн ($\Delta F/F_0$) відображає завантаження CP кальцієм (Б). Слід зазначити, що 2-APB статистично не достовірно впливає на середню амплітуду $\alpha\beta$ -meATP - індукованих відповідей після CPA. $p = 0.53$.

Це спостереження узгоджується з попередніми результатами, що 2-APB не пригнічує струмів ні через L-VGCCs [25], ні через P2X рецептори [195].

3.1.6.2. Визначення впливу дії 2-АРВ на завантаження СР іонами Ca^{2+}

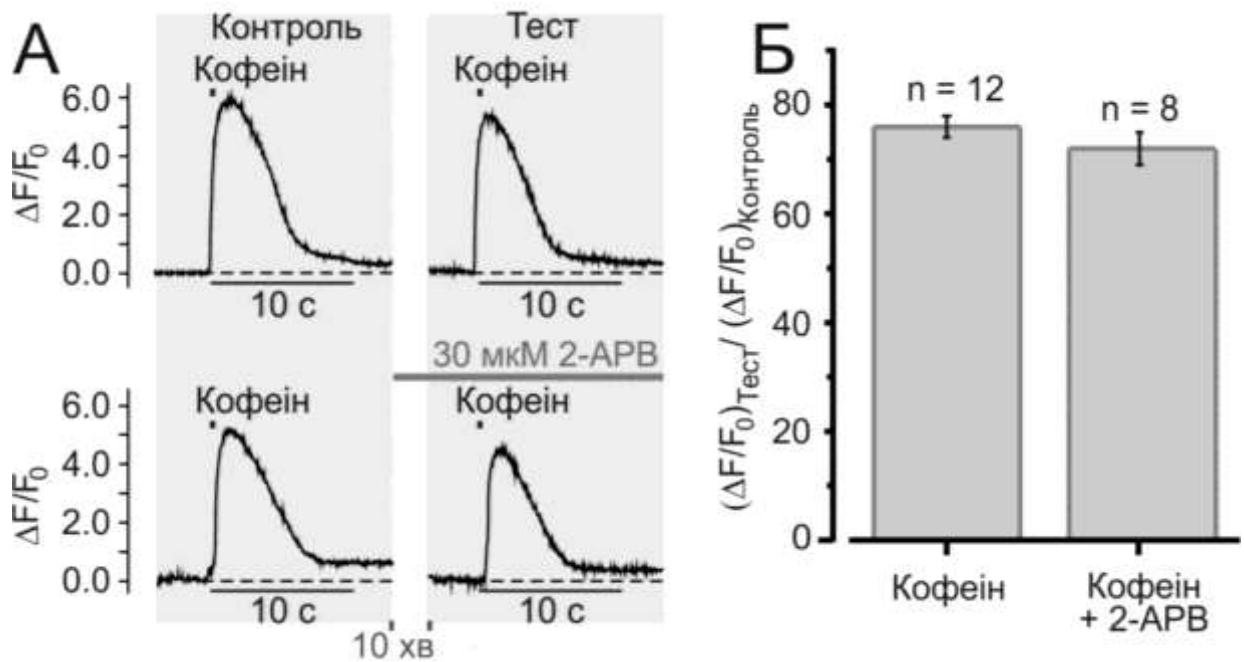


Рис. 3.12. 2-АРВ (30 мкМ) не впливає на завантаження СР кальцієм.

Ліві панелі (А) ілюструють експериментальний протокол. Амплітуда відповіді на кофеїн ($\Delta F/F_0$) відображає завантаження СР кальцієм.

(Б) 2-АРВ не впливає на середню амплітуду $\alpha\beta$ -мeATФ - індукованих відповідей після кофеїну $p = 0,37$.

Можливу чутливість механізмів завантаження кальцієм саркоплазматичного ретикулу до 2-АРВ оцінювали за допомогою 3 мМ кофеїну, який додавали до суспензії клітин до та після 10 хвилинної інкубації в 30 мкМ 2-АРВ (рис.3.12). Кожна з аплікацій кофеїну викликала подібні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзєнти ($n = 8$) що вказує на те, що 30 мкМ 2-АРВ не впливає на перезавантаження саркоплазматичного ретикулу в клітинах мезентеріальної артерії, та схожі дані були також отримані на ГМК мікросудин нирок [195]. Зважаючи на вище вказане, 30мкМ 2АРВ можна визнати як селективний блокатор IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} в клітинах мезентеріальної артерії.

3.1.6.3. Внесок IP_3Rs у вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулулу після активації P2X рецепторів.

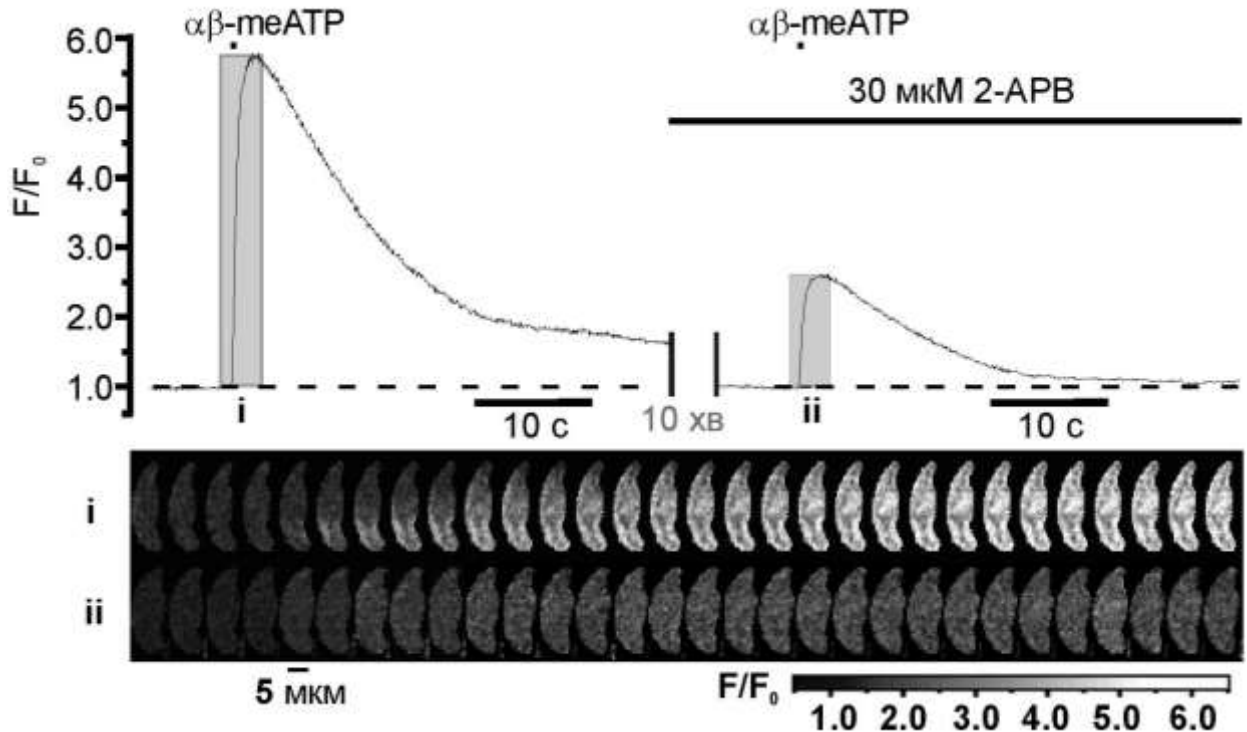


Рис. 3.13. Порівняння амплітуд $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаних відповідей при блокуванні IP_3Rs . Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації. Галереї під кривими демонструють конфокальні зображення послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i) та (ii) відповідно. Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у зображеннях, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Щоб проаналізувати внесок IP_3Rs у процес вивільнення Ca^{2+} із СР після активації P2X рецепторів, ми співвідносили амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ в присутності 30 мкМ 2-АРВ (рис 3.13) із амплітудами, отриманими на тих же клітинах в контрольних умовах.

3.1.6.4. Внесок RyRs у вивільнення Ca^{2+} із СР після активації P2X рецепторів.

Щоб проаналізувати внесок RyRs у процес вивільнення Ca^{2+} із СР після активації P2X рецепторів, ми співвідносили амплітуди $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів, викликаних 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ в присутності 100 мкМ тетракаїну (рис. 3.14) із амплітудами, отриманими на тих же клітинах в контрольних умовах.

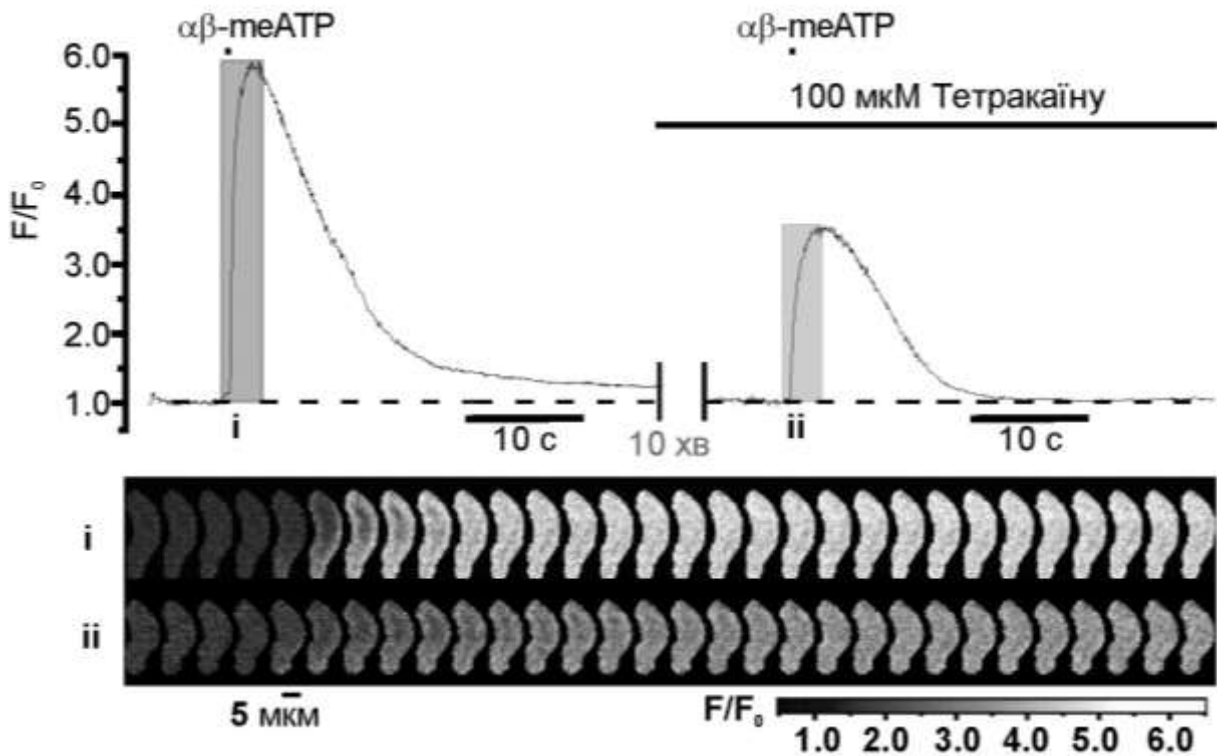
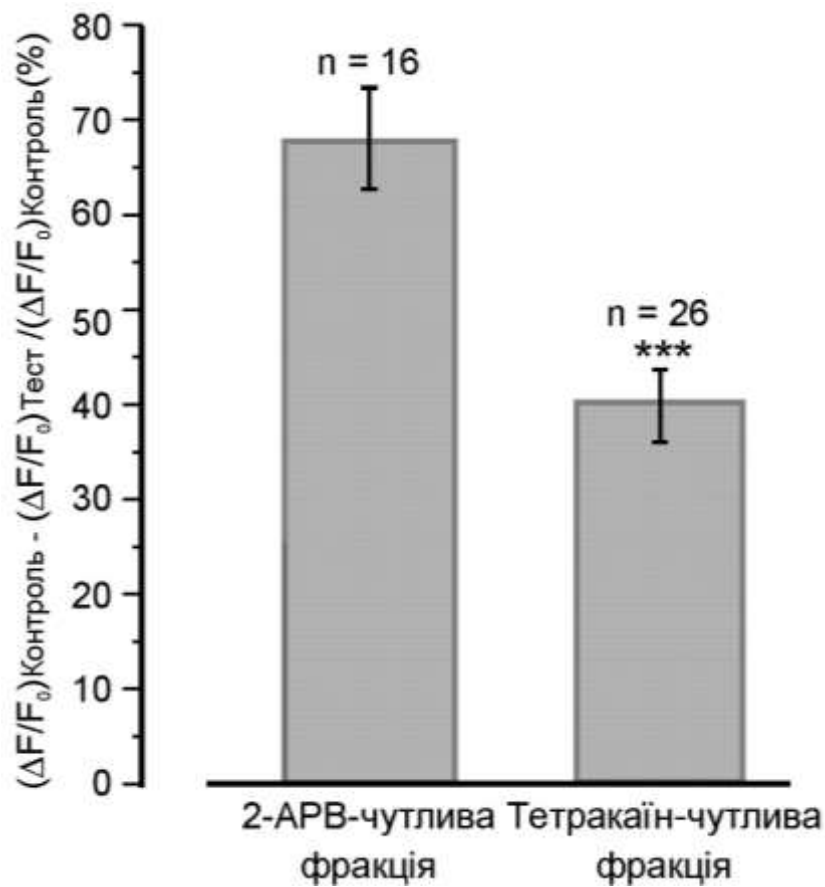


Рис. 3.14. Порівняння амплітуд $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаних відповідей при блокуванні RyRs. Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації. Галереї під кривими демонструють конфокальні зображення, послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i) та (ii) відповідно. Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у зображеннях, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Блок IP_3R , що був викликаний 30 мкМ 2-АРВ, пригнічував амплітуду Ca^{2+} сигналу значно сильніше, ніж блок $RyRs$, що був викликаний 100 мкМ тетракаїну: амплітуда SPCU в присутності 2-АРВ (за умовами коли $RyRs$ не заблоковані) зменшувалася на $67 \pm 7\%$ ($n = 16$), в той час як в присутності тетракаїну (за умовами коли IP_3R не заблоковані) зменшувалася на $40 \pm 5\%$ ($n = 26$) (рис. 3.15).



*Рис. 3.15. Діаграма порівнює 2-АРВ-чутливі і тетракаїн-чутливі фракції $\alpha\beta$ -мeATФ-індукованої відповіді. *** $p < 0.001$.*

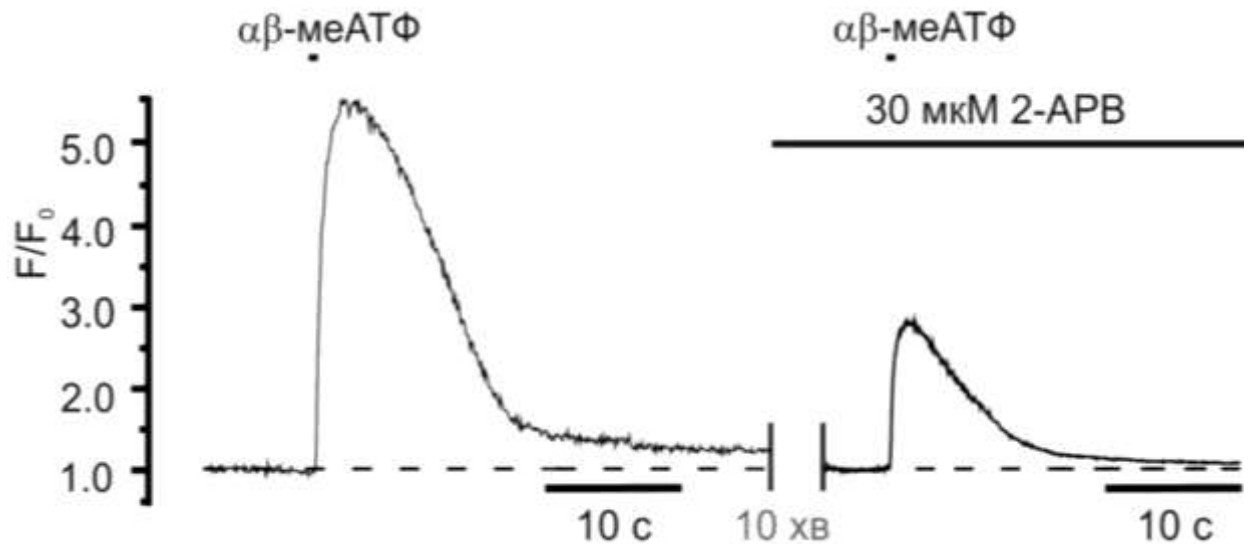


Рис. 3.16. Порівняння амплітуд $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаних відповідей при блокуванні IP_3Rs в ГМК ниркок щурів. Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації.

Були проведені дослідження на свіжо ізольованих ГМК ниркових артеріях щурів (рис. 3.16 і рис.3.17). Отримані дані підтверджують участь IP_3Rs і $RyRs$ при активації P2X рецепторів, що узгоджується з даними, отриманими на мезентеріальній артерії. Блокування $RyRs$ приводить до зниження амплітуди $\alpha\beta$ -меАТФ -викликанної відповіді ($\Delta F/F_0$) лише $18 \pm 5\%$ ($n = 7$). При цьому блокування IP_3Rs приводить до зменшення відповіді на $60 \pm 8\%$ ($n = 10$).

