

РОЗДІЛ І. МОЛЕКУЛЯРНА ТА КЛІТИННА ФІЗІОЛОГІЯ

РОЛЬ ЛІПОКСИГЕНАЗНОГО ШЛЯХУ МЕТАБОЛІЗМУ АРАХІДОНОВОЇ КИСЛОТИ В РЕГУЛЯЦІЇ АПОПТОЗУ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ

І.М. Алексєєва, Г.М. Корнійчук, Н.В. Макогон, І.В. Лушнікова

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ

Останнім часом доведено, що метаболізм арахідонової кислоти (АК) за ліпоксигеназним шляхом є критичним процесом в регуляції виживання та апоптозу деяких ліній та пухлинних клітин. Однак участь продуктів ліпоксигеназ (ЛО) в регуляції апоптозу нетрансформованих клітин, зокрема гепатоцитів (Г), практично не вивчена. Мета цього дослідження - вивчити зміни життєздатності Г щурів у разі дії блокаторів ЛО нордигідрогуаяретової кислоти (НДГК) та кофейної кислоти (КК), а також екзогенних лейкотриєнів (ЛТ) В₄ та С₄. Виявлено, що НДГК та КК зменшують вихід цитозольного ферменту аланінамінотрансферази (АЛТ) з Г, що свідчить про зменшення некротичних процесів, та фазно змінюють мітохондріальне дихання культур, спочатку збільшуючи, а далі пригнічуючи його. Це дозволило припустити, що блокатори ЛО індукують апоптоз, що було під-

тверджено збільшенням кількості апоптичних Г: їх відсоток підвищувався порівняно з контролем у 3,6 раза при дії НДГК та у 2,5 раза при дії КК протягом 24 год. За допомогою електронно-мікроскопічних досліджень виявлено типові риси апоптозу, індукованого блокаторами: виражену конденсацію ядерного хроматину, зміну форми та фрагментацію ядер, утворення апоптичних тілець. Апоптичні зміни були більш вираженими за умов дії загального блокатора ЛО - НДГК, ніж за умов дії селективного блокатора 5-ЛО - КК. Екзогенні ЛТ, кінцеві продукти 5-ЛО, зменшували в 1,5 - 1,8 раза апоптоз Г, викликаний блокаторами. Отже, виявлено, що ліпоксигеназний шлях метаболізму АК відіграє значну роль у регуляції некрозу та апоптозу в гепатоцитах, що є суттєвим для підтримки гомеостазу печінки в нормі та важливим моментом у розвитку патологічних процесів у цьому органі.

МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ЧУТЛИВІСТЬ СКОРОЧУВАЛЬНОГО АПАРАТУ СУДИННИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ДО Ca²⁺

О.Я. Андрухов, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Оксид азоту (NO) є відомим дилататором, який відіграє важливу роль у регуляції судинного тонуусу. NO викликає розслаблення судинних гладеньких м'язів, і такий дилаторний ефект може реалізовуватися як через цГМФ-залежні, так і через цГМФ-незалежні механізми. Нещодавно нами було доведено, що оксид азоту також може безпосередньо впливати на скорочувальний апарат

гладеньких м'язів (ГМ), що призводить до зниження чутливості скорочувальних білків до Ca²⁺. У цій роботі ми досліджували участь сульфогідрильних груп скорочувального апарату ГМ у реалізації такого ефекту оксиду азоту. З цією метою вивчали вплив донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НН) на скорочувальну активність скінованих сапоніном препаратів ворітної вени щура за наяв-

ності відновлювача SH-груп дитіотрейтолу (ДТТ). Підвищення концентрації Ca^{2+} в перфузуючому розчині від 10^{-9} до 10^{-4} моль/л викликало ізометричне скорочення амплітудою 1,3-1,7 мН/мг. Як ДТТ, так і НН викликали дозозалежне розслаблення скінованих препаратів ворітної вени. Зменшення амплітуди скорочення становило $51,4 \pm 7,9 \%$ при 10^{-4} моль/л НН, та $44,1 \pm 4,8 \%$ при 10^{-9} моль/л ДТТ. Ці релаксуючі ефекти не були адитивними. Додавання до перфузату

НН (10^{-4} моль/л) на фоні дії 10^{-9} моль/л ДТТ викликало лише незначне розслаблення. Аналогічно, додавання до перфузату ДТТ (10^{-9} моль/л), на фоні дії НН (10^{-4} моль/л) теж викликало лише незначне розслаблення. Наведені результати свідчать про те, що ефекти НН та ДТТ реалізуються через один і той самий механізм. Ми вважаємо, що взаємодія NO з критичними сульфогідрильними групами скорочувального апарату ГМ призводить до зниження його чутливості до Ca^{2+} .

ЗАЛЕЖНІСТЬ ОБ'ЄМАКТИВОВАНОГО АНІОННОГО СТРУМУ В ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ ПРОСТАТИ ЛЮДИНИ ВІД ЗОВНІШНЬОКЛІТИННОГО pH

Ю.М. Вітко, Р.М. Лазаренко, ¹ Н.Х. Погорела, ² Н. Преварська,
² Р. Скрима, Я.М. Шуба

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України; ¹Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; ²Лабораторія клітинної фізіології університету Ліль¹, Франція

Відомо, що зовнішньоклітинний pH пухлинної тканини є суттєво нижчим порівняно з таким нормальної тканини. Ця характерна риса пухлин, використовується для розробки лікарських препаратів з вибірковою пухлинною дією. Знижений зовнішньоклітинний pH може також впливати на трансмембранні транспортні процеси ракових клітин, адже відомо, що функціонування практично всіх іонних каналів і активних транспортерів є pH-залежним. У цій роботі за допомогою методу "patch clamp" у конфігурації "ціла клітина" ми дослідили вплив зовнішньоклітинного pH на характеристики об'ємзалежного хлорного струму ($I_{\text{Cl,swell}}$) в епітеліальних клітинах карциноми простати людини – LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate). Цей струм активується при набуханні клітин, викликаному пониженням тоничності зовнішньоклітинного розчину, і відіграє певну роль у відновленні клітинного об'єму. Зміна pH зовнішньоклітинного гіпотонічного розчину, як в кислий (аж до pH 4), так і в

лужний (до pH 9) бік від його нормально-го значення (pH 7,2), призводила до двофазних змін $I_{\text{Cl,swell}}$. При закисленні струм спочатку короткочасно потенціювався (~50% при pH 4), а потім поступово зменшувався до стаціонарних значень, нижчих за контроль. Як потенціація, так і пригнічення супроводжувалися уповільненням кінетики інактивації струму при позитивних значеннях мембранних потенціалів. Дія лужного pH була протилежною – короткочасне пригнічення (~10% при pH 9) змінювалося довготривалою потенціацією і прискоренням кінетики інактивації. Короткочасні зміни амплітуди $I_{\text{Cl,swell}}$ описувалися кривою титрування з pK 5,8, а довгочасні – з pK 7,5. Наші результати свідчать про наявність двох молекулярних груп, титрування яких модулює роботу об'ємактивованого аніонного каналу в злоякісно перероджених клітинах простати.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS-99-01248.