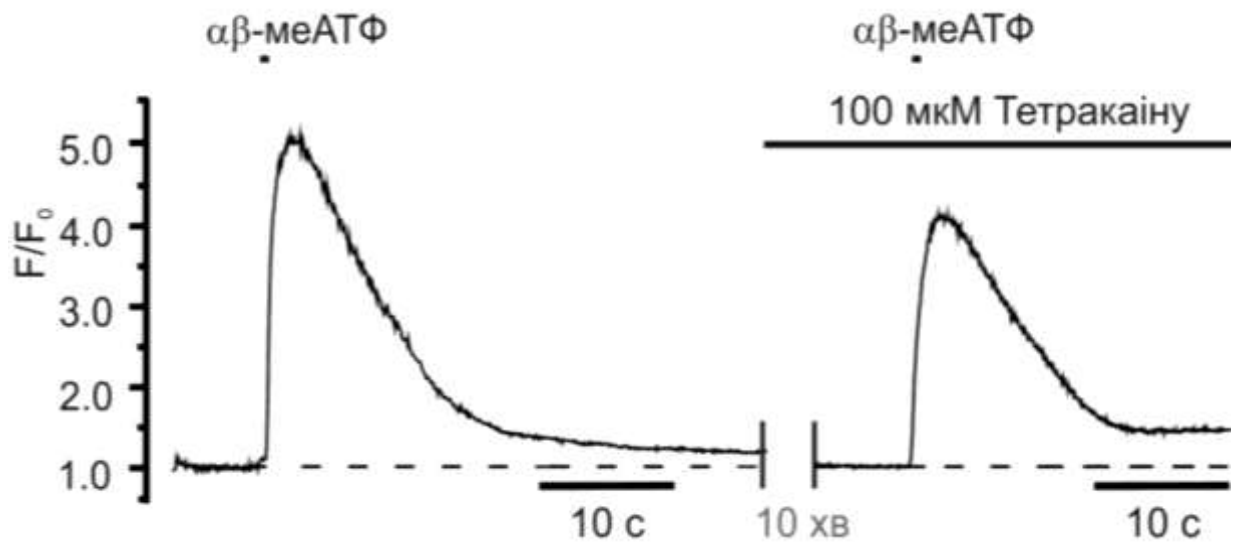


Рис. 3.17. Порівняння амплітуд $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаних відповідей при блокуванні RyRs в ГМК нирок щурів. Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації.

Таким чином можна зробити висновок, що активація P2XRs артеріальних міоцитів призводить до вивільнення Ca^{2+} через обидва типи рецепторів - IP_3Rs , і RyRs.

3.2.6. Функціональний зв'язок між L-VGCCs та рецепторами саркоплазматичного ретикулула

Щоб встановити зв'язок між механізмами входу Ca^{2+} в клітину та вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулула, які запускаються при активації P2X рецепторів, ми оцінювали як змінювався при блокуванні L-VGCCs відносний внесок IP_3Rs та RyRs у $\alpha\beta$ -meATФ-викликаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт (рис. 3.18 та рис. 3.19, відповідно).

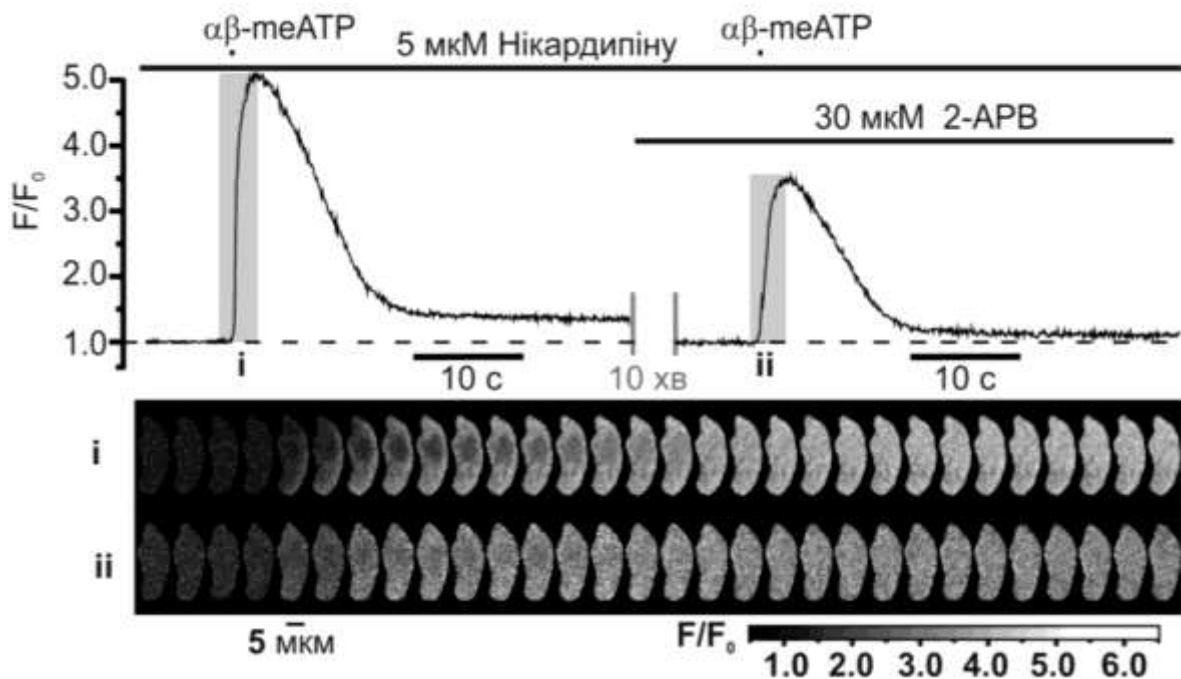


Рис. 3.18. Відносний внесок IP_3Rs у $\alpha\beta$ -meATФ-викликану відповідь в умовах блокування L-VGCCs. Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації. Галереї під кривими демонструють конфокальні іміджі послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i) та (ii) відповідно. Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у іміджах, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -meATФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Як було зазначено вище, в присутності 5 мкМ нікардипіну, блокатору L-VGCCs, внутрішньоклітинний Ca^{2+} сигнал ініціювався Ca^{2+} , який надходив у клітину виключно через P2X рецептори.

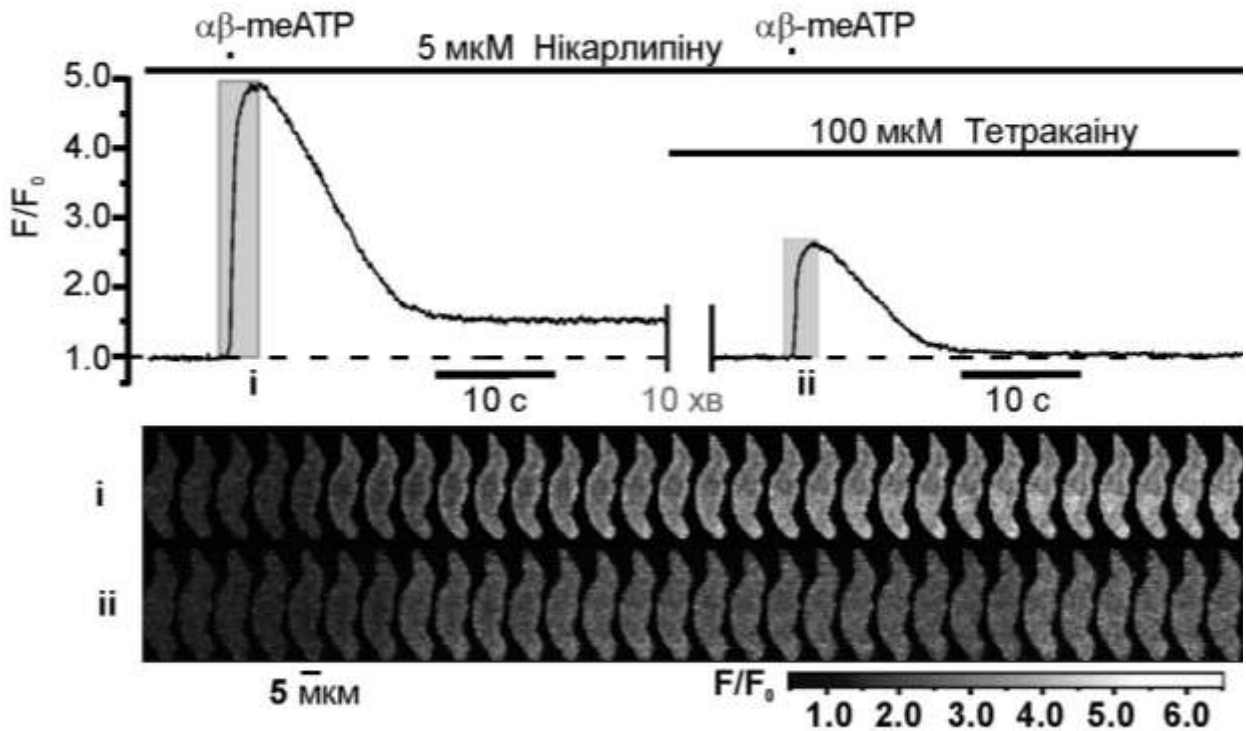


Рис. 3.19. Відносний внесок RyRs у $\alpha\beta$ -meATФ-викликану відповідь в умовах блокування L-VGCCs. Криві реєстрації показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0) з усередненням у суб-ПМ регіонах ініціації. Галереї під кривими демонструють конфокальні іміджі послідовно зібрані за період, відмічений на кривих сірим фоном (i) та (ii) відповідно. Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у іміджах, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -meATФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

При цих умовах відносний внесок IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} у $\alpha\beta$ -meATФ-викликаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт становив менше ($37 \pm 3\%$, $n = 9$) ніж внесок RyRs ($63 \pm 3\%$, $n = 7$) (рис. 3.20).

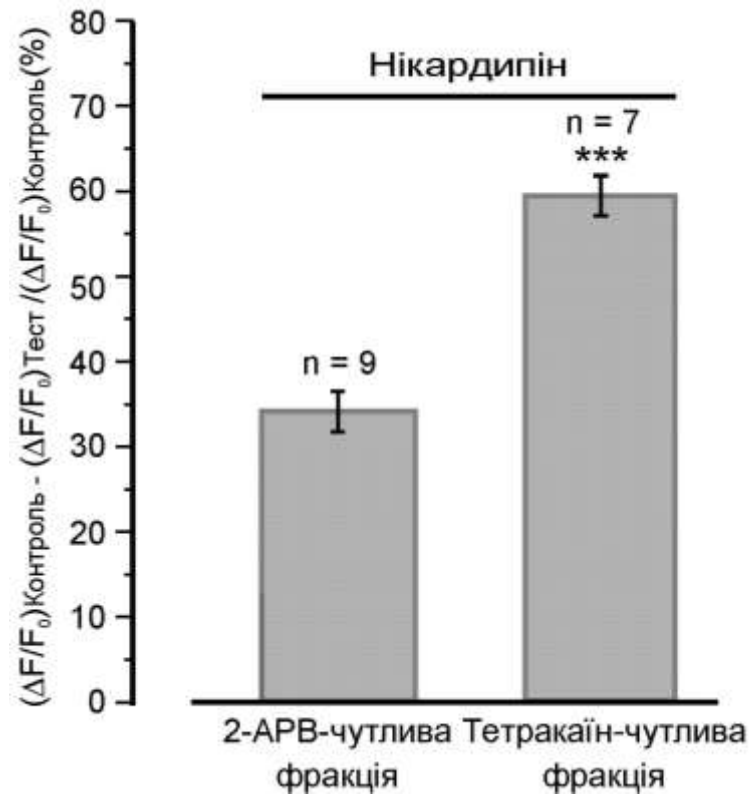


Рис. 3.20. Діаграма порівнює 2-АРВ-чутливі і тетракаїн-чутливі фракції $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованої відповіді в умовах блокування L-VGCCs. *** $p < 0,001$.

Значне зменшення ($p < 0.001$) внеску IP_3R у SPCU в присутності нікардіпіну означає, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} переважно пов'язане з L-VGCCs.

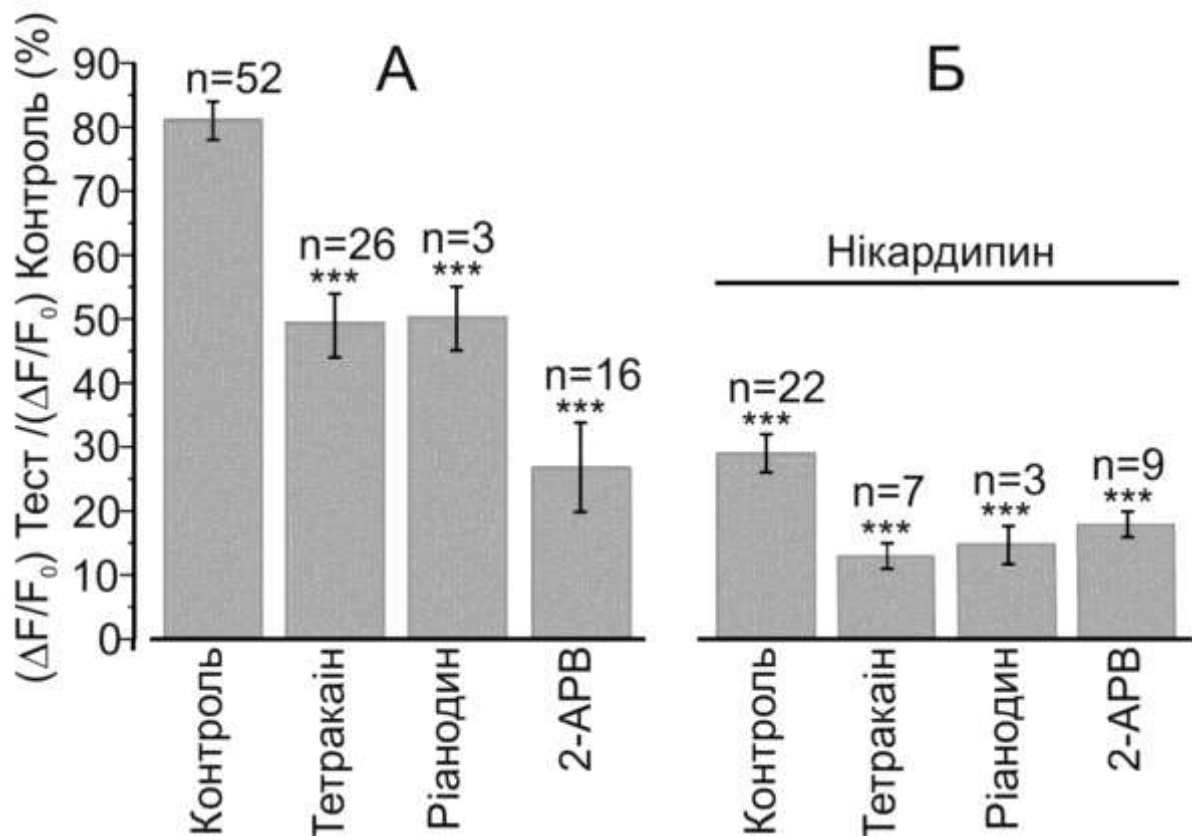


Рис. 3.21. Узагальнення результатів щодо дії інгібіторів *L*-VGCCs / *IP₃Rs* / *RyRs* на $\alpha\beta$ -мeATФ-індуковану відповідь. На діаграмі порівняно амплітуду піків $\alpha\beta$ -мeATФ-викликаної флуоресценції *Fluo-3* відповіді при тетракаїн/ріанодин або 2-АРВ-стійких фракцій до (А) і після (Б) блокування *L*-VGCCs. Відповіді "Контроль" отримані до інкубації з антагоністами вивільнення Ca^{2+} . *** $p < 0.001$

Зверніть увагу, що блокування *L*-VGCCs має набагато сильніший вплив на тетракаїн - стійку фракцію, ніж на 2-АРВ-стійку фракцію.

Сумарний результат блокади рецепторів саркоплазматичного ретикулула в контрольних умовах та при подальшій блокаді *L*-VGCCs представлені на рис. 3.21 (А, Б), в порівнянні з амплітудами SPCU, які були викликані активацією P2X рецепторів при умові (1) збереження VGCC-опосередкованої компоненти (вхід Ca^{2+} через *L*-VGCCs та через

P2X рецептори) (рис. 3.21, А) та (2) входу Ca^{2+} , який забезпечується тільки через P2X рецептори (рис. 3.21, Б).

Інгібування L-VGCCs призвело до істотного зниження IP_3R -внеску в $\alpha\beta$ -меАТФ індукований $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт. Безумовно, тетракаїн/ріанодин-чутлива фракція (основний внесок якого IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} , зменшується після блоку L-VGCCs більше ніж в 4 рази: від $60 \pm 5\%$ ($n = 26$) / $62 \pm 6\%$ ($n = 3$) до $16.6 \pm 2\%$ ($n = 7$) / $18 \pm 3\%$ ($n = 3$), відповідно. У той же час 2-АРВ-чутлива фракція (яка виникає в основному через RyR -опосередковане вивільнення Ca^{2+}) зменшується тільки на 10%: від $33 \pm 7\%$ ($n = 16$) до $22.7 \pm 3\%$ ($n = 9$). Треба відзначити проте, що фракція $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаної відповіді fluo-3 сигналу, яка залишається в присутності нікардипіну ($36 \pm 3\%$; $n = 22$) була подібна до залишкової фракції після блоку IP_3Rs в присутності 2-АРВ ($33 \pm 7\%$; $n = 16$). Це свідчить про те, що : (1) хоча прямий вхід Ca^{2+} безпосередньо через L-VGCCs робить порівняно невеликий внесок у $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану відповідь, але значно підсилюється IP_3R -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} і (2) активація L-VGCCs – не єдиний механізм який пов'язує активацію P2X рецепторів з IP_3R - опосередкованим вивільненням Ca^{2+} .

Зважаючи на те, що активація P2X рецепторів не пов'язана з механізмом активації фосфоліпази С (PLC), базальний рівень $[\text{IP}_3]_i$, який продукується спонтанною активністю PLC [183, 195, 198, 199] може відгравати ключову роль в активації IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} яке запускається потенціалзалежним входом Ca^{2+} в клітину. Тому ми тестували дію комерційно існуючих інгібіторів PLC на амплітуду $\alpha\beta$ -меАТФ -викликаних $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів. Як аміностероїдна сполука U-73122, так і її відносно неактивний (інертний) аналог U-73343 [200] значно зменшували $\alpha\beta$ -меАТФ викликану амплітуду відповіді (рис. 3.22).

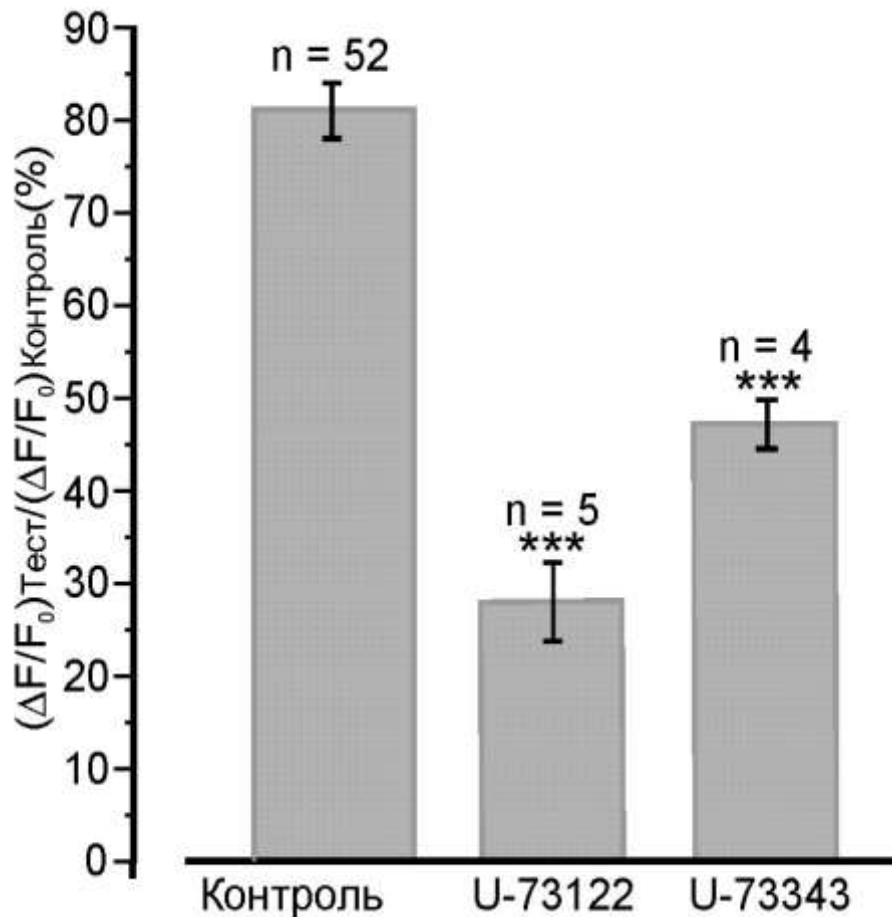


Рис. 3.22. Залучення IP_3 в активацію IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} після стимуляції $P2X$ рецептора оцінювали за допомогою блокування PLC . Діаграма порівнює амплітуду $\alpha\beta$ -меАТФ-викликані флуоресценції Fluo-3 відповіді U-73122- і U-73343-стійкі фракції $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей Fluo-3 з «Контролем». *** $p < 0,001$.

Проте вплив 2.5 мкМ U-73122 (зменшення амплітуди на $65 \pm 7\%$; $n = 5$) був значно сильніший ніж 2.5 мкМ U-73343 (зменшення амплітуди на $42 \pm 5\%$; $n = 4$). Хоча ці сполуки, як відомо, мають багато побічних ефектів, що відносяться до алкілування різних білків [183], відмінність між дією U-73122, і U-73343 пояснюється, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} , викликане активацією $P2X$ рецепторів, залежить від активності PLC .

Функціональний зв'язок між L-VGCCs та IP_3Rs означає експресію IP_3Rs в під мембранних “junctional” елементах саркоплазматичного ретикулума (jSR). Структурна основа для цього зв'язку може полягати в просторовій ко-локалізації L-VGCCs в плазматичній мембрані та IP_3Rs в підмембранних елементах саркоплазматичного ретикулума. Просторова ко-локалізація між IP_3Rs та L-VGCCs була раніше запропонована для клубочкових клітин [108].

3.2. Реєстрація скоротливої активності ГМК

Зміни тонуусу і скорочення резистивних артерій, регулюються симпатичною нервовою системою, одним з основних нейро-передатчиків якої є АТФ [1, 7].

Слід зазначити, однак, що в багатоклітинних препаратах, таких як судинні кільця, суперфузія агоніста P2X рецепторів в експериментальній камері може активувати P2X рецептори, які розміщені не тільки в ГМК, а й в екстрасинаптичних дендритних регіонах симпатичних нервів. В результаті, іони Ca^{2+} , що надходять через P2X рецептори в нервові закінчення можуть викликати вивільнення норадреналіну, який, впливаючи на метаботропні $\alpha 1$ - адренорецептори ГМК, стимулює PLC- β через $G_{q/11}$ білки, що веде до збільшення $[IP_3]_i$ і IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} [201].

3.2.1. Скоротливі відповіді м'язових смужок мезентеріальної артерії на АТФ та $\alpha\beta$ -меАТФ.

Аплікація неселективного агоніста пуринорецепторів, АТФ, чи селективного агоніста P2X₁ рецепторів, $\alpha\beta$ -меАТФ в перфузуючий розчин призводила до швидкого фазного скорочення. При цьому, чутливість препарату до $\alpha\beta$ -меАТФ була на 2 порядки вищою, ніж до АТФ. Одинакові за амплітудою фазні скорочення викликалися 1 мМ розчином АТФ чи 10 мкМ розчином $\alpha\beta$ -меАТФ. Крім того, реакція на АТФ мала дещо більшу тривалість і меншу швидкість активації і спаду: (1) час до піку 16.2 ± 0.5 с ($n = 7$) та 12.3 ± 0.8 с ($n = 6$) при стимуляції АТР та $\alpha\beta$ -меАТФ, відповідно; (2) загальна тривалість при напівмаксимальній амплітуді складала 64.4 ± 0.5 с ($n = 7$) та 39.4 ± 0.3 с ($n = 6$) при стимуляції АТФ та $\alpha\beta$ -меАТФ, відповідно. Значно нижча ефективність АТФ порівняно з його метаболічно стабільним аналогом $\alpha\beta$ -меАТФ пояснюється метаболічним руйнуванням

АТФ нуклеотидазами, які зберігають активність в артеріальних препаратах [57, 202].

Хоча P2X рецептори швидко десенситизуються, вони встигають започаткувати низку складних процесів, кінцевим результатом яких є скорочення. Тому тривалість скоротливої реакції на $\alpha\beta$ -мeATФ відображує взаємодію і часовий хід всіх таких процесів. Більша тривалість фазного скорочення на АТФ може означати залучення до процесу не тільки P2X₁, але і інших P2 рецепторів, до яких АТФ є агоністом.

Зважаючи на вищевикладене, подальше дослідження ми обмежили застосуванням лише селективного агоніста P2X₁ рецепторів - $\alpha\beta$ -мeATФ [35].

Однак, навіть після такого обмеження, реакція ГМК на активацію P2X рецепторів залишається досить складною, оскільки до неї залучаються декілька механізмів. Збільшення проникності мембрани до іонів Na⁺, K⁺ і Ca²⁺ при активації катіонного каналу, яким є P2X рецептор, викликає деполяризацію мембрани. Деполяризація, в свою чергу, активує вхід Ca²⁺ в клітину через L-VGCCs. Первинне збільшення [Ca²⁺]_i завдяки входу через P2X рецептори і L-VGCCs може підсилюватися за рахунок вивільнення Ca²⁺ із СР за механізмом CICR. Тому застосування інгібіторів RyRs та IP₃Rs може пролити світло на особливості залучення вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо до АТФ індукованої реакції. З іншого боку, застосування інгібіторів L-VGCCs може допомогти розмежувати ефекти, що викликаються іонами Ca²⁺, які входять в клітину через пуринорецептори і іонами Ca²⁺, які входять через Ca²⁺ канали L-типу.

3.2.2. Вплив інгібіторів IP_3R та RyR ізометричні фазні скорочення, викликані стимуляцією $P2X$ рецепторів.

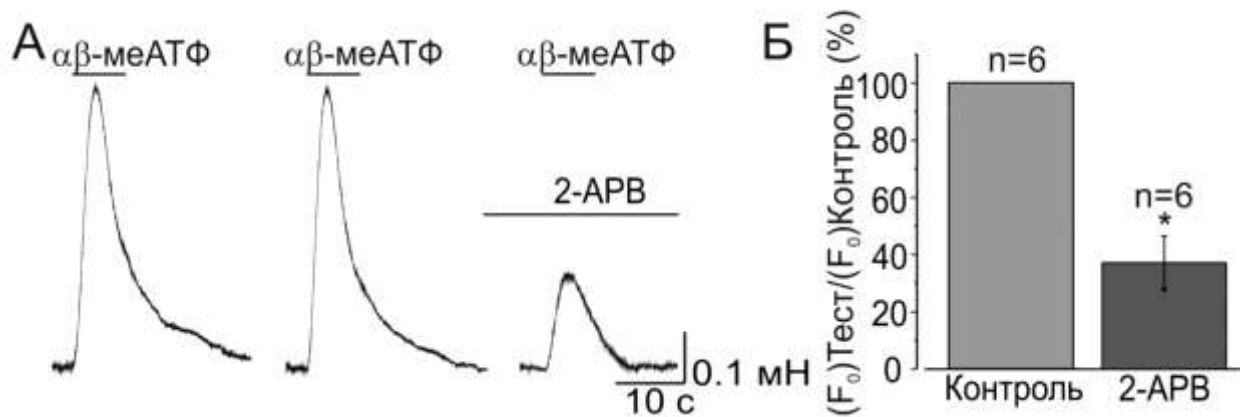


Рис. 3.23. Вплив блокатора IP_3Rs на фазне скорочення, що викликається агоністом $P2X_1$ рецепторів.

(А) Показані типові записи скорочення на дію $10 \mu\text{M}$ $\alpha\beta\text{-meATP}$ згідно протоколу, преінкубаційна дія $60 \mu\text{M}$ 2-APB в перфузуючому розчині складала 25 хвилин.

(Б) Статистично значима різниця ($*P < 0.05$) між амплітудою скорочення в контрольних умовах та в присутності 2-APB .

На рис. 3.23 (А) та рис. 3.24 (А) показані типові результати дослідів, в яких визначалась роль $RyRs$ та IP_3Rs у вивільненні Ca^{2+} із CP після стимуляції $P2X_1$ рецепторів $10 \mu\text{M}$ $\alpha\beta\text{-meATP}$. Для цього в омиваючий розчин Кребса на 25 хвилин додавали блокатор $RyRs$ ($100 \mu\text{M}$ тетракаїну) або IP_3Rs ($60 \mu\text{M}$ 2-APB), і вимірювали частку від контрольної реакції, що залишалась стійкою до дії блокатора.

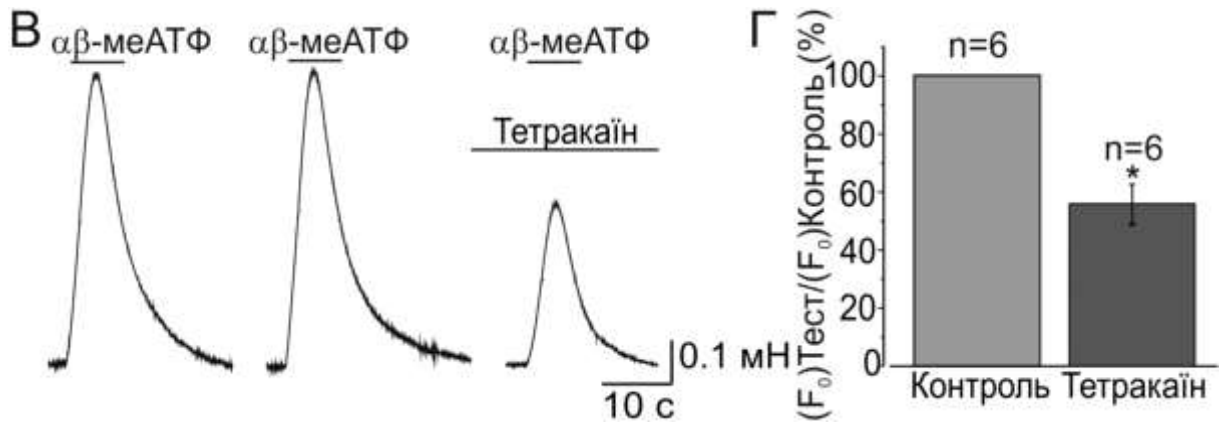


Рис. 3.24. Вплив тетракаїна, блокатора RyRs, на фазне скорочення, що викликається стимуляцією P2X₁ рецепторів.

(А) Показані типові записи скорочення на дію 10 мкМ αβ-меАТФ згідно протоколу, преінкубаційна дія 100 мкМ тетракаїна в перфузуючому розчині складала 25 хвилин.

(Б) Статистично значима різниця (* $P < 0.05$) між амплітудою скорочення в контрольних умовах та в присутності тетракаїна.

Значне зменшення амплітуди фазного скорочення в присутності антагоністів RyRs та IP₃Rs вказує на те, що обидва типи рецепторів є важливими гравцями в механізмах, що залучаються до пуринергічної регуляції системи кровообігу. При цьому більша частка (61.7 ± 9.6 %) скоротливої реакції виявилась чутливою до пригнічення IP₃Rs (рис. 3.23, Б) в той час як RyRs були відповідальні за 48.2 ± 7.8 % скоротливої реакції (рис.3.24, Б). Перевищення сумою двох часток рівня 100 % свідчить про кооперативність цих процесів, тобто, що Ca²⁺, який вивільнюється через IP₃Rs, залучається до вивільнення Ca²⁺ через RyRs і/або навпаки. Подібна перехресна взаємодія між IP₃Rs та RyRs спостерігалась в ГМК ворітної вени [203].

3.2.3. Особливості залучення трансмембранного входу Ca^{2+} до вивільнення Ca^{2+} через RyRs і IP_3Rs саркоплазматичного ретикулу.

На рис. 3.25 та рис. 3.26 показані результати досліджень дії блокаторів IP_3Rs та RyRs на $\alpha\beta$ -меАТФ -індуковане ізометричне фазне скорочення, як і на рис.3.23 та рис.3.24, але в присутності антагоніста Ca^{2+} каналів L-типу, нікардіпіну (5 мкМ).

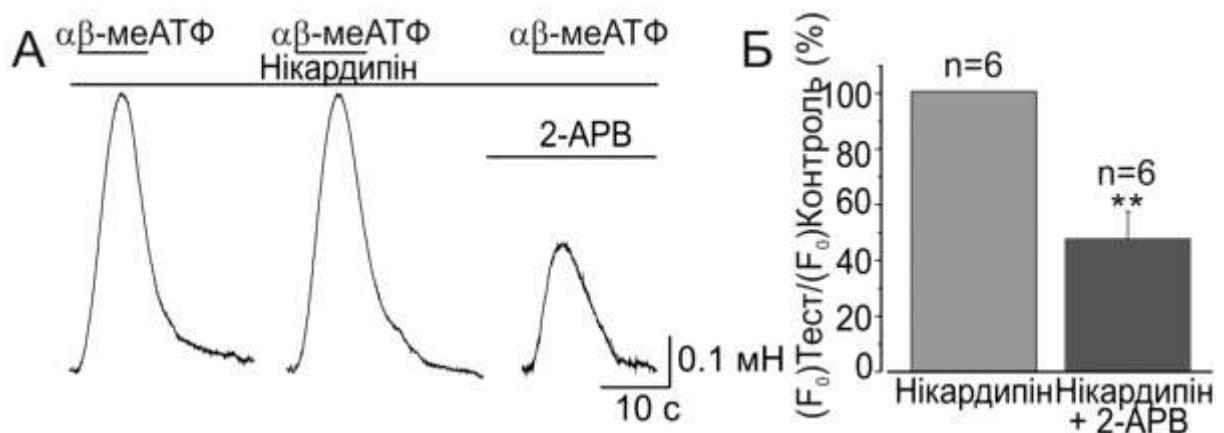


Рис.3.25. Вплив 2-APB, блокатору IP_3Rs , на фазне скорочення, що викликається агоністом P2X_1 рецепторів в присутності блокатора потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу (нікардіпіну)

(А) Показані типові записи скорочення на дію 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ в присутності 5 мкМ нікардіпіну згідно протоколу, преінкубаційна дія 60 мкМ 2-APB в перфузуючому розчині складала 25 хвилин.