ФАКТОР ПЕРЕНОСУ ЛЮДИНИ МОДУЛЮЄ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ TAENIA COLI МОРСЬКИХ СВИНОК

Т.Л. Давидовська, М.Ф. Шуба, І.Б. Філіпов, О.В. Цимбалюк, Н.В. Давидовська

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Фактор переносу (ФП) - це олігорибонуклеопептид з молекулярною масою 3 - 6 кДа. Ця субстанція продукується сенсibiliзованими лімфоцитами-хелперами специфічно чутливих донорів при наявності антигену. В досліджах використовували фактор переносу гіперчутливості сповільненого типу до антигенів золотистого стафілокока. За допомогою тензометричного методу в ізометричному режимі досліджували вплив ФП на скорочення - розслаблення гладеньком'язових препаратів taenia coli морських свинок. Встановлено, що ця субстанція дозозалежно збільшує амплітуду та тривалість поодиноких спонтанних скорочень, а також скорочення викликане деполаризацією плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин (ГМК). Причиною описаних змін може бути підсилення збуджувальної та пригнічення гальмівної синаптичної передачі в гладеньких м'язах. Серед типів гальмівної передачі можна диференціювати адренергічну, АТФ-, NO- і VIP-ергічну. Встановлено, що ця субстанція в нормальному розчині Кребса завжди викликає стійке потенціювання як фазної, так і

тонічної компонент ацетилхолініндукованого скорочення. Вивчення впливу ФП на скорочення гладеньких м'язів taenia coli на фоні дії АТФ (10 мкмоль/л) довело, що замість розслаблення АТФ викликає стійке скорочення. Аналогічний ефект спостерігався коли АТФ додавали на тонічному компоненті ацетилхолінівикликаного скорочення за наявності ФП. Всі ефекти ФП проявилися з певним латентним періодом, що свідчить про його метаботропну дію. Подальші експерименти показали, що ця субстанція дещо потенціює дію екзогенного NO (нітропрурид натрію, 10 мкмоль/л). Також було встановлено, що за наявності ФП дія норадреналіну (10 мкмоль/л) та ізопротеренолу (10 мкмоль/л) залишається незмінною, тобто внутрішньоклітинні процеси, котрі пов'язані з активацією α - і β -адренорецепторів, не модулюються даною субстанцією. Таким чином, отримані результати дозволяють нам припустити, що фактор переносу, що є природною субстанцією, спроможний модифікувати гальмівну дію АТФ (розслаблення) на збуджувальну (скорочення) в ГМК taenia coli.

ДОСЛІДЖЕННЯ КАЛЬЦІЄВИХ ТРАНЗИЄНТІВ, ВИКЛИКАНИХ АЦЕТИЛХОЛІНОМ, У ІЗОЛЬОВАНИХ ХРОМАФІННИХ КЛІТИНАХ ЩУРА

О.Л. Заїка¹, О.М. Починюк²

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; ²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

Відомо, що секреція катехоламінів із хромафінних клітин щура викликається впливом ацетилхоліну (АХ), що виділяється із нервових закінчень, іннервуючих надниркову залозу. Останні дослідження показали, що хромафінні клітини експресують два типи АХ-рецепторів - іонотропні та метаботропні. Тому

дуже цікавими виявилися питання, чи змінюється під впливом АХ кальцієвий гомеостаз у хромафінних клітинах, оскільки відомо, що виділення катехоламінів є кальційзалежний процес. Інше питання полягало у тому, чи є різниця у відповідях хромафінних клітин при активації метаботропних чи

іонотропних рецепторів? Тому за допомогою флуоресцентного методу вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію із використанням кальційчутливого зонда FURA-2M нами було проведено аналіз відповідей, отриманих при аплікації АХ на ізольовані хромафінні клітини щура. Отримані дані показали наявність двох чітко виражених типів відповідей хромафінних клітин на таку стимуляцію. Кальцієві транзйенти першого типу, що були викликані аплікацією АХ, мали швидку кінетику наростання і спаду, та при повторній аплікації АХ не відбувалося значного зменшення їх амплітуди у часі. Транзйенти другого типу мали значно повільнішу кінетику наростання та спаду, і при повторній стимуляції клітини АХ спостерігалось значне зменшення їх амплітуди (до 50%), що, однак, відновлювалась до початкового значення після деполяризації клітини 50 ммоль/л

KCl. Ми припустили, що ці два типи відповідей пов'язані із представництвом іонотропних (перший тип) та метаботропних (другий тип) рецепторів, які можуть мати різне співвідношення в різних підтипах хромафінних клітин. Дослідження Ca^{2+} транзйентів за наявності 20 нмоль/л тапсигаргіну (ТГ), блокатора Ca^{2+} АТФази ендоплазматичного ретикулума показали, що після аплікації ТГ в клітинах із транзйентами першого типу не спостерігалось значної зміни амплітуди відповідей на АХ. В клітинах другого типу спостерігалось значне зменшення амплітуди кальцієвих транзйентів (до 90%), причому після деполяризації клітини 50 ммоль/л KCl не відбувалося відновлення їх амплітуди. Останнє може свідчити про домінуючу роль ендоплазматичного ретикулума в період підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , опосередкованого активацією метаботропних АХ-рецепторів.

УЧАСТЬ α_7 -ВМІСНИХ НІКОТИНОВИХ ХОЛІНОРЕЦЕПТОРІВ У СИНАПТИЧНІЙ ПЕРЕДАЧІ НИЖНЬОГО БРИЖОВОГО ГАНГЛІЯ МОРСЬКОЇ СВИНКИ

О.М. Коваль Л.П. Войтенко

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Нейрональні нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) поділяють на дві групи за їх здатністю зв'язувати чи не зв'язувати α -бунгаротоксин (α -Бт). α_7 -вмісні холінорецептори, які мають здатність зв'язувати α -Бт, виявлені в ЦНС та деяких симпатичних гангліях ссавців, але їх фізіологічна роль вивчена недостатньо. Тому мета цієї роботи полягала у визначенні наявності та участі α_7 -вмісних холінорецепторів в синаптичній передачі нижнього брижового ганглія (НБГ) морської свинки. Дослідження проведено на 15 ізольованих препаратах НБГ морських свинок різної статі масою близько 200 г. Імуногістохімічну обробку проводили за допомогою методу імунопероксидазного забарвлення з використанням поліклональних афінно очищених антитіл (Ат), специфічних до α_7 -субодиниці nAChR. Електрофізіологічні дослідження проведено з використанням стандар-

тної методики внутрішньоклітинного відведення потенціалів. Під час мікроскопічного дослідження препаратів НБГ виявлено дві основні групи клітин: великі та малі гінгліонарні клітини розмірами 48-60 та 6-18 мк відповідно. За допомогою методу імунохімічного забарвлення доведено, що імунохімічні мітки до α_7 -субодиниць містяться, як правило на сомах малих гінгліонарних клітин та/або їх відростках. При наявності МЛА-специфічного блокатора α_7 -субодиниці в інкубуючому розчині при імунохімічному забарвленні антитільної мітки на препараті виявлено не було. Проведена серія електрофізіологічних експериментів із застосуванням блокаторів, специфічних до α_7 -nAChR субодиниці, зокрема МЛА в концентрації 10 нмоль/л, ерабутоксин (Ерт) – 10 нмоль/л та моноклональні антитіла (мАт), специфічні до α_7 -субодиниці, в розведенні 1 : 50. Синаптичні відповіді клітин –

збуджувальні постсинаптичні потенціали (ЗПСП) отримували подразнюючи прегангліонарний нерв, а саме міжбрижовий тракт. Перфузія розчинів МЛА, Ерт, мАт викликала збільшення амплітуди ЗПСП на $32 \pm 4,8$, $31,8 \pm 5,1$, $32 \% \pm 4,5 \%$ відповідно, на тлі гіперполяризації клітинної мембрани на $4,6 \pm 1,3$, $26 \pm 4,5$ та $26 \% \pm 4,2 \%$ відповідно. Результати доводять наявність та участь α_7 -вмісних холінорецепторів у синаптичній передачі в НБГ морської свинки, а також дозволяють припустити, що малі гангліонарні

клітини можливо відіграють роль гальмівних інтернейронів. Ацетилхолін, виділяючись із прегангліонарних терміналей, активує нАХР малих гангліонарних клітин та опосередковує виділення деякого гальмівного передавача (дофамін, ГАМК). Блокування цих рецепторів призводить до послаблення інгібуючої дії і, як результат, до мембранної гіперполяризації та підвищення амплітуди ЗПСП великих гангліонарних клітин НБГ морської свинки. Подібний механізм детально вивчено та описано в ЦНС (Alcondon M, 1999).