(Б) На діаграмі порівняно усереднені результати амплітуди контрольного скорочення в присутності нікардіпіну і амплітуди скорочення після дії блокатора IP_3Rs . ** $P < 0.01$.

Ми порівнювали результати в присутності і відсутності нікардіпіну щоб виявити особливості залучення іонів Ca^{2+} , що проникають через різні канали поверхневої мембрани, до вивільнення Ca^{2+} через RyRs і IP_3Rs

саркоплазматичного ретикулу. Якщо RyRs і IP₃Rs однаково досяжні для іонів кальцію, що входять в клітину через P2X рецептор чи Ca²⁺ канал, то обмеження входу Ca²⁺ через один з цих шляхів призводило би до однакового зменшення CICR без зміни відносного внеску кожного з рецепторів в загальне скорочення.

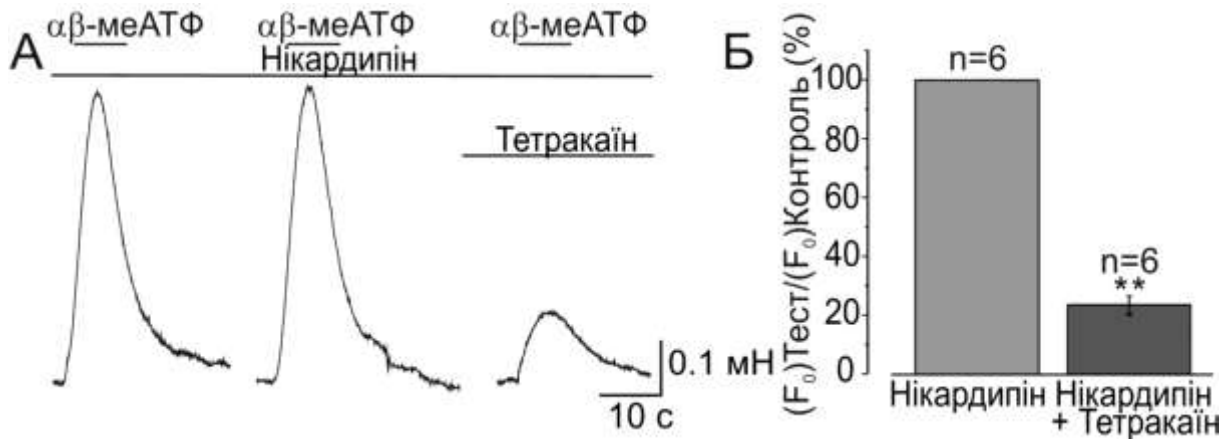


Рис.3.26. Вплив тетракаїну, блокатора ріанодинових рецепторів, на фазне скорочення, що викликається агоністом P2X₁ рецепторів в присутності блокатора потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу (нікардипіну)

(А) Показані типові записи скорочення на дію 10 мкМ αβ-меАТФ в присутності 5 мкМ нікардипіну згідно протоколу, преінкубаційна дія 100мкМ тетракаїну в перфузуючому розчині складала 25 хвилин.

(Б) На діаграмі порівняно усереднені результати амплітуди контрольного скорочення в присутності нікардипіну і амплітуди скорочення після дії блокатора ріанодинових рецепторів. ** P < 0.01.

3.2.4. Порівняння внеску IP_3Rs та $RyRs$ у фазне скорочення в контрольних умовах та при обмеженні входу Ca^{2+} через L-VGCCs.

Результати наших досліджень, підсумовані на рис. 3.27, показують, що після обмеження входу Ca^{2+} через L-VGCCs, на 29 % збільшується відносний внесок $RyRs$ в скорочення, що викликане активацією $P2X_1$ рецепторів. Це може означати, що активація вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних запасників іонами Ca^{2+} , які входять через L-VGCCs, опосередковується переважно через IP_3Rs .

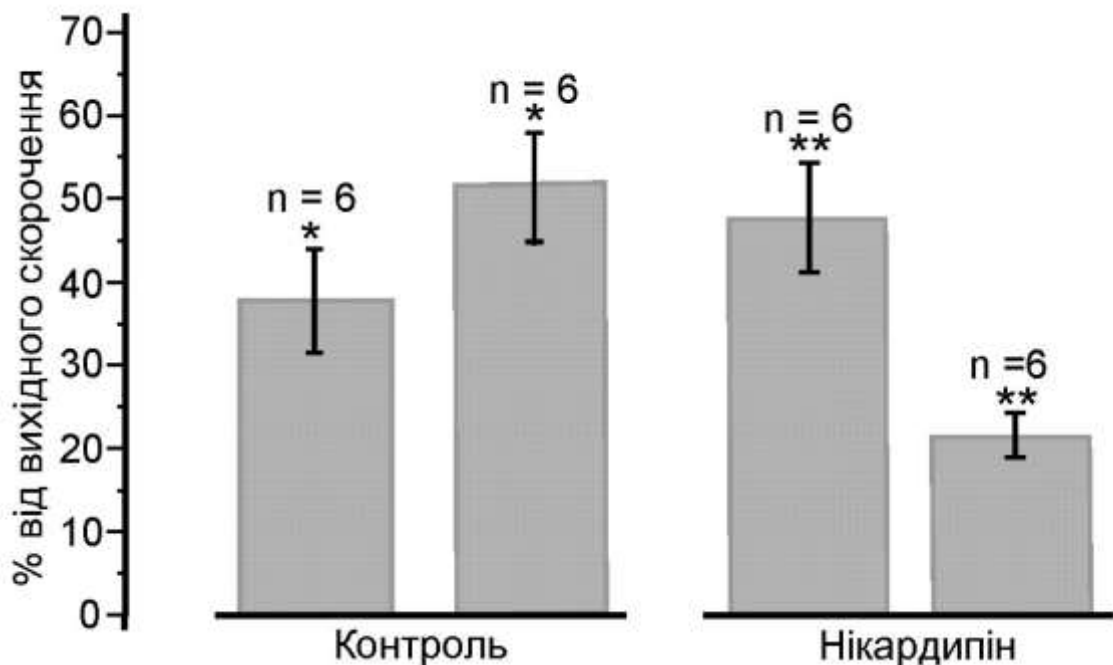


Рис 3.27. Зменшення відносного внеску IP_3Rs у фазне скорочення, що викликається агоністом $P2X_1$ рецепторів при обмеженні входу Ca^{2+} через потенціалкеровані кальцієві канали 5 мкМ нікардипіну

За 100 % прийнято вихідне скорочення згідно протоколу.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ відносно 100%.

При блокуванні цих каналів внесок IP_3Rs зменшується настільки, що більш вагомим стає вивільнення Ca^{2+} через $RyRs$. Отримані результати

показують, що іони кальцію, які входять через L-VGCCs більш ефективно взаємодіють з IP_3Rs , ніж з $RyRs$.

Таким чином, тензометричні дослідження на сегментах мезентеріальної артерії морської свинки підтверджують участь обох механізмів у посиленні кальцієвого сигналу при активації іонотропних $P2X$ рецепторів.

3.3. Дослідження топології внутрішньоклітинні Ca^{2+} депо.

Внутрішньоклітинні Ca^{2+} депо були візуалізовані в ГМК мезентеріальної артерії за допомогою низькоафінного Ca^{2+} індикатора Fluo-3FF, що співпадало з елементами саркоплазматичного ретикулума, які були візуалізовані Brefeldin A BODIPY ($n = 12$), і склалися із деяких центральних елементів та із під мембранної сітки CP (рис. 3.28). Подібна організація CP була раніше опублікована для інших типів ГМК [27, 139, 194].

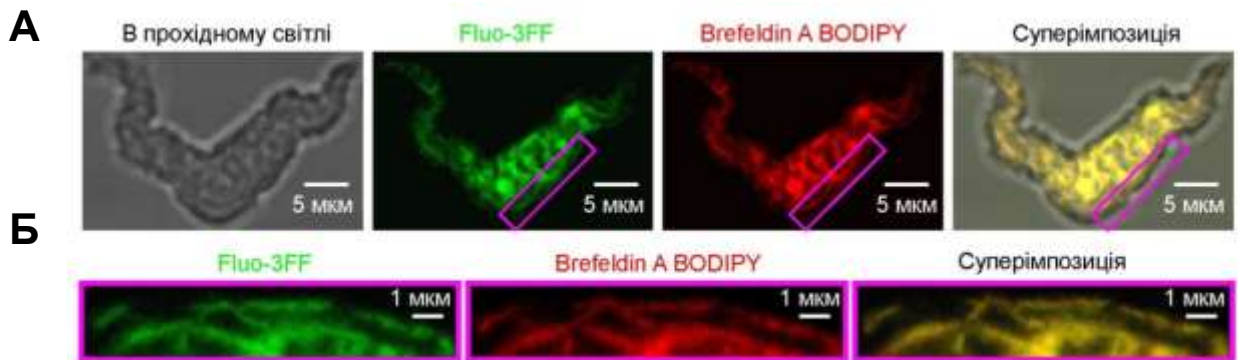


Рис. 3.28. Конфокальні зображення у фазово-контрастному світлі, у Fluo-3FF і у флуоресценції Brefeldin BODIPY і їх накладення одне на одне – суперімпозиція (А; зліва направо) демонструють просторову організацію CP в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки. Збільшені зображення виділених регіонів показано на малюнку (Б) після обертання за годинниковою стрілкою на 45° .

3.4. Підмембранний SR збагачений IP_3Rs

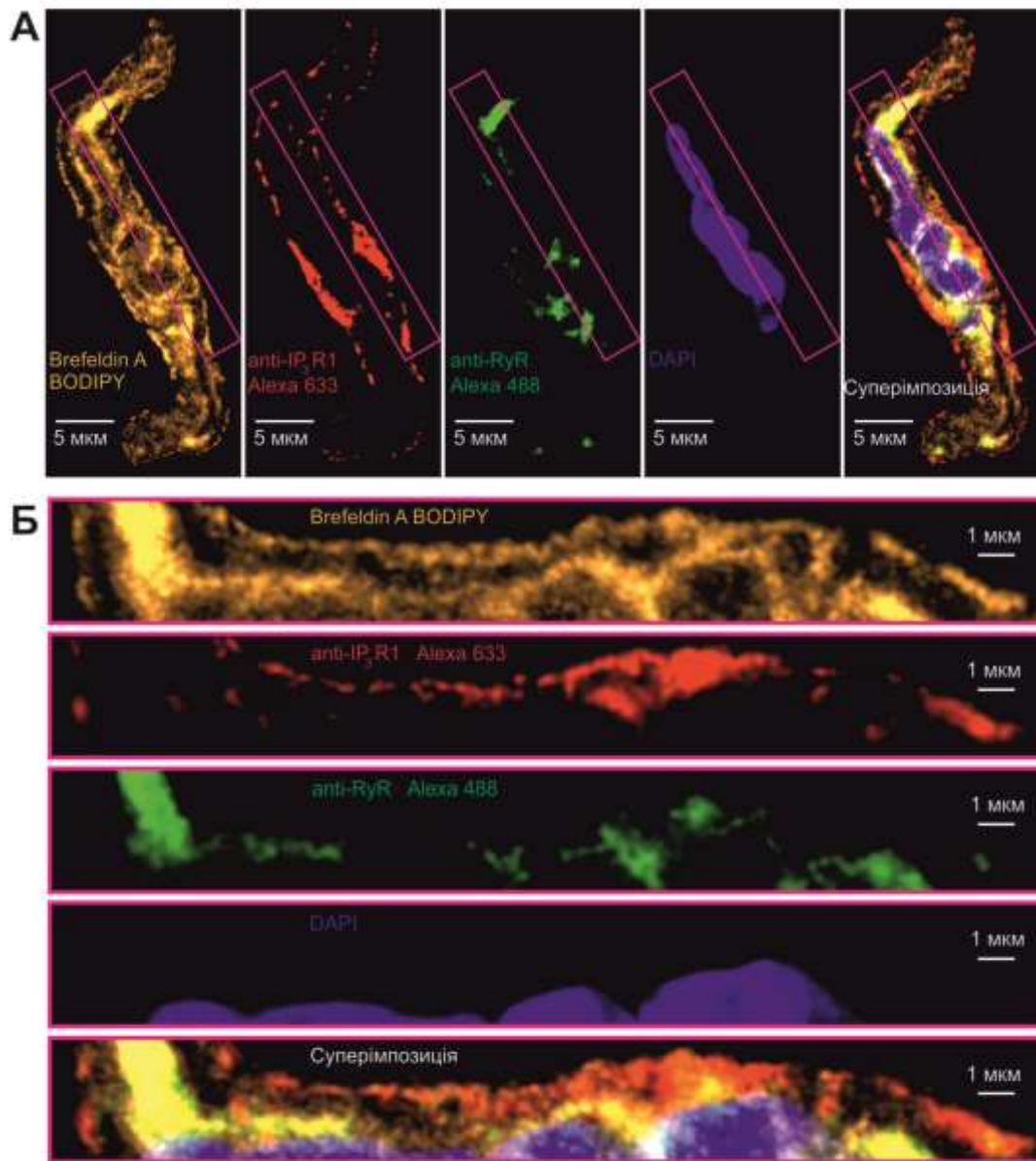


Рис.3.29. Конфокальні зображення Brefeldin A BODIPY, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 488 і флуоресценції DAPY, і їх накладення один на одний (А; зліва направо) ілюструють просторовий розподіл елементів СР, IP_3Rs , RyRs і ядра, відповідно. Збільшені зображення виділених регіонів показано на малюнку (Б) після обертання проти годинникової стрілки на 60° .

Імунозabarблення RyRs та IP_3Rs 1 типу в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки, за допомогою забарвлення SR Brefeldin A

BODIPY та ядра - DAPI виявило (рис. 3.29), що IP_3Rs 1 типу переважно експресовані у підмембранних елементах СР по всій периферії клітини, у той час як $RyRs$ знаходяться переважно у центральних підмембранних та більш глибоких центральних елементах СР ($n = 15$), що мало чим відрізняється від ГМК мікросудин нирки [200]. Ця особливість розподілу IP_3Rs сприяє VGCC- IP_3R зв'язку, який може полегшувати накопичення молекул, включаючи Ca^{2+} [120, 199] та IP_3 , в мікрооб'ємі цитозолу між jSR та мікродоменами плазмолемми з якого дифузія в об'єм цитоплазми помітно обмежена [199].

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Оскільки підвищення $[Ca^{2+}]_i$ є основним сигналом до скорочення усіх типів м'язів, механізми, що приводять збудження до мобілізації $[Ca^{2+}]_i$, а також просторова організація та молекулярний склад структурно-функціональних одиниць, які відповідають за внутрішньоклітинне вивільнення іонів Ca^{2+} , є важливими факторами, що визначають скорочувальну відповідь. Тим не менше, механізми, які пов'язують процес збудження із мобілізацією Ca^{2+} в скелетних, серцевих і гладеньких м'язах різні.

У скелетних м'язах, збудження викликає вивільнення Ca^{2+} із СР через взаємодію «білок-білок» між L-VGCCs і RyRs, тобто прямою взаємодією між датчиком потенціалу в Т-трубочках (потенціалкерованими Ca^{2+} каналами L-типу/дигідропіридиновими рецепторами; L-VGCCs) і ріанодіновими рецепторами (RyRs), експресованими в термінальних мішках СР (огляди [126, 204, 205]).

У серцевих м'язах, вхід Ca^{2+} через L-VGCCs викликає вивільнення Ca^{2+} через RyRs за механізмом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR) (див. огляди [206, 207, 208]). В обох випадках структурною основою зв'язку збудження-скорочення є розміщення RyRs на кінцях саркомерів СР в тісному зіставленні Т-трубочок із L-VGCCs.

У гладеньких м'язах, цитозольні іони Ca^{2+} , які запускають скорочення клітин, можуть бути мобілізованими або деполяризацією клітинної мембрани, яка призводить до входу іонів Ca^{2+} через L-VGCCs (електромеханічний зв'язок, [209]), або шляхом активації різних рецепторів (фармакомеханічний зв'язок, [210, 209]), в основному пов'язаних через $G_{q/11}$ -білок із стимуляцією фосфоліпази С (PLC), утворенням IP_3 та IP_3R -опосередкованим вивільненням іонів Ca^{2+} , або поєднанням цих механізмів [211]. Будь-яка з цих подій, що викликає початкове зростання $[Ca^{2+}]_i$, може

бути додатково підсилена RyR-опосередкованим вивільненням іонів Ca^{2+} , активованим через механізм CICR [16, 23, 24, 75, 212, 213, 214, 215, 216, 232].

Відносний внесок RyRs і IP_3Rs у внутрішньоклітинну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ мобілізацію та роль цих рецепторів у виникненні локалізованих подій вивільнення іонів Ca^{2+} (sparks та puffs), розповсюдженні Ca^{2+} хвиль та осциляцій $[\text{Ca}^{2+}]_i$ змінюється в різних типах ГМК і часто залежить від механізму та сили стимулювання ГМК. З практичного погляду надзвичайно важливим є те, що RyRs відкриваються кофеїном у мілімолярній концентрації, в якій вони також можуть проходити крізь клітинну мембрану і тому є зручним чинником для експериментального вивчення функції CP [70].