ВИВЧЕННЯ РОЛІ СФІНГОМІЄЛІНОВОГО СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ АКТИВАЦІЇ АПОПТОЗУ В ТКАНИНІ НИРОК

І.О. Комаревцева, О.А. Орлова, В.М. Комаревцев, Є.А. Благодаренко

Луганський медичний університет

Одним із вторинних внутрішньоклітинних посередників передачі апоптозного сигналу в клітину є сфінгозин (продукт розпаду сфінгомієліну мембран клітин). Установлено, що підвищення його концентрації в клітині призводить до фрагментації ДНК і запуску процесів апоптозу. Мета роботи - встановити вміст сфінгозину в нирковій тканині щурів у кореляції з показниками фрагментації ДНК при різноманітних експериментальних моделях апоптозу. I модель: гіпертрофія єдиної нирки після односторонньої нефректомії. II модель: формування ішемічної ГНН за допомогою хірургічного методу. Кількісний вміст сфінгозину визначали фотометричним методом Лаутера і Трамса на спектрофотометрі СФ-4А при $\lambda = 415$ нм. Виділення ДНК із гомогенату тканини проводилося за методи-

кою Messmer і Вгу у нашій модифікації. Кількісне визначення фрагментованої ДНК проводилося спектрофотометрично при $\lambda = 540$ нм. При I моделі у щурів підвищувався вміст сфінгозину майже в 2 рази порівняно з контролем у єдиній нирці на 7-му і 14-ту добу. Відсотковий вміст фрагментованої ДНК у тканині нирок збільшився в ті самі терміни експерименту. При II моделі ми виявили підвищений вміст сфінгозину порівняно з контролем на 2-гу добу після формування ішемічної ГНН. На 3-тю добу спостерігалось зниження значення цього показника. Динаміка вмісту фрагментованої ДНК у нирковій тканині була аналогічною. Це вказує на розвиток апоптозу при обох моделях та на участь у тригерних механізмах його розвитку в нирковій тканині сфінгомієлінового сигнального шляху.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА АЛЮМИНИЯ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ НЕЙРОФИЛАМЕНТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Ж.А. Корякина, А.А. Тихомиров

Днепропетровский национальный университет

Возможность морфофункциональных изменений в нервных клетках во многом определя-

ется состоянием их цитоскелетных структур. В нейронах промежуточные филаменты пред-

ставлены триплетом белков нейрофиламентов (НФ), которые являются относительно стабильными компонентами цитоскелета, достаточно устойчивыми к различным влияниям. Однако длительные воздействия некоторых нейротоксических факторов могут индуцировать изменения полипептидного спектра белков, составляющих НФ, что приводит к структурным и функциональным изменениям фибрилл. Ранее было показано, что ионы Al^{3+} влияют на физико-химические свойства НФ интактных клеток нейробластомы и мозга млекопитающих и способствуют формированию клубков фибриллярного аппарата в перикарионе нейронов. Для изучения влияния $AlCl_3$ на полипептидный состав и количественное содержание белков НФ половозрелые крысы линии Вистар (по 8 крыс в группе) получали 0,2%-й раствор $AlCl_3$ с питьевой водой в течение 21 сут в свободном режиме. Методом иммуноблоттинга было показано изменение стехиометрии субъединиц 210, 170 и 70 кДа во всех исследуемых отделах головного мозга экспериментальных

животных (большие полушария, мозжечок, ствол). Причем при действии $AlCl_3$ к самым существенным изменениям была склонна тяжелая субъединица НФ. Результаты иммуноэлектрофореза показали возрастание количества белков НФ в данных условиях. Следует отметить, что продемонстрированные изменения коррелировали с повышением уровней Al в мозге третируемых крыс. Полученные данные подтверждают возможность реконструкции нейронального цитоскелета при влиянии ионов Al^{3+} . Молекулярный механизм действия Al^{3+} находится на стадии интенсивного изучения. Предполагается, что в присутствии ионов Al^{3+} может изменяться баланс процессов фосфорилирования - дефосфорилирования и протеолитической деградации белков НФ - важнейших регуляторных механизмов метаболизма этих компонентов цитоскелета. Очевидно, что НФ вовлекаются в протекание компенсаторно-приспособительных процессов, сопровождающих ответ нейронов на воздействие стресс-факторов окружающей среды.

МИТОХОНДРІЇ ЯК ВАЖЛИВИЙ ЕЛЕМЕНТ СИГНАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ НЕРВОВОЇ КЛІТИНИ

П.Г. Костюк

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Мітохондрії звичайно розглядаються як основне джерело енергії, що необхідна для забезпечення життєдіяльності клітини. Однак останні дослідження доводять, що вони є важливим компонентом сигнальної функції збудливих клітин завдяки здатності з великою швидкістю поглинати іони Ca^{2+} при збільшенні їх вмісту в цитозолі та поступово повертати їх назад у цитозоль. Вхід цих іонів у клітину через іонні канали плазмалеми при її деполяризації під час збудження є основою запуску процесу виділення хімічних медіаторів, необхідних для передачі сигналу через синаптичні з'єднання на наступні клітини. Проте значна частина з них негайно захоп-

люється мітохондріями за допомогою механізму уніпортерного переносу і повертається із значною затримкою. Тому мітохондрії є головним фактором у визначенні амплітудних та часових характеристик таких кальцієвих сигналів у клітині і відповідно характеристик її трансинаптичної дії. Пряме дослідження особливостей цієї їх функції на прикладі первинних та вторинних сенсорних нейронів, що передають ноцицептивні сигнали, виявило у щурів наявність істотних її відмін, зумовлених щільністю та розташуванням мітохондрії у їх цитозолі, а також контактами з іншими цитозольними структурами (ендоплазматичним ретикуломом та ядром). Ха-

рактеристики пре- та постсинаптичних компонентів синаптичної передачі між указаними двома типами нейронів доводять чітку залежність від описаних відмін. Порушення такої Ca^{2+} -регулюючої функції мітохондрій у формі в основному затриманого виведення іонів у цитозоль, що настає при певних пато-

логічних станах, є істотним компонентом змін синаптичної передачі ноцицептивних сигналів, зумовлюючи виникнення гострих та хронічних больових синдромів.

Робота виконана за підтримки гранту INAS-99-01915.

ВПЛИВ K^+ ТА Na^+ НА НИРКОВИЙ ТРАНСПОРТ ІОНІВ

М.В. Кришталь, І.Ю. Бадьїн, Т.В. Кукоба

Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, Київ; Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ

У досліджах на білих щурах-самцях за умов гіпергідратації вивчали вплив калію та натрію на ниркову фільтрацію, реабсорбцію, секрецію та екскрецію іонів калію, натрію, хлору та фосфату. З цією метою тваринам за 1 год до водного навантаження внутрішньошлунково вводили по 20 ммоль/кг натрію хлориду, калію хлориду, натрію або калію бікарбонату та по 10 ммоль/кг натрію або калію сукцинату. Результати досліджень показали, що при введенні солей натрію виникає гіпернатріємія і гіпокаліємія, а при введенні калієвих солей – гіперкаліємія та гіпонатріємія. В той самий час введення натрієвих солей збільшує фільтраційний заряд та екскрецію не лише натрію, але й калію. Це спостерігається і у разі введення солей калію. Цей феномен, який дозволяє швидко зменшити гіперосмію, але спричинює дізйонію, можна пояснити тим, що швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), яку визначали за кліренсом ендogenous креатиніну, значно збільшувалась у всіх серіях експериментів та суттєво не залежала від катіона, що вводився. Причому бікарбонати та сукцинати збільшували ШКФ значно сильніше, ніж хлориди. Проксимальна реабсорбція Na^+ не залежить від введеного катіона і в усіх