Характеристики кальцієвих сигналів визначаються складним комплексом молекулярних механізмів, які включають:

- 1) кальцієві іонні канали ПМ, що відкриваються в разі збудження клітини і зумовлюють вхідний потік іонів;
- 2) зв'язування іонів Ca^{2+} цитоплазматичними буферними системами;
- 3) захоплення іонів цитоплазматичними органелами (саркоплазматичним ретикуломом, мітохондріями) з наступним вивільненням їх у цитозоль під час активування відповідних каналів чи транспортерів у їх мембрані;
- 4) зворотній викид іонів Ca^{2+} з клітини в позаклітинне середовище.

Характеристики окремих компонентів цього комплексу різних типах ГМК варіюють, що призводить до відповідних відмін їх функціональних особливостей.

Також відомо, що у ГМК основним депо Ca^{2+} є CP [12, 139]. Особлива участь мітохондрій в кальцієвій сигнальній системі ГМК. Мітохондрії – мобільні внутрішньоклітинні високо енергетичні інтегратори метаболічних та іонних сигналів, які здатні акумулювати Ca^{2+}

в значній кількості. Надходження Ca^{2+} всередину мітохондрій в основному забезпечується електрофоретичним уніпортером, активність якого залежить від електрохімічного протонного градієнта на внутрішній мітохондріальній мембрані [217]. Протягом досить тривалого часу в науковій літературі панувала думка, що мітохондрії є важливим, якщо не головним, внутрішньоклітинним пулом Ca^{2+} котрий забезпечує низький рівень цього катіона в цитоплазмі [218].

Проте з часом дослідники почали стверджувати, що мітохондрії не відіграють істотної ролі в підтримці кальцієвого гомеостазу клітини. Так, на скінованих ГМК було Ca^{2+} показано, що за «фізіологічних» концентрацій вільного Ca^{2+} (1 мкМ – 100мкМ) мітохондрії поглинають не більше 15% $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [219]. Отже, низька афінність Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій стала основним аргументом у запереченні акумуляції іонів Ca^{2+} мітохондріями за фізіологічних умов [220, 221, 222]. Вважається, що мітохондрії задіяні у Ca^{2+} -гомеостазі тільки в умовах патологічних станів, коли клітини перевантажені іоном Ca^{2+} [223]. Висловлювалась також думка, що зв'язок між СР та мітохондріями відіграє ключову роль у різноманітних механізмах, що забезпечують виживання або загибель клітини [224].

Тому при всій складності шляхів і механізмів передачі сигналу, можна упевнено стверджувати, що в основі пуринергічного збудження і скорочення лежать деполяризація мембрани, вхід Ca^{2+} в клітину і вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо.

Таким чином, активація P2X рецепторів викликає збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$, що є результатом комбінованого внеску декількох пов'язаних процесів: входу Ca^{2+} через плазматичну мембрану безпосередньо через P2X рецептори, входу Ca^{2+} через потенціалкервані Ca^{2+} канали L-типу (L-VGCCs), які активуються P2X-рецептор-опосередкованою деполяризацією мембрани, і вивільненням Ca^{2+} із СР, яке було викликане цим входом іонів Ca^{2+} .

Наші результати показують, що активація P2X рецепторів ГМК мезентеріальної артерії морської свинки викликає паралельне включення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які розрізняються своїм внеском у створення спільної внутрішньоклітинної $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповіді.

Перший шлях ініціюється входом Ca^{2+} безпосередньо через P2X рецептори і забезпечує $\sim 36\%$ від загальної $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповіді. Його коефіцієнт ефективності, або посилення, оцінюється як відношення частки загального Ca^{2+} сигналу ($\Delta F/F_0$), в тому числі відповідних компонент CICR, до Ca^{2+} сигналу, що виникає у відповідь на прямий вхід Ca^{2+} через P2X рецептори (11%), і становить $\sim 3,3$.

Активація P2X рецепторів не тільки обумовлює прямий вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, але також викликає деполяризацію мембрани міоцитів, активацію L-VGCCs і, як результат, катіонний струм в клітину. Це задіює другий Ca^{2+} сигнальний шлях, який розпочинається входом Ca^{2+} через L-VGCCs. Хоча прямий вхід Ca^{2+} через L-VGCCs робить відносно невеликий внесок ($\sim 8\%$) у загальну внутрішньоклітинну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь, але цей шлях набагато ефективніший у запуску вивільнення Ca^{2+} із СР: загальний внесок VGCC – опосередкованого входу Ca^{2+} і індуковане, як слідство, вивільнення Ca^{2+} із СР у загальну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь, викликану активацією P2X рецепторів була виділена як нікардіпін - нечутлива фракція $\alpha\beta$ -меАТФ - індукованого Ca^{2+} сигналу ($\Delta F/F_0$), і становить $\sim 64\%$. Нікардипін – нечутлива фракція відповіді відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори плюс індуковане цим входом вивільнення Ca^{2+} із СР і складає $\sim 36\%$ від загальної Ca^{2+} відповіді. Таким чином, Ca^{2+} сигнал, що ініціюється VGCC-опосередкованим входом Ca^{2+} , підсилюється CICR у ~ 8 разів (для порівняння - ~ 3.3 рази для P2X-опосередкованого входу Ca^{2+}). Суттєва відмінність в ефективності цих двох Ca^{2+} сигнальних шляхів дозволяє припустити, що вони можуть активувати різні механізми вивільнення Ca^{2+} із СР. У той час як обидва механізми вивільнення Ca^{2+} повинні бути Ca^{2+} -залежні, вони також повинні, принаймні частково,

«розрізняти» іони Ca^{2+} , що потрапляють в клітину різними шляхами - або через P2X рецептори, або через L-VGCCs.

Результати даної дисертаційної роботи показують значне ослаблення збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у відповідь на стимуляцію P2X рецепторів після блокування IP_3Rs або RyRs , як на гладеньком'язових кільцевих смужках мезентеріальної артерії морської свинки, так і на ізольованих ГМК мезентеріальної артерії морської свинки і артеріях нирок щурів. Це ослаблення не може бути пов'язане з неспецифічною дією блокаторів ні на активність SERCA, ні на L-VGCCs плазматичної мембрани, що наводить на думку, що обидва типи рецепторів - RyRs і IP_3Rs беруть участь у пуринергічній регуляції кровообігу. У досліджуваних ГМК мезентеріальної артерії і артеріях нирок депо поєднані і навідь можуть обмінюватися іонами Ca^{2+} , тобто є спільним для обох процесів вивільнення Ca^{2+} - PCR та CICR [12, 225].

Порівняння результатів досліджень дії блокаторів RyRs та IP_3Rs на $\alpha\beta$ -меАТФ -індуковане ізометричне фазне скорочення гладеньком'язових кільцевих смужок мезентеріальної артерії морської свинки в присутності і відсутності антагоніста L-VGCCs нікардіпіну допомогло виявити особливості залучення іонів Ca^{2+} , що проникають через різні канали поверхневої мембрани, до вивільнення Ca^{2+} через RyRs і IP_3Rs саркоплазматичного ретикулуму. Якщо RyRs та IP_3Rs однаково досяжні для іонів кальцію, що входять в клітину через P2X рецептор або L-VGCCs, то обмеження входу Ca^{2+} через один з цих шляхів призводило би до однакового зменшення CICR без зміни відносного внеску кожного з рецепторів в загальне скорочення. Результати наших досліджень, що підсумовані на діаграммі (рис.3.21), показують, що це не так.

Після обмеження входу Ca^{2+} через L-VGCCs, на 29 % збільшується відносний внесок RyRs в скорочення, що викликане активацією P2X рецепторів. Це може означати, що активація вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних запасників іонами Ca^{2+} , які надходять через L-

VGCCs, опосередковується переважно через IP_3Rs . При блокуванні цих каналів внесок IP_3Rs зменшується настільки, що більш вагомим стає вивільнення Ca^{2+} через $RyRs$.

Таким чином, отримані результати показують, що іони Ca^{2+} , які входять через L-VGCCs більш ефективно взаємодіють з IP_3Rs , ніж з $RyRs$. Структурним підґрунтям для кращої досяжності IP_3Rs іонами кальцію, які входять через L-VGCCs могла би бути просторова колокалізація цих каналів в мембрані і IP_3Rs CP під мембраною. Модель такої колокалізації була раніше запропонована для клубочкових клітин нирки [226].

На ізольованих ГМК мезентеріальної артерії морської свинки і артеріях нирок щурів також було показано, що відносний внесок IP_3Rs у вивільнення Ca^{2+} із CP був набагато більшим, ніж внесок $RyRs$, однак було не відомо чи залучаються при $\alpha\beta$ -меАТФ стимуляції судинних міоцитів будь-які метаботропні рецептори пов'язані $G_{q/11}/PLC/IP_3$ сигнальним шляхом [195]. Хоча активація $PLC-\beta$ G_q -білками збільшується при активації іонотропних P2X рецепторів, пряма активація $PLC-\beta$ кальцієм також невідома [183, 227]. Інгібування L-VGCCs призвело до істотного зниження IP_3R -внеску в $\alpha\beta$ -меАТФ індукований $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнт. Безумовно, тетракаїн/ріанодин-чутлива фракція (основний внесок якого IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} , зменшується після блоку L-VGCCs більше ніж в 4 рази, у той же час 2-АРВ-чутлива фракція (яка виникає в основному через RyR -опосередковане вивільнення Ca^{2+}) зменшується тільки на 10%. Треба відзначити проте, що фракція $\alpha\beta$ -меАТФ -індукованої відповіді Fluo-3 сигналу, яка залишається в присутності нікардипіну була подібна до залишкової фракції після блоку IP_3Rs в присутності 2-АРВ.

Це свідчить про те, що :

1 - хоча прямий вхід Ca^{2+} безпосередньо через L-VGCCs робить порівняно невеликий внесок у $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану відповідь, але значно підсилюється IP_3R -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} і

2 - активація L-VGCCs – не єдиний механізм який пов'язує активацію P2X рецепторів з IP₃R- опосередкованим вивільненням Ca²⁺.

Зважаючи на те, що активація P2X рецепторів не пов'язана з механізмом активації фосфоліпази C (PLC), базальний рівень [IP₃]_i, який продукується спонтанною активністю PLC [183, 195, 198, 199] може відгравати ключову роль в активації IP₃R-опосередкованого вивільнення Ca²⁺ яке запускається потенціалзалежним входом Ca²⁺ в клітину. Отриманні нами результати показують (рис. 3.22), що інгібування PLC призводить до значного зменшення $\alpha\beta$ -меАТФ -індукованої амплітуди відповіді.

Таким чином можна зробити висновок, що IP₃R-опосередковане вивільнення Ca²⁺, викликане активацією P2X рецепторів, залежить від активності PLC.

Зважаючи на те, що активація P2X рецепторів не пов'язана з механізмом активації фосфоліпази C (PLC), базальний рівень [IP₃]_i, який продукується спонтанною активністю PLC [183, 195, 198, 199] може відгравати ключову роль в активації IP₃R-опосередкованого вивільнення Ca²⁺ яке запускається потенціалзалежним входом Ca²⁺ в клітину.

Цей факт говорить про значну залежність IP₃R-опосередкованого вивільнення іонів Ca²⁺ від активності PLC. Показано, що блокатор PLC пригнічує приблизно таку ж частку кальцієвого сигналу, викликаного аплікацією $\alpha\beta$ -меАТФ, як і нікардипін, блокатор L-VGCCs, так і 2-АРВ, блокатор IP₃Rs. Наведені данні вказують на те, що IP₃-опосередковане вивільнення Ca²⁺ є результатом активації L-VGCCs і утворення IP₃ через PLC-залежний сигнальний шлях.

Зважаючи на вищевикладене, отримані нами дані піднімають питання про джерело IP₃, що залучається в Ca²⁺ сигналізацію, викликану активацією іонотропних P2X рецепторів. Одним із джерел може бути

постійно існуючий базальний рівень IP_3 в цитоплазмі в результаті спонтанної фонові активності PLC [183, 198, 199]. Через дифузійні обмеження, фон $[IP_3]_i$ у вузьких проміжках між мембраною і jSR [27, 228] може бути істотно вище, ніж в об'ємі цитозоля. IP_3 активує IP_3Rs в основному через зниження їх чутливості до інгибуючої дії підвищення $[Ca^{2+}]_i$, не змінюючи властивостей активації [108, 229]. Важливою властивістю IP_3Rs є те, що їх активація і пригнічення регулюється внутрішньоклітинною концентрацією Ca^{2+} .

По суті, IP_3Rs є Ca^{2+} -активованим Ca^{2+} каналом, а IP_3 активує рецептори, головним чином, через зменшення їх чутливості до пригнічення іонами Ca^{2+} не змінюючи при цьому властивості активації [108, 229]. При цих умовах IP_3Rs можуть працювати як CICR – канали, навіть без одночасного підвищення $[IP_3]_i$, особливо в присутності інших чинників, що збільшують чутливість IP_3Rs до Ca^{2+} . Одним з цих чинників може бути АТФ, який, як відомо, присутній в клітині в фізіологічній концентрації та слугує для збільшення чутливості IP_3Rs до Ca^{2+} [108]. Також було показано, що IP_3 та АТФ можуть діяти як аллостеричні регулятори, які підлаштовують чутливість, відповідно, пригнічення і активації рецептора до внутрішньоклітинного кальцію [108]. Іншими чинниками, як відомо, можуть бути Ca^{2+} -зв'язучі білки [230], кальмодулін [231], і ще ціла низка модуляторних протеїнів, які забезпечують внутрішньоклітинну кальцієву сигналізацію [108, 201].

Таким чином, базальний рівень IP_3 у цитоплазмі разом із можливими модуляторами IP_3Rs можуть відтворювати достатні умови для активації IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} , що викликається входом Ca^{2+} через P2X рецептори та L-VGCCs. Така метаботропна дія L-VGCCs може пояснити і механізм залучення вивільнення Ca^{2+} в пуринергічну сигналізацію в артеріальних ГМК, які були досліджувані в цій , і роботі значно більш ефективне підсилення кальцієвої сигналізації внаслідок активації L-VGCCs, ніж при залученні RyR. Згідно отриманим даним,

RyR первинно активуються переважно іонами Ca^{2+} , які входять в клітину через канали P2X рецепторів. Про це свідчить незначне зниження внеску активації RyR в генерацію кальцієвого сигналу при блокуванні L-VGCCs.

Крім того, запропоновані вище механізми участі IP_3R в пуринергічній регуляції кровообігу не повинні розрізняти іони Ca^{2+} , які входять через P2X рецептори або L-VGCCs. Тем не менше, описані в роботі експерименти з нікардіпіном свідчать, що інгібування L-VGCCs впливає на внесок IP_3Rs у пуринергічну Ca^{2+} сигналізацію значно більше, ніж внесок RyRs. Тобто, якщо IP_3Rs однаково доступні для входу Ca^{2+} в клітину або через P2X рецептори, або через L-VGCCs, то блокування одного з цих шляхів входу Ca^{2+} не повинно змінювати відносний внесок RyR-опосередкованої і IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} у загальний внутрішньоклітинний Ca^{2+} сигнал. Отримані результати показують, що це не так. Дійсно, після блокування L-VGCCs, відносний внесок IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} у $\alpha\beta$ -меАТФ -індуковану $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь (який був домінуючий в умовах без нікардіпіну) став менше, ніж внесок RyR-опосередкованого вивільнення Ca^{2+} . Це спостереження наводить на думку, що активація IP_3Rs пов'язана з активацією L-VGCCs.

Ця гіпотеза додатково підтримується спостереженням, що нікардіпін, блокатор L-VGCCs, інгібує приблизно таку ж частку від $\alpha\beta$ -меАТФ -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповіді як і 2-АРВ, блокатор IP_3Rs (рис. 3.24). Зважаючи на те, що 2-АРВ не впливає на механізми входу Ca^{2+} (рис. 3.11 і рис. 3.12) результати цих дослідів дозволяють припустити, що вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs залежить головним чином від активації L-VGCCs. Принаймні, два механізми узгоджуються із участю IP_3 в пуринергічній сигналізації, яку ми спостерігаємо.

Нещодавно групою іспанських вчених було показано, що активація L-VGCCs може запускати G білок/PLC/ IP_3 шлях. Здатність активації L-VGCCs, що викликала деполаризацією мембрани чи агоністом, до активації G білок-опосередкованого IP_3 синтезу і, як слідство, вивільнення

Ca^{2+} через IP_3Rs була продемонстрована на різних судинних ГМК. Цей механізм називають канал-кальцій викликане вивільнення кальцію (CCICR) (огляд в [85]). Якщо такі метаботропні властивості L - типу VGCCs мають місце в артеріальних міоцитах, які були досліджені в цій роботі, то це може пояснити як механізм участі IP_3 в пуринергічній сигналізації, так і набагато ефективніше підсилення Ca^{2+} сигналізації через L-VGCCs ніж через P2X рецептори .

Тем не менш, це не пояснює залишкову чутливість блокатору IP_3Rs , 2 – APB, у $\alpha\beta$ -меАТФ - індуквані $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповіді, яка зберігається при подальшому блокуванні L-VGCCs нікардіпіном (рис. 3.18). Це, однак, можна легко пояснити з точки зору спонтанної фонової активності PLC, яка слугує для підтримки рівня $[\text{IP}_3]_i$, достатнього для активації IP_3Rs при потенціал залежному вході Ca^{2+} в клітину. Зважаючи на вищевикладене зрозуміло, що jSR (який знаходиться в межах 12-15нм плазмалемми), розміщений вище плазмалеммальних мікродоменів, і проміжний, крихітний об'єм цитозоля формують синаптичні комплекси, які слугують для Ca^{2+} "буферним бар'єром", через який Ca^{2+} може рухатись безпосередньо між позаклітинною рідиною і jSR [27, 228].