серіях дослідів була збільшена пропорційно фільтраційному заряду. Водночас дистальна реабсорбція Na^+ зменшувалась у разі введення калієвих солей, майже припинялась при навантаженні натрію сукцинатом і переходила в секрецію Na^+ при введенні NaHCO_3 та NaCl . Дистальна секреція K^+ , збільшуючись у всіх серіях, особливо значною була при введенні калієвих солей. У разі введення бікарбонатів і сукцинатів реабсорбція та екскреція Cl^- змінювались залежно від виду катіона. Солі натрію зменшували екскрецію Cl^- в 5-11 разів, а солі калію – збільшували в 5-7 разів. Екскреція фосфатів, навпаки, була більшою при введенні солей натрію. Це свідчить про те, що нирковий транспорт Cl^- пов'язаний з K^+ , а фосфатів – з Na^+ . Як відомо, значна частина Cl^- реабсорбується електронейтрально за допомогою K^+ - Cl^- -котранспортної системи, рушійною силою якої є градієнт концентрацій K^+ . Гіперкаліємія, зменшуючи цей градієнт, знижує реабсорбцію Cl^- , а гіпокаліємія – навпаки. Проте екскреція Cl^- з сечею однаково значно збільшується після введення NaCl та KCl , що свідчить про наявність механізмів селективного транспорту Cl^- , не пов'язаних з K^+ - Cl^- -котранспортною системою, та про їх специфічну регуляцію.

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ МЕХАНІЗМИ СТЕРОЇДОГЕНЕЗУ В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНИХ КЛІТИНАХ

О.О. Лук'янець

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Стероїдні гормони, що синтезуються у надниркових залозах - глюкокортикоїди та мінералокортикоїди відіграють дуже важливу роль у підтриманні карбогідратного метаболізму, реакціях на стрес та запалення, а також у регуляції сольового балансу. Загальною рисою всіх стероїдних гормонів є те, що їх синтез починається з одного попередника - холестеролу. Численні біохімічні, імуноцитохімічні та генетичні експерименти довели, що ферменти, які беруть участь у стероїдогенезі, локалізовані у таких різних внутрішньоклітинних структурах, як гладкий та гранулярний ретикулуми, пероксисоми, внутрішня мітохондріальна мембрана тощо. Однак питання яким чином холестерол та проміжні продукти постачаються у необхідній послідовності до місць переробки, що розташовані у різних структурах клітини, залишається не дослідженим. У наших експериментах використано метод електронної мікроскопії та морфометричного аналізу для встановлення морфологічних змін під час Ca^{2+} -індукованого стероїдогенезу у адренкортикальних клітин свавців. Для активації стероїдогенезу ми використовували деполяризацію мембрани під час якої Ca^{2+} входить у клітину через

потенціалзалежні кальцієві канали або кальцієвий іонофор A23187. Отримані результати довели, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у адренкортикальних клітинах із пучкової зони кори надниркової залози індукує значну активність ліпідних везикул, які, як відомо, містять холестерол. Виявилося, що за згаданих експериментальних умов ці везикули тісно взаємодіяли з різними внутрішньоклітинними структурами, що містять ферменти, котрі беруть участь у стероїдогенезі. Такими структурами виявилися мітохондрії, гладкий та гранулярний ендоплазматичні ретикулуми, пероксисоми, ядро та лізосоми. Крім того, везикули також могли взаємодіяти між собою або з кількома із згаданих структур одночасно. Цікаво, що ліпідні везикули формували при цьому ліпідні рафти у місцях контакту із органелою-партнером. Можна припустити, що ліпідні рафти являють собою спеціалізовані транспортні структури, що забезпечують перенесення масивних проміжних продуктів-молекул між органелами. Таким чином, наші експерименти довели, що ліпідні везикули відіграють не лише запасуючу, а також активну транспортну роль у процесі стероїдогенезу.

МОДУЛЯЦІЯ ФУНКЦІЙ ПОТЕНЦІАЛКЕРОВАНИХ НАТРІЄВИХ КАНАЛІВ НЕРВОВИХ КЛІТИН

І.С. Магура

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Модуляція синаптичної передачі й електричної збудливості відіграє визначну роль у механізмах навчання, пам'яті та фізіологічної регуляції. Особливу увагу привертає модуляція потенціалкерованих натрієвих каналів. Вони визначають поріг генерації потенціалу дії нервових клітин, що є головним у інтег-

ративній функції нейронів. Аналіз регуляції функції натрієвих каналів за допомогою біохімічних та молекулярно-біологічних методів призвів до встановлення ролі модулюючих впливів фосфорилування та дефосфорилування на різноманітні прояви активності натрієвих каналів. Установлено, що фосфори-

лювання натрієвих каналів головним чином забезпечують протеїнкінази А та С. Активація цих ферментів пов'язана з дією нейромедіаторів на відповідні метаболічні рецептори. Кальцінейрин та фосфатаза 2А являють собою найбільш ефективні фосфатази, що дефосфорилують α -субодиницю натрієвого каналу. За молекулярною будовою ідентифіковано 9 підтипів потенціалкеруваних натрієвих каналів $\text{Na}_v1,1$ - $\text{Na}_v1,9$. Модуляція властивостей натрієвих каналів відіграє важливу роль у механізмах розвитку нервової системи, в нейрозахисних реакціях за умов аноксії, в адаптації зорової системи хребетних тварин до

світла тощо. Модуляція функції натрієвих каналів відбувається при кокаїновій залежності і наступній дії припинення споживання кокаїну. Підвищення активності натрієвих каналів спостерігається під час гіпералгезії. Виявлена можливість впливів на натрієві канали β - γ -субодиниць G-білка. Показано модуляцію активності натрієвих каналів клітин нейробластоми людини IMR-32 при дії рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$, який викликає певні події в генетичному апараті клітини. Різні типи каналопатій натрієвих каналів, зокрема транскрипційна, відіграють значну роль в патогенезі порушень функції нервової системи.

МОДУЛЮЮЧА ДІЯ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ВТОРИННИХ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ ПОСЕРЕДНИКІВ НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ МІОМЕТРІЯ ВАГІТНИХ ЖІНОК

В.О. Орчаков, І.Б. Філіпов

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Тензометричні дослідження на ізольованих гладеньком'язових препаратах міометрія вагітних жінок, отриманих під час кесаревого розтину довели, що донор оксиду азоту нітропрусид натрію дозозалежно пригнічує частоту та амплітуду спонтанних поодиноких скорочень. Значення E_{50} знаходилось на межі $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л. У подальших експериментах використовувався нітропрусид натрію в субмаксимальній концентрації: 10 мкмоль/л. Для з'ясування участі гуанілатциклази в розслаблюючій дії NO було використано блокатори останньої: метиленовий голубий (10 мкмоль/л) та ODQ (10 мкмоль/л). Доведено, що блокування гуанілатциклази зменшувало амплітуду та частоту спонтанних скорочень на дію нітропрусиду натрію. Додавання до зовнішнього розчину мембранопроникної негідролізуючої форми цГМФ – 8-бром-цГМФ (1–100 мкмоль/л) істотно не впливало на амплітудно-частотну характеристику спон-

танних скорочень. Протилежний ефект було отримано при використанні мембранопроникного аналога цАМФ – 8-бром-цАМФ, який в концентрації 100 мкмоль/л повністю пригнічував скорочення гладеньких м'язів міометрія. Використання блокаторів протеїнкіназ А та Г (КТ 5720 і КТ 5823) показало більш вагомий внесок у розслаблення, викликане дією NO, першої. Слід зазначити, що блокування гуанілатциклази та протеїнкінази Г тільки збільшувало в середньому на 7–10 % тривалість поодиноких спонтанних скорочень за нормальних умов, що може свідчити про базальну активність цих ферментів. Таким чином, результати проведених нами досліджень, свідчать про те, що екзогенний NO пригнічує спонтанні скорочення гладеньких м'язів міометрія вагітних жінок, активуючи цГМФ-метаболический шлях, розслаблюючи останні через цАМФ і протеїнкіназу А.

ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСМЕМБРАННИХ КАЛЬЦІЄВИХ СТРУМІВ ТА РІВНЯ ЦИТОЗОЛЬНОГО КАЛЬЦІЮ В СЕНСОРНИХ НЕЙРОНАХ НА РАННІХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

В. Пінченко, В. Шишкін, О.П. Костюк

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Досліджувалися кальцієві струми (відображають трансмембранне надходження кальцію до клітини) та зміни цитозольного рівня кальцію (“кальцієві сигнали”) у дорсальних нейронах спінальних гангліїв (DRG) контрольних тварин та щурів зі стрептозотоцин-індукованим(СТЗ) цукровим діабетом. При дослідженні ганглії підрозподілялися на три групи: великого (пропріоцептивні), середнього та малого розмірів. Дослідження кальцієвих струмів проводились за допомогою методики “patch-clamp” в конфігурації “ціла клітина”, дослідження рівня кальцію в клітині за допомогою флуоресцентного зонда Індо 1/АМ. При дослідженні щільності кальцієвих струмів (рА/рF) було визначено суттєвий розкид її величин в усіх трьох групах DRG нейронів. Статистичної різниці для низькопорогових потенціалзалежних струмів (Т-струмів) не виявлено між відповідними підгрупами нейронів як у групі контрольних тварин, так і у групі тварин з СТЗ-індукованим діабетом (наприклад, для ноцицептивних нейронів 10,7 рА/рF у контрольних тварин та 9,2 рА/рF у тварин з СТЗ-індукованим діабетом, $P < 0,5$). При дослідженні високопорогових потенціалзалежних кальцієвих струмів (L, N, P/Q, R) при визначенні значень амплітуди струму стосов-

но ємності клітин у малих сенсорних нейронах відмічено зменшення щільності струму у малих сенсорних нейронах щурів з СТЗ-індукованим діабетом по відношенню до контрольних тварин (48,2 рА/рF при цукровому діабеті та 63,0 рА/рF у контрольних тварин, $P < 0,06$). Кальцієві сигнали характеризують розподілення кальцію між внутрішньоклітинними кальцієвими структурами та зміну кальцію у цитозолі клітини як такої. У тварин з цукровим діабетом та контрольних тварин визначено, що фаза спаду цих транзитів характеризується двофазною кривою. У ноцицептивних нейронах тварин з СТЗ-індукованим діабетом визначено уповільнення фази спаду кальцієвих транзентів. Змін між відповідними групами у значеннях амплітуди кальцієвого сигналу та швидкості його наростання у відповідь на деполяризацію не визначено. Таким чином, можна припустити, що цукровий діабет першого типу характеризується зменшенням щільності трансмембранних кальцієвих каналів у малих сенсорних нейронах на ранніх етапах розвитку захворювання. Можливо, що для цукрового діабету на цих стадіях розвитку характерно в першу чергу перерозподілення кальцію у цитозолі клітин за рахунок змін активності кальційакумулюючих та кальційвивідних структур.

ВПЛИВ ІОНІВ СВИНЦЮ НА СИНАПТИЧНІ ТА АЦЕТИЛХОЛІНОВІ ВІДПОВІДІ НЕЙРОНІВ ВЕРХНЬОГО ШИЙНОГО ГАНГЛІЯ ЩУРА

І.М. Ремізов, О.Е. Пурнинь, О.В. Рихальський

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

За допомогою методу внутрішньоклітинного відведення досліджено дію іонів свинцю на амплітуду збуджувальних постсинаптичних потенціалів (ЗПСП) нейронів верхнього ший-

ного ганглія (ВШГ) щура. Виявлено три групи нейронів ВШГ, що різняться за характером та чутливістю до дії іонів свинцю. До першої групи ввійшли 11 фазних нейронів,

що виявили високу чутливість до блокуючої дії іонів свинцю. Концентрація іонів свинцю, при якій спостерігалось половинне пригнічення амплітуди ЗПСП (IC_{50}), становили $(2,2 \text{ мкмоль/л} \pm 0,2 \text{ мкмоль/л})$. У чотирьох фазних нейронів (друга група) іони свинцю також блокували синаптичну передачу, але чутливість до них у нейронів цієї групи була значно нижчою, ніж у нейронів першої групи. Середнє значення IC_{50} становило $(35,5 \text{ мкмоль/л} \pm 2,9 \text{ мкмоль/л})$ ($n = 4$). У чотирьох тонічних нейронів ВШГ (третя група) іони свинцю потенціювали синаптичні відповіді. Так, іони свинцю в концентрації $2,0 \text{ мкмоль/л}$ викликали підвищення амплітуди ЗПСП на $27,0 \% \pm 2,0 \%$ ($n = 4$) від

контрольного значення. Різниця в характері та чутливості цих трьох груп нейронів ВШГ до дії іонів свинцю може бути пов'язана з різним субодичним складом їх нікотинових холінорецепторів. У іншій серії експериментів методом "patch-clamp" у конфігурації "ціла клітина" досліджували механізм блокуючої дії іонів свинцю на нейроні ВШГ. Установлено, що блокуюча активність іонів свинцю не змінюється у діапазоні значень мембранного потенціалу від $+10 \text{ мВ}$ до -90 мВ та зменшується зі збільшенням дози агоніста. Ці результати свідчать про конкурентний механізм блокування холінорецепторів нейронів ВШГ щура іонами свинцю.

ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІСТЬ РЕГУЛЯТОРНИХ ПЕПТИДІВ У МІЖКЛІТИННІЙ СИГНАЛІЗАЦІЇ

В.К. Рибальченко, Г.В. Островська, Т.В. Рибальченко, О. А. Кондратюк, А.Ф. Косенко, О.М. Гурняк, І.В. Белінська, І.В. Порало, Є.М. Решетнік, А.В. Бичко

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

З відкриттям пептидних регуляторів фізіологічних функцій (РП) розуміння механізмів взаємодії «ліганд - рецептор» значно ускладнилось. Чисельність і поліфункціональність РП стала підґрунтям гіпотези про організацію пептидами та іншими гуморальними регуляторами функціонального континууму, який характеризується специфічністю і вибірковістю дії. Стало зрозумілим, що РП можуть не лише «запускати» відповідну функцію клітини, а й змінювати її функціональну активність (модуляцію). Результати наших досліджень міжклітинної хімічної сигналізації на прикладах цілої низки РП з використанням біологічних і штучних мембран (Мб) дозволяють припускати щонайменше 11 нереперторних механізмів модуляції функціональної активності клітин. 1. Зміна фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару і утворення небішарових структур внаслідок інкорпорації молекули РП в матрикс Мб. 2. Аlostеричні зміни гормонзв'язувальних центрів ре-

цептора при взаємодії РП з його гідрофобним внутрішньомембранним акцепторним сайтом. 3. Регуляція активності мембранних білків-переносників. 4. Регуляція іонної проникності Мб в результаті прямої модифікації іонних каналів. 5. Зміни в іонній провідності Мб внаслідок утворення пептидліпідних каналів. 6. Безпосередня регуляція активності G-білків, що в свою чергу змінює активність систем вторинних месенджерів. 7. Модуляція синтезу вторинних месенджерів внаслідок прямої регуляції активності аденілат- і гуанілатциклаз і фосфоліпази С. 8. Утворення пептидних внутрішньоклітинних месенджерів внаслідок часткового протеолізу інкорпорованих у мембрану РП. 9. РП, адсорбовані на Мб є можливим субстратом для утворення тетинів і цитокінів. 10. Утворення на Мб нековалентних комплексів з іншими інформонами. Таким чином, розглядаючи поліфункціональність РП, поки що важко визначити вклад нереперторних механізмів у міжклітинні взає-

модії при наявності високоселективних рецепторів. Проте описані молекулярні механізми нерепторної дії РП забезпечують, на нашу думку, реалізацію їх ефектів на клітини, які не мають до них специфічних рецепторів. Ще більше значення цих механізмів для реалізації ефектів тих біорегуляторів, які є продуктами посттрансляційної модифікації РП,

мембранних рецепторів та інших білків (в тому числі ферментів і G - білків). Можливо, ці механізми є головними в реалізації дії нетипових для норми РП, синтез яких відбувається за умов стресу та патологій, коли різко змінюється міжклітинна сигналізація та синтез нових вторинних месенджерів, в тому числі і ліпідної природи.