Це може полегшити:

1 - локальне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в jSR;

2 - накопичення молекул, в тому числі Ca^{2+} , Na^+ [27, 228] і IP_3

в цитозольному мікрообсязі від якого дифузія в об'єм цитоплазми помітно обмежена [27].

Беручи це до уваги наступні фактори можуть сприяти активації IP_3Rs , що була викликана входом Ca^{2+} :

1 - стійке збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в "junctional" цитозольному мікрообсязі [27, 228];

2 - спонтанна базальна активність PLC [232, 183, 198, 199];

- 3 - Ca^{2+} активація типу 1 IP_3Rs з перехресною взаємодією [108];
- 4 - регулювання IP_3Rs [Ca^{2+}] в просвіті CP [233];
- 5 - IP_3R кластеризація [184].

Предомінантна експресія IP_3Rs в jSR може не тільки сприяти залученню IP_3 в пурінергічну сигналізацію, але також дозволить обґрунтувати IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} як головну причину збільшення [Ca^{2+}]_i при активації $\text{P}2\text{X}$ рецепторів. Імунодетекція RyRs і IP_3Rs типу 1 в ГМК мезентеріальної артерії з виявленням відповідних забарвлених ділянок CP і ядра (рис. 3.29) показала, що IP_3Rs переважно експресуються в суб-плазмалеммальних елементах jSR , в той час як RyR в основному розташовані в центральних глибоких елементах CP в навколо ядерних областях міоцитів. Ця структурна особливість робить IP_3Rs більш доступними для входу Ca^{2+} в клітину через плазматичну мембрану. Хоча ко-локалізація L-VGCCs і IP_3Rs не показана напряму в цьому дослідженні за допомогою імуноцитохімії або електронної мікроскопії, суб-плазмалеммальне розташування IP_3Rs пропонує їх як початкову мішень для входу Ca^{2+} в клітину, в той час як RyRs в глибоких елементах CP можуть бути активовані в подальшій фазі вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs , забезпечуючи тим самим подальше підсилення IP_3R -опосередкованого Ca^{2+} сигналу. Особливість розподілу IP_3Rs сприяє $\text{VGCC-IP}_3\text{R}$ зв'язку, який може полегшувати накопичення молекул, включаючи Ca^{2+} [120, 199] та IP_3 , в мікрооб'ємі цитозолу між jSR та мікродоменами плазмолемми з якого дифузія в об'єм цитоплазми помітно обмежена [199].

Подібне накопичення полегшує взаємодію IP_3 з експресованими там IP_3Rs . В той же час взаємодія іонів Ca^{2+} , які увійшли в мікрооб'єм, з віддаленими локусами розташування RyRs виявляються суттєво обмежені через «екранування» процесу дифузії примембранним CP [27]. Обмеженість участі іонів Ca^{2+} , які увійшли через L-VGCCs , в активації RyRs , мабуть, не розповсюджується на масоване вивільнення

Ca^{2+} через IP_3Rs , яке опосередковане метаботропним аспектом функціонування L-VGCCs. Внесок IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} в активацію RyRs можна оцінити відповідно до величини 2-APВ-чутливого компонента інтегрального кальцієвого сигналу. Цей компонент, на відміну від тетракаїнстійкого компонента, окрім внеску IP_3R -опосередкованого вивільнення поєднує в себе «додаток» за рахунок активації RyRs іонами Ca^{2+} , які вивільнилися через IP_3Rs . Такий «додаток» складає 26 % і може слугувати мірою перехресної активації IP_3Rs і RyRs. Подібна взаємодія двох механізмів вивільнення Ca^{2+} була описана і для інших типів ГМК [234, 235].

Таким чином, результати цієї роботи показали, що підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при активації P2X рецепторів відбувається внаслідок сумісного внеску декількох взаємопов'язаних процесів. З одної сторони, це вхід іонів з позаклітинного простору через P2X рецептори і викликане цим входом RyR –опосередкованим вивільненням Ca^{2+} із СР за рахунок механізму CICR. З іншого боку, це активація L-VGCC в результаті деполяризації, яка була викликана неселективним катіонним струмом через активовані P2X рецептори. Завдяки наявності метаботропної функції у L-VGCC, вони здатні через $G_{q/11}/\text{PLC}/\text{IP}_3$ сигнальний шлях суттєво активізувати IP_3R –опосередковане вивільнення Ca^{2+} із СР. Подібне IP_3R –опосередковане вивільнення Ca^{2+} із СР при активації P2X рецепторів забезпечує найбільш вагомий внесок в кальцієву сигналізацію, який в три рази перевершує внесок початкового вивільнення Ca^{2+} через RyRs.

Крім того, нещодавно було показано, що позаклітинний АТФ вибірково полегшує активацію L-VGCC і значно підсилює IP_3R –опосередковане вивільнення Ca^{2+} в артеріальних міоцитах [91]. Таким чином, IP_3Rs можуть слугувати як функціональний зв'язок ("проміжний підсилювач") між потенціал-залежним входом Ca^{2+} і RyR –опосередкованим вивільненням Ca^{2+} [25, 232].

Таким чином, результати цього дослідження показують, що в мезентеріальній артерії ГМК крім RyR-опосередкованого вивільнення Ca^{2+} , активація P2X рецепторів викликає швидке вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs , яке, виявляється, одним з основних джерел для збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і здебільшого залежить від активації дигідроперидін-чутливих L-VGCCs. Зважаючи на те, що IP_3R -опосередкована пуринергічна сигналізація чутлива до антагоністів Ca^{2+} каналів, отримані результати можуть мати особливе патофізіологічне і фармакологічне значення.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети досліджено мембранні та внутрішньоклітинні механізми змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію при активації P2X рецепторів артеріальних гладеньком'язових міоцитів.

За результатами поставлених в роботі задач зроблено такі висновки:

1. Активація P2X рецепторів ГМК мезентеріальної артерії морської свинки викликає паралельне залучення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які значно розрізняються за своїм внеском у загальну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідь, не зважаючи на те, що окремі внески трансмембранного входу Ca^{2+} через P2X рецептори та потенціалкеровані Ca^{2+} канали L-типу (L-VGCCs) є співставними.
2. Вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори. Таким чином, при активації P2X рецепторів, окрім входу Ca^{2+} через самі P2X рецептори, ГМК мезентеріальної артерії залучають більш ефективний механізм Ca^{2+} сигналізації, суттєвим компонентом якого є вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, що започатковується входом Ca^{2+} через L-VGCCs.

3. В контрольних умовах, коли в пуринаргічній сигналізації задіяні як P2X рецептори так і L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за участю IP₃R та RyR. При цьому, відносний внесок вивільнення Ca²⁺ через IP₃Rs у загальну [Ca²⁺]_i відповідь є більшим, ніж RyRs. IP₃R-опосередковане вивільнення Ca²⁺, залучене активацією P2X рецепторів, виявилось більш чутливим до блоку L-VGCCs, ніж RyR-опосередковане, що свідчить про його функціональний зв'язок з активацією L-VGCCs.
4. Дослідження $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей кільцевих деендотелізованих сегментів мезентеріальної артерії морської свинки підтвердили, що вивільнення Ca²⁺ через обидва типи рецепторів CP – IP₃Rs та RyRs – бере участь у генерації фазного ізометричного скорочення артеріальних ГМК. Блок L-VGCCs робить ці скоротливі відповіді менш чутливим до інгібіторів IP₃Rs ніж RyRs.
5. Імунофлуоресцентне забарвлення RyRs і IP₃Rs виявило, що IP₃Rs експресовані переважно у субплазмалемальних цистернах CP, в той час як RyRs розміщені переважно у центральних навколо-ядерних елементах CP. Ця структурна особливість робить IP₃Rs більш доступними для Ca²⁺, який надходить у клітину через L-VGCCs. Таким чином, IP₃Rs можуть відігравати роль «проміжного підсилювача» між L-VGCCs та RyR-опосередкованим вивільненням Ca²⁺ із CP.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Burnstock G. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium / G. Burnstock, V. Ralevic // *Br. J. Plast. Surg.* – 1994. – Vol. 47. – P. 527–543.
2. Kreulen D.L. Properties of the venous and arterial innervation in the mesentery / D.L. Kreulen // *J. Smooth. Muscle. Res.* – 2003. – Vol. 39. – P. 269–279.
3. Zang W. Sympathetically evoked Ca^{2+} signaling in arterial smooth muscle / W. Zang, J. Zacharia, C.G. Lamont [et.al.] // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2006. – Vol. 27. – P. 1515–1525.
4. Ralevic V. P2X receptors in the cardiovascular system and their potential as therapeutic targets in disease. / V. Ralevic // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 22, N.7. – P. 851-865.
5. Benham C.D. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells from rabbit ear artery / C.D. Benham // *J. Physiol.* – 1989. – Vol. 419. – P. 689–701.
6. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – N 2. – P. 659 – 797.
7. Ralevic V. Purinergic transmission in blood vessels / V. Ralevic, W.R. Dunn // *Auton. Neurosci.* – 2015. – Vol. 191. – P. 48–66.
8. Khakh B.S. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits // B.S. Khakh, G. Burnstock, C. Kennedy [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2001. – Vol. 53. – P. 107–118.

9. Burnstock G. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease / G. Burnstock, V. Ralevic // *Pharmacol. Rev.* – 2014. – Vol. 66. – P. 102–192.
10. Fabiato A. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells / Fabiato A., Fabiato F. // *J. Physiol.* – 1975. – Vol. 249. – P. 469–495.
11. Dormanns K. Neurovascular coupling: a parallel implementation / K. Dormanns, R.G. Brown, T. David // *Frontiers in Computational Neuroscience.* – 2015. – Vol. 9. – Article 109.
12. Laporte R. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle / R. Laporte, A. Hui, I. Laher // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – Vol. 56. — P. 439–513.
13. Fameli N. Cytoplasmic nanojunctions between lysosomes and sarcoplasmic reticulum are required for specific calcium signaling / N. Fameli, O. A. Ogunbayo, C. van Breemen [et.al.] // *F1000Research.* – 2014. – Vol. 3. – P. 93–113.
14. Kamishima T. Regulation of cytosolic Ca^{2+} concentration by Ca^{2+} stores in single smooth muscle cells from rat cerebral arteries / T. Kamishima, J.G. McCarron // *J. Physiol.* – 1997. – Vol. 501. – P. 497–508.
15. Kohda M. Characterization of action potential-triggered $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in single smooth muscle cells of guinea-pig ileum / M. Kohda, S. Komori, T. Unno [et.al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122. – P. 477–486.

16. Bolton T.B. Confocal imaging of calcium release events in single smooth muscle cells / T.B. Bolton, D.V. Gordienko // *Acta. Physiol. Scan.* – 1998. – Vol. 164. – P. 567–575.
17. Shmigol A. Properties of voltage activated $[Ca^{2+}]$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus / A. Shmigol, D.A. Eisner, S. Wray // *J. Physiol.* – 1998. – Vol. 511. – P. 803–811.
18. Coussin F. Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in vascular myocytes. / F. Coussin, N. Macrez, J.L. Morel [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 9596–9603.
19. Bradley K.N. Ca^{2+} regulation in guinea-pig colonic smooth muscle: the role of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger and the sarcoplasmic reticulum / K.N. Bradley, E.R. Flynn, T.C. Muir [et.al.] // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 538. – P. 465–482.
20. Bradley K.N. The sarcoplasmic reticulum and sarcolemma together form a passive Ca^{2+} trap in colonic smooth muscle / K. N. Bradley, J.W. Craig, T.C. Muir [et.al.] // *Cell Calcium.* – 2004. – Vol. 36. – P. 29–41.
21. Gordienko D.V. Regulation of muscarinic cationic current in myocytes from guinea-pig ileum by intracellular Ca^{2+} release: a central role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors / D.V. Gordienko, A.V. Zholos // *Cell Calcium.* – 2004. – Vol. 36. – P. 367–386.
22. Moore E.D. Organization of Ca^{2+} release units in excitable smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder / E.D. Moore, T. Voigt, Y.M. Kobayashi [et.al.] // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87. – P. 1836–1847.

23. Morimura K. Two-step Ca^{2+} intracellular release underlies excitation-contraction coupling in mouse urinary bladder myocytes / K. Morimura, Y. Ohi, H. Yamamura [et.al.] // *Am. J. Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P. 388–403.
24. Hotta S. Methyl-*b*-cyclodextrin prevents Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of mouse urinary bladder / S. Hotta, H. Yamamura, S. Ohya [et.al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. – Vol. 103. – P. 121–126.
25. Gordienko D.V. Sub-plasmalemmal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upstroke in myocytes of the guinea-pig small intestine evoked by muscarinic stimulation: IP3R-mediated Ca^{2+} release induced by voltage-gated Ca^{2+} entry / D.V. Gordienko, M.I. Harhun, M.V. Kustov [et.al.] // *Cell Calcium.* – 2008. – Vol. 43. – P. 122–141.
26. Berridge M.J. Elementary and global aspects of calcium signaling / M.J. Berridge // *J. Physiol.* – 1997. – Vol. 499. – P. 291–306.
27. Poburko D. Ca^{2+} signaling in smooth muscle: TRPC₆, NCX and LNats in nanodomains / D. Poburko, N. Fameli, K.H. Kuo [et.al.] // *Channels.* – 2008. – Vol. 2. – P. 10–12.
28. Poburko D. Organellar junctions promote targeted Ca^{2+} signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one / D. Poburko, K.H. Kuo, J. Dai [et.al.] // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2004. – Vol. 25. – P. 8–15.
29. Gitterman D.P. Nerve evoked P2X receptor contractions of rat mesenteric arteries; dependence on vessel size and lack of role of L-type calcium channels and calcium induced calcium release P2X neurogenic

- contractions in arteries / D. P. Gitterman, R. J. Evans // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 132. – P. 1201–1208.
30. Gurkovskaya A.V. Ionic mechanism of the excitatory action of ATP on vascular smooth muscles (Russian) / A.V. Gurkovskaya, N.I. Gokina // *Fiziol. Zh.* – 1987. – Vol. 33. – P. 45–51.
31. Fill M. Ryanodine receptor calcium release channels / M. Fill, J.A. Copello // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 893–922.
32. Burnstock G. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems / G. Burnstock, G.E. Knight // *Int. Rev. Cytol.* – 2004. – Vol. 240. — P. 31–304.
33. Gitterman D.P. Properties of P2X and P2Y receptors are dependent on artery diameter in the rat mesenteric bed / D.P. Gitterman, R.J. Evans // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 131. – P. 1561–1568.
34. Lemoine D. Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition / D. Lemoine, R. Jiang, A. Taly *Chem. Rev.* – 2012. – Vol. 112. – P. 6285–6318.
35. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors / R.A. North // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol 82. – N. 4. – P. 1013–1067.
36. Torres G.E. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners / G.E. Torres, T.M. Egan, M.M. Voigt // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 6653–6659.
37. Stoop R. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C / R.

- Stoop, S. Thomas, F. Rassendren [et.al.] // *Mol. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 56. – P. 973–981.
- 38.Coddou C. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels / C. Coddou, Z. Yan, T.Obsil [et.al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – Vol. 63. – P. 641–683.
- 39.Brake A.J. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor / A.J. Brake, M.J. Wagenbach, D. Julius // *Nature.* – 1994. – Vol. 371. – P. 519–523.
- 40.Valera S. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP / S. Valera, N. Hussy, R.J. Evans [et.al.] // *Nature.* – 1994. – Vol. 371. – P. 516–519.
- 41.Newbolt A. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor) / A. Newbolt, R. Stoop, C. Virginio [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 15177–15182.
- 42.Torres G. PEPping up your HIV defenses / Torres G // *GMHC Treat. Issues.* – 1998. – Vol. 12. – N. 5. – P. 8–9.
- 43.Rettinger J. Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor / J. Rettinger, I.A. Aschraf, G. Schmalzing // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 33542–33547.
- 44.Kaczmarek-Hajek K. Molecular and functional properties of P2X receptors –recent progress and persisting challenges / K. Kaczmarek-Hajek, E. Lorinczi, R. Hausmann [et.al.] // *Purinergic Signal.* – 2012. – Vol. 8. – P. 375–417.

- 45.Chataigneau T. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors
Frontiers in Cellular / T. Chataigneau, D. Lemoine, T. Grutter // Neurosci.
– 2013. – Vol. 7. – P. 1–12.
- 46.Dunn P.M. P2X receptors in peripheral neurons / P.M. Dunn, Y. Zhong,
G. Burnstock // Prog. Neurobiol. – 2001. – Vol. 65. – P. 107–134.
- 47.Ennion S. The role of positively charged amino acids in ATP recognition
by human P2X1 receptors / S. Ennion, S. Hagan, R.J. Evans // J. Biol.
Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 29361–29367.
- 48.Jiang L.H. Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7
receptors / L.H. Jiang, A.B. MacKenzie, R.A. North [et.al.] // Mol.
Pharmacol. – 2000. – Vol. 58. – P. 82–88.
- 49.Buell G. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia
and brain / G. Buell, C. Lewis, G.Collo [et.al.] // EMBO J. – 1996. – Vol.
15. – P. 55–62.
- 50.Garcia-Guzman M. Molecular characterization and pharmacological
properties of the human P2X3 purinoceptor / M. Garcia-Guzman, W.
Stuhmer, F. Soto // Brain Res. – 1997. – Vol. 47. – P. 59–66.
- 51.Clarke C.E. Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor
removes extracellular pH sensitivity / C.E. Clarke, C.D. Benham, A.
Bridges [et.al.] // J. Physiol. – 2000. Vol. 523. – P. 697–703.
- 52.Evans R.J. Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors / R.J.
Evans // Eur. Biophys. J. – 2009. – Vol. 38. – P. 319–327.