ВЕГЕТАТИВНА НЕРВОВА СИСТЕМА: ЗНАХІДКИ ТА ГІПОТЕЗИ

В.І. Скок

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

Останнім часом у наших знаннях щодо вегетативної нервової системи сталися великі зрушення. По-перше, за допомогою імуногістохімічних і електрофізіологічних методів дослідження встановлено субодичний склад найбільш поширених у вегетативній нервовій системі холінорецепторів нікотинного типу (НХР), а також їх участь у "швидкій" міжнейронній синаптичній передачі. Зокрема з'ясовано, що у мозку найбільш поширеною і функціонально важливою комбінацією субодичних НХР є $\alpha_4\beta_2$, в той час як у вегетативних гангліях і плевках такою комбінацією є $\alpha_3\beta_4$. Водночас комбінації субодичних у різних гангліях і структурах мозку надзвичайно варіабельні, що відкриває велику перспективу щодо створення нових суперселективних ліків у медицині. По-друге, встановлено молекулярну будову місця зв'язу-

вання ацетилхоліну як передавача збудження, у якій головну роль, як виявилось, відіграють залишки полярних та незаряджених амінокислот. По-третє, з'ясовано розміри та молекулярну структуру, а також кінетику роботи іонних каналів НХР. Виявлено, що зв'язування блокувальних іонного каналу НХР відбувається у місці, де його діаметр дорівнює близько $12 \cdot 10^{-10}$ м. Виявлено дві групи НХР, з середньою тривалістю "залпа" відкривань іонного каналу 5,5 і 20,4 мс. Заміна лише двох амінокислотних залишків у сегменті M2 різко змінює кінетику роботи каналу і перетворює катіонний іонний канал на аніонний. По-четверте, встановлено, що, крім ацетилхоліну, функцію синаптичних передавачів у вегетативних гангліях виконують пептиди, зокрема речовина Р.

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ ВІДПОВІДІ ТКАНИН НА ТКАНИННОСПЕЦИФІЧНІ ІНГІБІТОРИ КЛІТИННОГО ПОДІЛУ В РАНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ

С.М. Смірнов, С.М. Федченко, В.Б. Захаров, С.Г. Мамонтов, К.Т. Захарова

Луганський медичний університет

Найбільш філогенетично древньою системою регуляції структурного гомеостазу, на думку багатьох дослідників, є втутрішньотканинна система контролю процесів клітинного поді-

лу тканинносцифічними інгібіторами (кейлонами), які діють за принципом негативного зворотного зв'язку. Проліферативна стратегія тканин в онтогенезі зазнає змін і зале-

жить від співвідношення процесів поділу і диференціровки клітин, що, вірогідно, пов'язано з особливостями регуляції процесів розподілу клітин. У зв'язку з цим, метою нашого дослідження було вивчення показників проліферації гепатоцитів щурів у віці від 3 до 7 діб. Оцінку параметрів проводили протягом доби. У тридобових тварин практично були відсутні ритми мітотичної активності (МА) та кількість клітин, що прямують до фази синтезу ДНК (PI). На цьому фоні введення печінкових кейлонів призводить до різкого зниження МА аж до 15-ї години дії препарату з подальшою гіперкомпенсаторною хвилею синхронного вступу гепатоцитів у мітоз. У результаті сумарна кількість клітин,

що поділилися за час дослідження, виявилася на 46,1% більше ніж у контрольній групі. Вплив кейлонів на PI у цій віковій групі обмежувався лише синхронізуючим ефектом. Розмір проліферативного пулу у піддослідних тварин був більшим на 340,1% відносно контрольних значень. До сьомої доби життя формуються чіткі добові ритми МА і PI. Спостерігається пригнічення кейлонами як мітотичної, так і ДНК-синтетичної активності, синхронізуючий ефект був менш вираженим. Розмір проліферативного пулу після введення кейлонів практично не змінювався. Таким чином, в характері впливу тканинноспецифічних інгібіторів на проліферативну стратегію відмічаються чіткі онтогенетичні особливості.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ГІПОКСІЇ НА КАЛЬЦІЄВИЙ ГОМЕОСТАЗ У СЕНСОРНИХ НЕЙРОНАХ ЩУРІВ

Р.І. Станіка, П.Г. Костюк, О.О. Лук'янець

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Гіпоксичний стан, викликаний ішемією, є основним чинником, що веде до нейрональної смерті при різних формах патології мозку. Однак внутрішньоклітинні механізми, безпосередньо відповідальні за згубну дію гіпоксії усе ще висвітлені недостатньо. Тому метою нашої роботи було дослідження впливу гіпоксії на кальцієвий гомеостаз нейронів. Експерименти проводилися на ізольованих нейронах гангліїв задніх корінців (DRG) щурів віком 1-2 міс. Внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) визначалася флуорометричним методом за допомогою кальційчутливого зонда Fura-2AM. Гіпоксія досягалася за допомогою витіснення кисню із зовнішньоклітинного розчину азотом. Парціальний тиск кисню (P_{O_2}) у розчині визначався полярографічним методом. Наші експерименти показали, що значення $[Ca^{2+}]_i$ у стані спокою було $175 \text{ нмоль/л} \pm 65 \text{ нмоль/л}$ у великих та $200 \text{ нмоль/л} \pm 24 \text{ нмоль/л}$ у малих нейронів. Стан гіпоксії ($P_{O_2} = 30 - 45 \text{ мм рт.ст.}$) у всіх досліджуваних нейронах

викликав зворотне підвищення $[Ca^{2+}]_i$, дещо більше у центрі клітини порівняно з периферією: 300 ± 27 та $270 \text{ нмоль/л} \pm 65 \text{ нмоль/л}$ у великих та 450 ± 55 та $400 \text{ нмоль/л} \pm 40 \text{ нмоль/л}$ у малих нейронах відповідно. Даний ефект практично зникав при заміні у зовнішньоклітинному розчині Ca^{2+} на Mg^{2+} . Для вивчення ролі $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмінника у ефекті збільшення $[Ca^{2+}]_i$, іони Na^+ замінювалися на Li^+ у зовнішньому розчині. Гіпоксія у цьому випадку викликала достовірно менше збільшення концентрації Ca^{2+} порівняно з контрольним зовнішнім розчином. Додавання 10 мкмоль/л ніфедипіну практично повністю виключало збільшення $[Ca^{2+}]_i$ викликане гіпоксією. Додавання у зовнішній розчин протонофору мітохондрій 10 мкмоль/л СССР дещо збільшувало базальний вміст Ca^{2+} у клітині, але за умов гіпоксії не спостерігалось його подальшого достовірного підвищення. Таким чином, отримані результати продемонстрували, що за умов гіпоксії в ізольованих DRG нейронах відбувається збільшення $[Ca^{2+}]_i$.

Можливо припустити існування декількох шляхів прояву цього ефекту. Можливий вхід Ca^{2+} із зовнішнього середовища за рахунок реверсії Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, у той час як майже не відсутня роль зміни активного транспорту іонів Ca^{2+} через мембрану. Дуже суттєвою виявилася роль L-типу кальцієвих ка-

налів у розвитку ефекту гіпоксії. Ще одним джерелом збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при гіпоксії може бути витік Ca^{2+} у цитозоль при порушеннях функції мітохондрій.

Робота частково підтримувалася грантом INTAS 99-1915.

РОЛЬ ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНИХ І КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ У ФОРМУВАННІ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ТА ТОНУСУ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ЗАГАЛЬНОЇ ЛЕГЕНЕВОЇ АРТЕРІЇ КРОЛЯ

В.С. Тележкін¹, Ю.Б. Дискіна²

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;

²Львівський національний університет ім.Івана Франка

Гладеньком'язові клітини (ГМК) переважної більшості кондуктивних судин, до яких відноситься і загальна легенева артерія кроля неспроможні до генерації потенціалів дії (ПД), оскільки в цьому їм перешкоджає великий вихідний потенціалзалежний струм. В перенесенні цього струму беруть участь чутливі до 4-амінопіридину (4-АР) потенціалзалежні калієві канали (K_V), та чутливі до карибдотоксину та тетраетиламонію (ТЕА) кальційзалежні калієві канали великої провідності (K_{Ca}), які також є потенціалзалежними. Метою даної роботи було з'ясувати роль та питомий внесок K_V - та K_{Ca} - каналів у регуляцію мембранного потенціалу (МП) та тонусу ГМК поперечних смужок загальної легеневої артерії кроля за допомогою методу сахарозного містка. Ендотелій заздалегідь руйнувався. Досліди проводилися при 37 °С. Адренергічні та холінергічні рецептори було заблоковано. За 100% приймали деполяризацію та скорочення, викликані гіперкалієвим розчином 60 ммоль/л. Сумісна аплікація 4-АР 5 ммоль/л та ТЕА 5 ммоль/л як правило викликала двофазну відповідь. Під час першої фази спостерігалось невелике за амплітудою збільшення деполяризації і тонусу, друга фаза розпочиналася раптовим підвищенням деполяризації з ПД на її фоні та збільшенням тонусу у вигляді зубчастого тетанусу, який інколи переходив

у гладенький. Для того, щоб дослідити дію кожної з речовин ми додавали їх послідовно. Таким чином, при аплікації ТЕА 5 ммоль/л виникала деполяризація (26,6 % \pm 2,17 %, n=19) та відбувалося підвищення тонусу (65,5 % \pm 7,25 %, n=11), а додавання до розчину 4-АР 5 ммоль/л майже миттєво призводило до генерації ПД і підвищення деполяризації (46,1 % \pm 4,5 %, n=20), а також тетанічного скорочення (97,4 % \pm 4,6 %, n=18). Навпаки, при аплікації 4-АР 5 ммоль/л виникала деполяризація невеликої амплітуди (16,8 % \pm 2,07 %, n=14) на початку якої спостерігався невеликий фазний компонент та поступове підвищення тонусу (46,7 % \pm 5,5 %, n=11). Доданий на його фоні ТЕА 5 ммоль/л викликав генерацію ПД та тетанічне скорочення лише через певний час після поступового підвищення деполяризації та тонусу. Отримані результати свідчать про те, що в формуванні МП беруть участь обидва типи калієвих каналів, але динаміка дії їх блокаторів відрізняється. 4-АР швидко блокує K_V -канали, що й зумовлює наявність фазного компонента при реєстрації МП на початку аплікації 4-АР, але активація K_{Ca} -каналів при цьому перешкоджає подальшому підвищенню деполяризації. ТЕА, навпаки, діє повільніше, що може бути зумовлено тим, що питома кількість K_{Ca} -каналів у мембрані ГМК загальної легеневої артерії вища за таку для K_V -каналів приблизно на 35 %.

ЗМІНИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ ПІД ВПЛИВОМ СТЕРОЇДОГЕНЕЗСТИМУЛЮВАЛЬНИХ ФАКТОРІВ

С.В. Токар², І.О. Лук'янець¹, О.М. Яворська¹, О.О. Лук'янець^{1,2}

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;

²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

Відомо, що стероїдогенез у адренкортикальних клітин надниркової залози запускається механізмами, що збільшують внутрішньоклітинний вміст кальцію. Але також відомо, що клітини кори надниркових залоз експресують кілька типів рецепторів, що відповідають на декілька рівнів регуляції надниркових залоз. Так, адренкортикальні клітини експресують рецептори до адренкортикотропного гормону (АКТГ, центральна регуляція з боку гіпофіза), мускаринові ацетилхолінові (АХ) рецептори (периферична нервова регуляція) та серотонінові (5-НТ) рецептори (локальна регуляція з боку тучних клітин, лаброцитів). Тому метою наших досліджень було вивчення відмінностей впливу вказаних систем регуляції на кальцієвий гомеостаз адренкортикоцитів. За допомогою флуоресцентного методу вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію із використанням кальційчутливого зонда FURA-2М нами було проведено аналіз відповідей, отриманих при деполяризації мембрани КСІ та аплікації АКТГ, АХ і 5-НТ на культивовані адренкортикальні клітини щура. Наші експерименти показали, що всі із використаних сполук можуть підвищувати вміст внутрішньоклітинного кальцію (Ca_i), але кальцієві транзєнти відрізнялися своїм характером. Так, кальцієві транзєнти, викликані депо-

ляризацією мембрани (додавання 100 ммоль/л КСІ), характеризувалися швидкою фазою наростання та спаду, вказуючи на наявність потенціалзалежних каналів у плазматичній мембрані адренкортикоцитів. Схожими швидкоплинними характеристиками відмічалися і відповіді на аплікацію 2 мкмоль/л АКТГ. Причому у випадку довготривалої аплікації АКТГ, кальцієві транзєнти за тривалістю були такі самі як і при короткочасній аплікації - вміст Ca_i швидко повертався до початкового. Інший характер відповідей адренкортикоцитів спостерігався при аплікації АХ. Так, спостерігалась більш повільна фаза наростання кальцієвого транзєнта у відповідь на аплікацію цього агоніста, а також дуже повільне повернення Ca_i до початкового рівня. Додавання до зовнішнього розчину 1 мкмоль/л 5-НТ також викликало значні кальцієві транзєнти, які за своєю тривалістю займали проміжне місце між АКТГ та АХ транзєнтами. За амплітудою кальцієві транзєнти, викликані досліджуваними субстанціями, виявилися статистично подібними. Таким чином, наші експерименти показали, що всі три системи регуляції активності адренкортикоцитів викликають зміни в їх кальцієвому гомеостазі, різниця в їх ефекті може полягати в часовому характері кальцієвих транзєнтів, що індукуються цими сполуками.

ТРИ КОМПОНЕНТИ ВИХІДНОГО КАЛІЄВОГО СТРУМУ ПОДИНОКИХ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН СІМ'ЯВИДІЛЬНИХ ПРОТОКІВ ЩУРА

М.І. Хархун, Д.О. Кришталь

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

За допомогою методики фіксації потенціалу досліджували вихідний струм поодиноких гладеньком'язових клітин (ГМК) сім'явидільних протоків щура. Три компоненти ви-

хідного сумарного калієвого струму було виділено за часово-кінетичними та фармакологічними характеристиками: 1) кальційзалежний калієвий струм ($I_{K, Ca}$); 2) струм із швид-

кою кінетикою інактивації, А-струм ($I_{K,A}$); 3) струм із повільною кінетикою активації та інактивації, калієвий струм затриманого випрямлення ($I_{K,DR}$). $I_{K,Ca}$ вилучався заміною зовнішньоклітинного кальцію на іони магнію, чи додаванням селективного блокатора кальційзалежних калієвих каналів великої провідності харібдотоксину у концентрації 200 нмоль/л. Спад $I_{K,A}$ задовільно описувався двоекспоненціальною функцією, причому величина констант часу не залежала від величини деполяризуючого зміщення. $I_{K,A}$ дозозалежно пригнічувався 4-амінопіридином із концентрацією половинного блокування 0,32

ммоль/л. Постійна часу активації $I_{K,DR}$ залежала від величини деполяризуючого зміщення і зменшувалась е-кратно для кожних 21 мВ деполяризації. $I_{K,DR}$ дозозалежно пригнічувався блокатором потенціалкерованих калієвих каналів клофіліумом із концентрацією половинного блокування 17 нмоль/л; додавання 500 нмоль/л клофіліуму повністю пригнічувало струм.