53. Jiang R. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors / R. Jiang, A. Taly, T. Grutter // *Trends Biochem. Sci.* – 2013. – Vol. 38. – P. 20–29.
54. Benham C.D. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle / C.D. Benham, R.W. Tsien // *Nature.* – 1987. – Vol. 328. – P. 275–278.
55. Evans R.J. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells / R.J. Evans, C. Lewis, C. Virginio [et.al.] // *J. Physiol.* – 1996. – Vol. 497. – P. 413–422.
56. Ruppelt A. Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor / A. Ruppelt, W. Ma, K. Borchardt [et.al.] // *J. Neurochem.* – 2001. – Vol. 77. – P. 1256–1265.
57. Vial C. P2X1 receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries / C. Vial, R. J. Evans // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62. – № 6. – P. 1438–1445.
58. Bo X. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor / X. Bo, L. H. Jiang, H. L. Wilson [et.al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1407–1416.
59. Egan T.M. Biophysics of P2X receptors / T.M. Egan, D.S. Samways, Z. Li // *Pflugers Arch.* – 2006. – Vol. 452. – P. 501–512.
60. Krishtal O. The agonists for nociceptors are ubiquitous, but the modulators are specific: P2X receptors in the sensory neurons are

- modulated by cannabinoids / O. Krishtal, N. Lozovaya, A. Fedorenko [et.al.] // *Pflugers Arch.* — 2006. — Vol. 453. — N. 3. — P. 353–360.
- 61.Li C. Enhancement of ATP-activated current by protons in dorsal root ganglion neurons / C. Li, R. W. Peoples, F. F. Weight // *Pflugers Arch.* — 1997. — Vol. 433. — N. 4. — P. 446 – 454.
- 62.Wirkner K. Regulation of the pH sensitivity of human P2X receptors by N-linked glycosylation / K. Wirkner, D. Stanchev, D. Milius. [et.al.] // *J. Neurochem.* — 2008. — Vol. 107, N. 5. — P. 1216–1224.
- 63.Khmyz V. P2X3 receptor gating near normal body temperature / V. Khmyz, O. Maximyuk, V. Teslenko [et.al.] // *Pflugers Arch.* — 2008. — Vol. 456. — N. 2. — P. 339–347.
- 64.Ramme D. Identification of the neuroeffector transmitter in jejunal branches of the rabbit mesenteric artery / D. Ramme, J.T. Regenold, K. Starke [et.al.] // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* — 1987. — Vol. 336. — N.3. — P. 267–273
- 65.Evans R.J. Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP./ R.J. Evans, A. Surprenant // *Br. J. Pharmacol.* — 1992. — Vol. 106. — N. 2, — P.242– 249.
- 66.Boarder M.P. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors/ M.P. Boarder, S.M.O. Hourani // *Tr. Pharmacol. Sci.* — 1998. — Vol. 19. — P. 99–107.

67. Lewis C.J. Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries / C.J. Lewis, R.J. Evans // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 2000. – Vol. 81. – P. 69–74.
68. Lewis C.J. Lack of run-down of smooth muscle P2X receptor currents recorded with the amphotericin permeabilized patch technique, physiological and pharmacological characterization of the properties of mesenteric artery P2X receptor ion channels / C.J. Lewis, R.J. Evans // *Brit. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 131. – P. 1659–1666.
69. Mulryan K. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors / K. Mulryan, D.P. Gitterman, C.J. Lewis [et.al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 403. – P. 86–89.
70. Костюк П.Г. Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології / П.Г. Костюк, О.П. Костюк, О.О. Лук'янець; НАН України, Ін-т фізіології ім. О. О. Богомольця. – К.: Наук. Думка. – 2005. – 197 с. – Бібліогр.: с. 195.
71. Lui Z. Decoding of synaptic voltage waveforms by specific classes of recombinant high-threshold Ca^{2+} channels / Z. Lui, J. Ren, T. H. J. Murphy // *Physiol.* – 2003. – Vol. 553. – N. Pt 2. – P. 473–488.
72. Scroggs R.S. Multiple Ca^{2+} currents elicited by action potential waveforms in acutely isolated adult rat dorsal ganglion neurons / R.S. Scroggs, A.P. Fox // *J. Neurosci.* – 1992. – Vol. 12. – N. 5. – P. 1789–1801.
73. Ganitkevich V. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder /

- V.Ganitkevich, G. Isenberg // *J. Physiol.* – 1991. – Vol. 435. – P. 187–205.
- 74.Abd El-Rahman R.R. Identification of L- and T-type Ca^{2+} channels in rat cerebral arteries: role in myogenic tone development / R.R. Abd El-Rahman Harraz O.F., Brett S.E., // *Heart. Circ. Physiol.* – 2013. – Vol. 304. – N. 1. – P. H58 – H71.
- 75.Imaizumi Y. Mechanisms of NE-induced reduction of Ca^{2+} current in single smooth muscle cells from guinea pig vas deferens / Y. Imaizumi, M. Takeda, K. Muraki [et.al.] // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260. – P. C17–C25.
- 76.Catterall W.A. Structure and function of voltage-sensitive ion channel / W.A. Catterall // *Science.* — 1988. — Vol. 242. — P. 50–60.
- 77.Lacinová L. Voltage-dependent calcium channels / L. Lacinová // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2005. – Suppl. 1. P. 1-78.
- 78.Kisilevsky A.E. Presynaptic calcium channels: structure, regulators, and blockers / A.E. Kisilevsky, G.W. Zamponi // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 184. – P. 45–75.
- 79.Jan L.Y. A superfamily of ion channels / L.Y. Jan, Y.N. Jan // *Nature.* – 1990. – Vol. 345. – P. 672.
- 80.Talavera K. Aspartate residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type Ca^{2+} channel α_{1G} / K. Talavera, M. Staes, A. Janssens [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 45628–45635.

81. Iida K. Essential, Completely Conserved Glycine Residue in the Domain III S2–S3 Linker of Voltage-gated Calcium Channel Subunits in Yeast and Mammals / K. Iida, J. Teng, T. Tada [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – No. 35. – P. 25659–25667.
82. Catterall W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels / W.A. Catterall // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 493–531.
83. Iftinca M.C. Regulation of neuronal T-type calcium channels / M.C. Iftinca, G.W. Zamponi // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2009. – Vol. 30. – P. 32–40.
84. Marcantoni A. Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types / A. Marcantoni, V. Carabelli, V. Comunanza [et.al.] // *Acta Physiol. (Oxf)* – 2008. – Vol. 192. – P. 233–246.
85. Urena J. Metabotropic Ca^{2+} channel-induced calcium release in vascular smooth muscle / J. Urena, A. del Valle-Rodriguez, J. Lopez-Barneo // *Cell Calcium.* – 2007. – Vol. 42. – P. 513–520.
86. Mangel A.L. Contractions of cat small intestinal smooth muscle in calcium-free solution / A.L. Mangel, D.O. Nelson, J.A. Connor [et.al.] // *Nature.* – 1979. – Vol. 281. – P. 582–583.
87. Burt R.P. Phasic contractions of the rat portal vein depend on intracellular Ca^{2+} release stimulated by depolarization / R.P. Burt // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 284 – P. H1808–H1817.
88. Bozler E. Role of calcium in initiation of activity of smooth muscle / E. Bozler // *Am. J. Physiol.* – 1969. – Vol. 216. – P. 671–674.

89. Tufan H. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca^{2+} - free medium and the effects of levcromakalim / H. Tufan, B. Ayan-Polat, M. Tecder-Unal [et.al.] // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 72. – P. 1321–1329.
90. Kalsner S. Vasodilator action of calcium antagonists in coronary arteries in vitro / S. Kalsner // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. – Vol. 281. – P. 634–642.
91. Del Valle-Rodríguez A. Metabotropic Ca^{2+} channel-induced Ca^{2+} release and ATP-dependent facilitation of arterial myocyte contraction / A. Del Valle-Rodríguez, E. Calderon, M. Ruiz [et.al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 4316–4321.
92. Alvarez J. Measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin / J. Alvarez, M. Montero // *Cell Calcium.* – 2002. – Vol. 32. – P. 251–260.
93. Bassik M.C. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis / M.C. Bassik, L. Scorrano, S.A. Oakes [et.al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – N.5. – P. 1207-1216.
94. Verkhratsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. / A. Verkhratsky // *Physiol. Rev.* – 2005. – Vol. 85. – N. 1. – P.201–279.
95. Wilcox R.A. Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate induces calcium mobilization via the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in SH-SY5Y neuroblastoma cells / R.A. Wilcox, R.A. Challiss, C. Liu [et.al.] // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 44. – P. 810–817.

96. Nakade S. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca^{2+} flux in reconstituted lipid vesicles / S. Nakade, S.K. Rhee, H. Hamanaka [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 6735–6742.
97. Michikawa T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium signaling / T. Michikawa, A. Miyawaki, T. Furuichi [et.al.] // *Crit. Rev. Neurobiol.* – 1996. – Vol. 10. – P. 39–55.
98. Yoshida Y. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor / Y. Yoshida, S. Imai // *J Pharmacol.* – 1997. – Vol. 74. – P. 125–137.
99. Taylor C.W. Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels / C.W. Taylor // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1436. – P. 19–33.
100. Patel S. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors / S. Patel, S.K. Joseph, A.P. Thomas // *Cell Calcium.* – 1999. – Vol. 25. – P. 247–264.
101. Yule D.I. Subtype-specific regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: controlling calcium signals in time and space / D.I. Yule // *J. Gen. Physiol.* – 2001. – Vol. 117. – P. 431–434.
102. Jiang Q.X. Three dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 24 Å resolution / Q.X. Jiang, E.C. Thrower, D.W. Chester [et.al.] // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21. – P. 3575–3581.
103. Wilcox R.A. New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor / R.A. Wilcox, W.U. Primrose,

- S.R. Nahorski [et.al.] // Trends Pharmacol. Sci. – 1998. – Vol. 19. – P. 467–475.
104. Serysheva I.I. Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electron cryomicroscopy / I.I. Serysheva, D.J. Bare, S.J. Ludtke [et.al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 21319–21322.
105. Jan L.Y. Tracing the roots of ion channels / L.Y. Jan, Y.N. Jan // Cell. – 1992. – Vol. 69. – P. 715–718.
106. Shears S.B. Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation / S.B. Shears // Biochem. J. – 1989. – Vol. 260. – P. 313–324.
107. Shears S.B. The versatility of inositol phosphates as cellular signals / S.B. Shears // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1436. – P. 49–67.
108. Foskett K. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels / K. Foskett, C. White, K.-Ho Cheung [et.al.] // J. Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87. – P. 593–658.
109. Fujimoto T. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae / T.Fujimoto, S.Nakade, A. Miyawaki [et.al.] // J. Cell Biol. – 1992. – Vol. 119. – P. 1507–1513.
110. Fujimoto T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments / T. Fujimoto, A. Miyawaki, K Mikoshiba. // J. Cell. Sci. – 1995. – Vol. 108. – P. 7–15.
111. Marks A.R. Smooth muscle and brain inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are structurally and functionally similar / A.R. Marks, P. Tempst,

- C.C. Chadwick [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 20719–20722.
112. Zhang L. Inositolpolyphosphate binding sites and their likely role in calcium regulation in smooth muscle / L. Zhang, M.E. Bradley, I.L. Buxton // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 27. – P. 1231–1248.
113. Iino M. Calcium dependent inositol trisphosphate-induced calcium release in the guinea-pig taenia caeci / M. Iino // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – Vol.142. – P. 47–52.
114. Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci / M. Iino // *J. Gen. Physiol.* – 1989. – Vol. 94. – P. 363–383.
115. Iino M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} - release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci / M. Iino // *J. Gen. Physiol.* – 1990. – Vol. 95. – P. 1103–1122.
116. Iino M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release / M. Iino, M. Endo // *Nature. (Lond)* – 1992. – Vol. 360. – P. 76–78.
117. Hirose K. Allosteric regulation by cytoplasmic Ca^{2+} and IP_3 of the gating of IP_3 receptors in permeabilized guinea-pig vascular smooth muscle cells / K. Hirose, S. Kadowaki, M. Iino // *J. Physiol.* – 1998. – Vol. 506. – P. 407–414.
118. Benevolensky D. Micromolar calcium decreases affinity of inositol trisphosphate receptor in vascular smooth muscle / D. Benevolensky, I.I. Moraru, J. Watras // *Biochem. J.* – 1994. – Vol. 299. P. 631–636.

119. Hamada K. Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium / K. Hamada, T. Miyata, K. Mayanagi [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 21115–21118.
120. Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling / M.J. Berridge // *Nature.* – 1993. – Vol. 361. – P. 315–325.
121. Putney J.W. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells / J.W. Putney, Bird G.S. // *Endocr. Rev.* – 1993. – Vol. 14. – P. 610–631.
122. Otsu H. Immunogold localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP₃) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies / H. Otsu, A. Yamamoto, N. Maeda [et.al.] // *Cell Struct. Funct.* – 1990. – Vol. 15. – P. 163–173.
123. Ross C.A. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons / C.A. Ross, J. Meldolesi, T.A. Milner [et.al.] // *Nature.* – 1989. – Vol. 339. – P. 468–470.
124. Naraghi M. Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel / M. Naraghi, E. Neher // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17. – P. 6961–6973.
125. Neher E. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release / E. Neher // *Neuron.* – 1998. – Vol. 20. – P. 389–399.
126. Rios E. Calcium in close quarters: microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena / E. Rios, M.D. Stern // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1997. – Vol. 26. – P. 47–82.

127. Allbritton N.L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate / N.L. Allbritton, T. Meyer, L. Stryer // *Science*. – 1992. – Vol. 258. – P. 1812–1815.
128. Wojcikiewicz R.J. Differences among type I, II, and III inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in ligand-binding affinity influence the sensitivity of calcium stores to inositol-1,4,5-trisphosphate / R.J. Wojcikiewicz, S.G. Luo // *Mol. Pharmacol.* – 1998a. – Vol. 53. – P. 656–662.
129. Missiaen L. Luminal Ca^{2+} promoting spontaneous Ca^{2+} release from Inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes / L. Missiaen, C.W. Taylor, M.J. Berridge // *J. Physiol. (Lond.)* – 1992c. – Vol. 455. – P. 623–640.
130. Bootman M.D. The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca^{2+} spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor / M.D. Bootman, C.W. Taylor, M.J. Berridge // *J. Biol. Chem.* – 1992b. – Vol. 267. – P. 25113–25119.
131. Michelangeli F. Pharmacological modulators of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor / F. Michelangeli, M. Mezna, S. Tovey [et.al.] // *Neuropharmacol.* – 1995. – Vol. 34. – P. 1111–1122.
132. Bootman M.D. All-or-nothing Ca^{2+} mobilization from the intracellular stores of single histamine-stimulated HeLa cells / M.D. Bootman, M.J. Berridge, C.W. Taylor // *J. Physiol. (Lond)* – 1992a. – Vol. 450. P. 163–178.
133. Ferris C.D. Quantal calcium release by purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors / C.D. Ferris, A.M. Cameron, R.L. Huganir [et.al.] // *Nature. (Lond)* – 1992. – Vol. 356. – P. 350–352.

134. Hashimoto T. A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal smooth muscle / T. Hashimoto, M. Hirata, Y. Ito // *Br. J. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 86. – P. 191–199.
135. Twort C.H. Human airway smooth muscle in cell culture: control of the intracellular calcium store / C.H. Twort, C. van Breemen // *Pulm. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 2. – P. 45–53.
136. Bayguinov O. Intracellular calcium events activated by ATP in murine colonic myocytes / O. Bayguinov, B. Hagen, A.D. Bonev [et.al.] // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. C126–C135.
137. Boittin F.X. Ca^{2+} signals mediated by $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -gated channels in rat ureteric myocytes / F.X. Boittin, F. Coussin, J.L. Morel [et.al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 349. – P. 323–332.
138. Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function and contractile consequences in ureteric smooth muscles / T. Burdyga, S. Wray // *Novartis Found Symp.* – 2002. – Vol. 246. – P. 208–217.
139. McCarron J.G. Agonist-induced phasic and tonic responses in smooth muscle are mediated by IP_3 / J.G. McCarron, J.W. Craig, K.N. Bradley [et.al.] // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115. – P. 2207–2218.
140. Berridge M.J. Calcium—a life and death signal / M.J. Berridge, M.D. Bootman, P. Lipp // *Nature.* – 1998. – Vol. 395. – P. 645–648.
141. Clapham D.E. Calcium signaling / D.E. Clapham // *Cell.* – 1995. – Vol. 80. – P. 259–268.

142. Thomas A.P. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling / A.P. Thomas, G. Bird, G. Hajno'czyk [et.al.] // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10. – P. 1505–1517.
143. Bootman M.D. The organisation and functions of local Ca²⁺ signals / M.D. Bootman, P. Lipp, M.J. Berridge // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114. – P. 2213–2222.
144. Parker I. Elementary events of InsP₃-induced Ca²⁺ liberation in *Xenopus* oocytes: hot spots, puffs and blips / I. Parker, J. Choi, Y. Yao // *Cell Calcium.* – 1996. – Vol. 20. – P. 105–121.
145. Swillens S. From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. S. Swillens, G. Dupont, L. Combettes [et.al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 13750–13755.
146. Marchant J.S. Functional interactions in Ca²⁺ signaling over different time and distance scales / J.S. Marchant, I. Parker // *J. Gen. Physiol.* – 2000.- Vol. 116. – P. 691–696.
147. Bootman M.D. Subcellular Ca²⁺ signals underlying waves and graded responses in HeLa cells / M.D. Bootman, M.J. Berridge // *Curr. Biol.* – 1996. – Vol. 6. – P. 855–865.
148. Callamaras N. Activation and co-ordination of InsP₃-mediated elementary Ca²⁺ events during global Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes / N. Callamaras, J.S. Marchant, X.P. Sun [et.al.] // *J. Physiol.* – 1998.- Vol. 509. – P. 81–91.

149. Cheng H. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes / H. Cheng, M.R. Lederer, W.J. Lederer [et.al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1996.- Vol. 270. – P. C148–C159.
150. Dawson S.P. Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves / S.P. Dawson, J. Keizer, J.E. Pearson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 96. – P. 6060–6063.
151. Lechleiter J. Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes / J. Lechleiter, S. Girard, E. Peralta [et.al.] // *Science.* – 1991. – Vol. 252. – P. 123–126.
152. Stern M.D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle / M.D.Stern // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 63. – P. 497–517.
153. Kessler D.A. Fluctuation-induced diffusive instabilities / D.A. Kessler, H. Levine // *Nature.*- 1998. – Vol. 394. – P. 556–558.
154. Pessah I.N. Characterization of multiple $[^3H]$ ryanodine binding sites on the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action / I.N. Pessah, I. Zimanyi // *Mol. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 39. – P. 679–689.
155. Endo M. Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. / M. Endo, T. Kitazawa, S. Yagi [et.al.] // *In Excitation-contraction coupling in smooth muscle* // R. Casteels, T. Godfraind, & J.C. Rüegg, editors. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. – 1977. – P. 199–209.
156. Rousseau E. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel: activation by caffeine / E. Rousseau, G.Meissner // *Am. J. Physiol.* – 1989. – Vol. 256. – P. H328–H333.

157. Guerrero A. Caffeine activates a Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells / A. Guerrero, F.S. Fay, J.J. Singer // *J. Gen. Physiol.* – 1994. – Vol. 104. – P. 375–394.
158. Guerrero A. Simultaneous measurement of Ca^{2+} release and influx into smooth muscle cells in response to caffeine. A novel approach for calculating the fraction of current carried by calcium / A. Guerrero, J.J. Singer, F.S. Fay // *J. Gen. Physiol.* – 1994. – Vol. 104. – P. 395–422.
159. Zou H. Imaging Ca^{2+} entering the cytoplasm through a single opening of a plasma membrane cation channel / H. Zou, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft // *J. Gen. Physiol.* – 1999. – Vol. 114. – P. 575–588.
160. Iino M. Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig / M. Iino, T. Kobayashi, M. Endo // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1988. – Vol. 152. – P. 417–422.
161. Ganitkevich V.Ya. High cytoplasmic Ca^{2+} levels reached during Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in single smooth muscle cell as reported by a low affinity Ca^{2+} indicator Mag-Indo-1 / V. Ya. Ganitkevich, H. Hirche // *Cell Calcium.* – 1996. – Vol. 19. – P. 391–398.
162. Morel J.L. Specific Gq protein involvement in muscarinic M 3 receptor-induced phosphatidylinositol hydrolysis and Ca^{2+} release in mouse duodenal myocytes / J.L. Morel, N. Macrez, J. Mironneau // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 121. – P. 453–458.
163. Sutko J.L. The pharmacology of ryanodine and related compounds / J.L. Sutko, J.A. Airey, W. Welch [et.al.] // *Pharmacol. Rev.* – 1997. – Vol. 49. – P. 53–98.

164. Rossi D. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} -release channels / D. Rossi, V. Sorrentino // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 32. – P. 307–319.
165. Guerrero-Hernández A. Ryanodine receptors in smooth muscle / A. Guerrero-Hernandez, L. Gomez-Viquez, G. Guerrero-Serna [et.al.] // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. D1676–D1688.
166. Sanders K.M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles / K.M. Sanders // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – Vol. 91. – P. 1438–1449.
167. Gollasch M. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} signals in cerebral arteries: Ca^{2+} sparks as elementary physiological events / M. Gollasch, G.C. Wellman, H.J. Knot [et.al.] // *Circ. Res.* – 1998. – Vol. 83. – P. 1104–1114.
168. Mironneau J. Contribution of ryanodine receptor subtype 3 to Ca^{2+} responses in Ca^{2+} -overloaded cultured rat portal vein myocytes / J. Mironneau, F. Coussin, L.H. Jeyakumar [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 11257–11264.
169. Lohn M. Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells / M. Lohn, W. Jessner, M. Furstenau [et.al.] // *Cir. Res.* – 2001. – Vol. 89. – P. 1051–1057.
170. Yamazawa T. Subtype specificity of the ryanodine receptor for Ca^{2+} signal amplification in excitation-contraction coupling / T. Yamazawa, H. Takeshima, T. Sakurai [et.al.] // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15. – P. 6172–6177.
171. Takeshima H. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor / H. Takeshima, S. Nishimura, T. Matsumoto [et.al.] // *Nature*. – 1989. – Vol. 339. – P. 439–445.

172. Dreja K. Rat arterial smooth muscle devoid of ryanodine receptor function: effects on cellular Ca^{2+} handling / K. Dreja, I. Nordstrom, P. Hellstrand // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 132. – P. 1957–1966.
173. Welch W. Structural components of ryanodine responsible for modulation of sarcoplasmic reticulum calcium channel function / W. Welch, A.J. Williams, A. Tinker [et.al.] // *Biochem.* – 1997. – Vol. 36. – P. 2939–2950.
174. Wagenknecht T. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors / T. Wagenknecht, M. Samsó // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. d1464–d1474.
175. Lesh R.E. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle / R.E. Lesh, G.F. Nixon, S. Fleischer [et.al.] // *Circ. Res.* – 1998. – Vol. 82. – P. 175–185.
176. Bolton T.B. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells / T.B. Bolton, Y. Imaizumi // *Cell Calcium.* – 1996. – Vol. 20. – P. 141–152.
177. Benham C.D. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit / C.D. Benham, T.B. Bolton // *J. Physiol.* – 1986. – Vol. 381. – P. 385–406.
178. ZhuGe R. Spontaneous outward transient currents arise from microdomains where BK channels are exposed to a mean Ca^{2+} concentration on the order of 10 μM during a Ca^{2+} spark / R. ZhuGe, K.E. Fogarty, R.A. Tuft // *J. Gen. Physiol.* – 2002. – Vol. 120. – P. 15–27.

179. Cheng H. Calcium sparks: elementary events underlying excitation – contraction coupling in heart muscle / Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – P. 740–744.
180. Nelson M.T. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks / M.T. Nelson, H. Cheng, M. Rubart [et.al.] // *Sci*. – 1995. – Vol. 270. – P. 633–637.
181. Wier W.G. α_1 -adrenergic signalling mechanisms in contraction of resistance arteries / W.G. Wier, K. Morgan // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 150. – P. 91–139.
182. Wellman G.C. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca^{2+} -sensitive ion channels / G.C. Wellman, M.T. Nelson // *Cell Calcium*. – 2003. – Vol. 34. – P. 211–229.
183. Horowitz L.F. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca^{2+} requirement, and regulation of M current / L.F. Horowitz, W. Hirdes, B.C. Suh [et.al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2005. – Vol. 126. – P. 243–262.
184. Rahman T. Dynamic regulation of IP₃ receptor clustering and activity by IP₃ / T. Rahman, C.W. Taylor // *Channels*. – 2009. – Vol. 3. – P. 226–232.
185. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. – 1986. – P. 48.
186. Gordienko D.V. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signalling / D.V. Gordienko, A.V. Zolos, T.B. Bolton // *J. Microsc.* – 1999. – Vol. 196. – P. 305–316.

187. Abeele F.V. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by Pannexin 1 / F.V. Abeele, G. Bidaux, D. Gordienko [et.al.] // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 174. – P. 535–546.
188. Mackrill J.J. Differential expression and regulation of ryanodine receptor and *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels in mammalian tissues and cell lines / J.J. Mackrill, R.A.J. Challiss, D.A. O'Connell [et.al.] // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 327. – P. 251–258.
189. Taylor C.W. Calcium and inositol trisphosphate receptors / C.W. Taylor, D. J. Traynor // *Mem. Biol.* – 1995. – Vol. 145. – P. 109–118.
190. Harhun M.I. Purinoreceptor-mediated current in myocytes from renal resistance arteries / M.I. Harhun, O.V. Povstyan, D.V. Gordienko / *Br. J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 160. – P. 987–997.
191. Suzuki M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump, reduces Ca^{2+} -dependent K^+ currents in guinea-pig smooth muscle cells / M. Suzuki, K. Muraki, Y. Imaizumi // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 107. – P. 134–140.
192. Garaliene V. Action of calcium antagonists and agonists on isolated human thoracic arteries used for coronary artery bypass grafting // V.Garaliene, V. Barsys, P. Jakuška [et.al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2012. – Vol. 64. – P. 733–738.
193. Pucovsky V. Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries / V. Pucovsky, R.F. Moss, T.B. Bolton // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552. – P. 119–133.

194. Cheranov S.Y. Sarcoplasmic reticulum calcium load regulates rat arterial smooth muscle calcium sparks and transient K(Ca) currents / S.Y. Cheranov, J. Jaggar // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 544. – P. 71 – 84.
195. Povstyan O.V. Ca^{2+} entry following P2X receptor activation induces IP_3 receptor mediated Ca^{2+} release in renal resistance artery myocytes / O.V. Povstyan, M.I. Harhun, D.V. Gordienko // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 162. – P. 1618–1638.
196. Bootman M.D. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release / Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L. [et.al.] // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1145–1150.
197. Lee Y.M. TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach / Y.M. Lee, B.J. Kim, H.J. Kim [et.al.] // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. P. G604–G616.
198. Peng Z. Increased expression and activity of phospholipase C in renal arterioles of young spontaneously hypertensive rats / Z. Peng, A. Dang, W.J. Arendshorst // *Am. J. Hypertens.* – 2007. – Vol. 20. – P. 38–43.
199. Prestwich S.A. Measurement of picomole amounts of any inositol phosphate isomer separable by h.p.l.c. by means of a bioluminescence assay / S.A. Prestwich, T.B. Bolton // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 274. – P. 663–672.
200. Smith R.J. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness / R.J. Smith, L.M. Sam, J.M. Justen [et.al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1990. – Vol. 253. – P. 688–697.

201. Choe C. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork / C. Choe, B.E. Ehrlich // *Sci. Signal.* – 2006. – V.363. – P. 15.
202. Гурковская А.В. Ионные механизмы возбуждающего действия АТФ на гладкие мышцы сосудов / А.В. Гурковская, Н.И. Гокина // *Физиологический журнал.* – Том 33. – 1987. – С. 45–51.
203. Gokina N.I. Effect of ATP and adenosine on spontaneous electrical and contractile activity of portal–vein smooth–muscle cells / N.I. Gokina, A.V. Gurkovskaya // *Bull. Exp. Biol. and Med.* – 1981. –Vol. 92. – N. 9. – P. 1141–1144.
204. Lamb G.D. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres / G.D. Lamb // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* – 2002. – Vol. 23. – N. 1. – P. 81–91.
205. Dulhunty A.F., Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium / A.F. Dulhunty // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2006. – Vol. 33. – P.763–772.
206. Wier W.G. Ca²⁺ release mechanisms, Ca²⁺ sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle / W.G. Wier, C.W. Balke // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85. – P. 770–776.
207. Soeller C. Analysing cardiac excitation-contraction coupling with mathematical models of local control / C. Soeller, M.B. Cannell // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 85. – P. 141–162.

208. Song L.S. Calcium biology of the transverse tubules in heart / L.S. Song, S. Guatimosim, L. Gomez-Viquez [et.al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 1047. – P. 99–111.
209. Somlyo A.V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle / A.V. Somlyo, A.P. Somlyo // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 1968. – Vol. 159. – P. 129–145.
210. Amberg G.C. Calcium sparklets regulate local and global calcium in murine arterial smooth muscle / G.C. Amberg, M.F. Navedo, M. Nieves-Cintrón [et.al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 579. – P. 187–201.
211. Wray S. Sarcoplasmic reticulum functions in smooth muscle / S. Wray, T. Burdyga // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90. – P. 113–178.
212. Lamont C. Different roles of ryanodine receptors and inositol (1,4,5)-trisphosphate receptors in adrenergically stimulated contractions of small arteries / C. Lamont, W.G. Wier // *Am. J. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 617–625.
213. Zhang W.M. ET-1 activates Ca^{2+} sparks in PASMC: local Ca^{2+} signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors / W.M. Zhang, K.P. Yip, M.J. Lin [et.al.] // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. L680–L690.
214. White C. Carbachol triggers RyR-dependent Ca^{2+} release via activation of IP_3 receptors in isolated rat gastric myocytes / C. White, J.G. McGeown // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 542. – P.725–733.
215. Kotlikoff M.I. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: the case for loose coupling / M.I. Kotlikoff // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 83. – P. 171–191.

216. Feldman G.J.M. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release through localized Ca^{2+} uncaging in smooth muscle / G. Ji, M. Feldman, R. Doran [et.al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2006. – Vol. 127. – P. 225–235.
217. Duchen M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology / M. R. Duchen // *Mol. Aspects. Med.* – 2004. – Vol. 4. – P. 365–451.
218. Carafoli E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen? / E. Carafoli // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1797 – P. 595–606.
219. Yamamoto H. Ca^{2+} compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells / H. Yamamoto, C. Van Breemen // *J. Gen. Physiol.* – 1986. – Vol. 87. – P. 369–389.
220. Santo-Domingo J. Calcium uptake mechanisms of mitochondria / J. Santo-Domingo, N. Demarex // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1797. – P. 907–912.
221. Contreras L. Mitochondria: The calcium connection / L. Contreras, I. Drago, E. Zampese // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1797. – P. 607–618.
222. Cali T. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of mitochondrial activities / Cali T., Ottolini D., Brini M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 942. – P. 53–73.
223. Griffiths E. J. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells Griffiths E. J., Rutter G. A. *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787. – N. 11. – P. 1324–1333.

224. Spät A. High-and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signaling / A. Spät, G. Szanda, G. Csordás [et. al.] // *Cell. Calcium.* – 2008. – Vol. 44. – N.1. – P. 51–63.
225. Itoh T. Differences and similarities in the noradrenaline- and caffeine-induced mechanical responses in the rabbit mesenteric arter / T. Itoh, H. Kuriyama, H. Suzuki // *J. Physiol. (Lond.)* – 1983. – Vol. 337. – P.609–629.
226. Spat A. Plasmalemmal dihydropyridine receptors modify the function of subplasmalemmal inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a hypothesis / A. Spat, T. Rohacs, L. Hunyady // *Cell. Calcium.* – 1994. – Vol. 15. – N. 5. – P. 431–437.
227. Fisher S.K. Muscarinic receptor regulation of cytoplasmic Ca^{2+} concentrations in human SK-N-SH neuroblastoma cells: Ca^{2+} requirements for phospholipase C activation / S.K. Fisher, L.M. Domask, R.M. Roland // *Mol. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 35. – P. 195–204.
228. Blaustein M.P. Organization of Ca^{2+} stores in vascular smooth muscle: functional implications // M.P. Blaustein, V.A. Golovina, H. Song [et.al.] // *Role of the Sarcoplasmic Reticulum in Smooth Muscle*: Eds. D.J. Chadwick, J.A. Goode, Novartis Foundation Symposium 246. – John Wiley & Sons Ltd., Sussex, UK. – 2002. – P. 125–137.
229. Berridge M.J. The versatility and universality of calcium signaling / M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 1. – P.11–21.
230. Yang J. Identification of a family of calcium sensors protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels / J. Yang, S. McBride,

- D-OD. Mak [et.al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 99. – P. 7711–7716.
231. Kasri N.N. Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor / N.N. Kasri, K. Torok, A. Galione [et. al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – N. 13. – P. 8332 – 8338.
232. Gordienko D.V. Crosstalk between ryanodine receptors and IP₃ receptors as a factor shaping spontaneous Ca²⁺-release events in rabbit portal vein myocytes / Gordienko D.V., Bolton TB. // J. Physiol. – 2002. – Vol. 542. – P. 743–762.
233. Rainbow R.D. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store arrangement in vascular smooth muscle / R.D. Rainbow, D. Macmillan, J.G. McCarron // Cell Calcium. – 2009. – Vol. 46. – P. 313–322.
234. Blatter L. A. Agonist-induced [Ca²⁺]_i waves and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mammalian vascular smooth muscle cells / L. A. Blatter, W. G Weir // Am. J. Physiol. – 1992. – Vol. 263. – P. 576–586.
235. Boittin F. X. Norepinephrine-induced Ca²⁺ waves depend on InsP₃ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes / F. X. Boittin, N. Macrez, G. Halet [et.al.] // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 277. – P. 139 – 151.