Отримані результати свідчать про участь відповідних компонентів вихідного калієвого струму в регуляції мембранного потенціалу поодиноких ГМК сім'явидільних протоків щура.

МЕМБРАННІ ТА КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ РОЗСЛАБЛЮЮЧОГО ВПЛИВУ НІТРОГЛІЦЕРИНУ НА СУДИННІ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІ КЛІТИНИ ЩУРА

В.В. Цвіловський, Я.М. Метюк

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

За допомогою методики тензометрії та методу "patch-clamp" було досліджено механізми розслаблюючого впливу оксиду азоту (NO) на ГМК судин із різних ділянок кровоносного русла щура – стегової та сонної артерій. Нітрогліцерин (НГ) (100 мкмоль/л), внутрішньоклітинний донор NO, дозозалежно розслаблював гладеньком'язові препарати сонної і стегової артерій щура, попередньо скорочені норадреналіном. У випадку з препаратом сонної артерії розслаблення на 100 мкмоль/л НГ було майже повним, а у випадку з препаратом стегової артерії - значно нижче базального рівня. Попередні результати дозволили припустити, що НГ спричиняє зменшення чутливості скоротливого апарату до іонів Ca^{2+} . Це припущення було перевірене серією дослідів на скінованих препаратах стегової артерії щура. НГ (100 мкмоль/л) пригнічував на 50 % скорочення, викликане збільшенням концентрації іонів Ca^{2+} до 1 мкмоль/л, попередньо скінованих ГМК. Додавання 8-Br-цГМФ призвело до аналогічного ефекту пригнічення скорочення. Це свідчить на користь припущення

про розслаблюючий вплив НГ на ГМК стегової артерії зниженням чутливості скоротливого апарату до Ca^{2+} цГМФ-залежним шляхом. У випадку з препаратом сонної артерії розслаблення значно зменшувалося за наявності неселективного блокатора кальційактивованих калієвих каналів великої провідності, тетраетиламонію (3 ммоль/л). Досліді на поодиноких свіжоізольованих клітинах з сонної артерії щура за допомогою техніки фіксації потенціалу довели, що нітрогліцерин збільшував вихідний інтегральний струм від цілої клітини в конфігурації "perforated patch". Реєстрації струмів поодиноких каналів у конфігурації "cell-attached" показали, що збільшення інтегрального струму відбувається за рахунок збільшення ймовірності знаходження кальційактивованих калієвих каналів великої провідності у відкритому стані. При цьому нітрогліцерин не впливав на провідність поодинокого каналу. Наші результати свідчать про те, що оксид азоту спроможний викликати розслаблення як за допомогою активації провідності, що реполяризує чи гіперполяризує мембрану, так і через

механізми, які не тільки не впливають на мембранний потенціал, але й викликають роз-

слаблення без змін концентрації іонізованого кальцію в клітинах.

ВПЛИВ ОКСИДУ АЗОТУ НА ЗЛИТТЯ МЕМБРАН У МОДЕЛЬНІЙ СИСТЕМІ

В.М. Цивкін, І.М. Прудніков, Л.І. Колчинська, М.К. Малишева

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ

Злиття синаптичних везикул з пресинаптичною мембраною є одним з головних етапів у процесі екзоцитозу. Особливий інтерес викликає регуляція екзоцитозу і, зокрема, процесу злиття клітинних мембран. Виявлено, що оксид азоту, який є потужним регулятором деяких процесів, пов'язаних з пластичністю синапсів, стимулює викид нейромедіаторів у різних типах нейронів. Метою цієї роботи було дослідження впливу оксиду азоту на злиття мембранних структур у модельній системі як одного з головних етапів нейросекреції. Вивчали злиття мембранних фракцій синаптосом (синаптичних везикул та плазматичних мембран), виділених з клітин головного мозку кроля, вимірюючи зміни флуоресценції гідрофобного барвника R18 у

мембранах. Метод заснований на здатності до самогасіння флуоресценції за умов високої поверхневої щільності барвника в мембранних ліпідах. Було показано, що при інкубації мічених синаптичних везикул з неміченими синаптичними мембранами або неміченими синаптичними везикулами збільшення флуоресценції, а, отже, і злиття мембран, стимулюється обробкою фосфоліпазою A_2 . Mg -АТФ викликає подальше збільшення ступеня злиття. Додавання в систему екзогенного донора оксиду азоту SIN призводить до збільшення величини стимульованої флуоресценції. Таким чином, наші дослідження дають можливість припустити, що оксид азоту стимулює злиття синаптичних везикул з пресинаптичною мембраною.

МЕМБРАННІ ТА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ СИНАПТИЧНОГО ЗБУДЖЕННЯ І ГАЛЬМУВАННЯ ВІСЦЕРАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

М.Ф. Шуба

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Основними нейромедіаторами, що викликають синаптичне збудження та гальмування вісцеральних гладеньких м'язів є ацетилхолін та АТФ відповідно. Хеморецептори плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин (ГМК), що сприймають дію цих нейромедіаторів належать до класу метаботропних рецепторів, які пов'язані з ефектором не прямо, а через системи внутрішньоклітинних посередників. І, незважаючи на те, що ацетилхолін і АТФ викликають у ГМК протилежні кінцеві ефекти (скорочення і розслаблення відповідно), молекулярна організація

мускаринових та АТФ-рецепторів типу P_{2U} дуже схожа з G-білками, що знаходяться на початку системи внутрішньоклітинних посередників. У гладеньких м'язах травного тракту мускаринові холінорецептори представлені двома підтипами – M2 та M3 – причому щільність M2-рецепторів у плазматичній мембрані ГМК майже в 4 рази більша ніж щільність M3-рецепторів. Активація ацетилхоліном M2-рецепторів призводить посередньо $G_{i/o}$ -білка – аденілатциклази до активації вхідного катіонного струму і деполаризації ГМК, яка, в свою чергу, активує входження

до ГМК іонів Ca^{2+} через кальцієві канали L-типу. Одночасна активація ацетилхоліном МЗ-рецепторів призводить посередньо $G_{q/11}$ -білка – IP3 до вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулу (СР). У результаті іони Ca^{2+} , концентрація яких у ГМК збільшується під впливом ацетилхоліну, активують скорочення та модулюють активність іонних каналів і десенситизацію М-холінорецепторів. Активація АТФ-ом P_{2y} -рецепторів призводить посередньо $G_{q/11}$ -білка- IP3 до вивільнення Ca^{2+} із СР, що активують низькопорогові кальційзалежні калієві канали низької провідності, що викликають гіперполяризацію ГМК, яка і є причиною пригнічення збудження та скорочення гладеньких м'язів.

Апамін ефективно і зворотно пригнічує кальційзалежні калієві канали, а, отже, і гальмівну дію АТФ на ГМК. За цих умов АТФ викликає в ГМК збудження замість гальмування. Блокування тирозинкінази ГМК генестейном пригнічує активність кальційзалежних калієвих каналів низької провідності мембрани ГМК, що свідчить про метаболічну залежність активності цих іонних каналів. Нарешті, слід зазначити, що і активація МЗ-рецепторів ацетилхоліном, і активація P_{2y} -рецепторів АТФ-ом опосередковуються $G_{q/11}$ -білком, проте у першому випадку кінцевим ефектом в ГМК є збудження і скорочення, у другому – гальмування та розслаблення.