

## РОЗДІЛ I. МОЛЕКУЛЯРНА ТА КЛІТИННА ФІЗІОЛОГІЯ

### РОЛЬ NO У РОЗВИТКУ ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ ДО СТАДІЇ БЛАСТОЦИСТИ IN VITRO

Т.В.Блашків, Т.Ю.Вознесенська

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

І нині залишається недослідженим вплив специфічних інгібіторів NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) на ембріони мишей *in vitro*, а саме на пізні стадії їх передімплантаційного розвитку. Метою нашої роботи було дослідити роль NO в розвитку передімплантаційних ембріонів мишей за допомогою додавання в культуральне середовище інгібітора NOS і донора NO. Робота виконана на ембріонах мишей лінії СВА на пізній 2-клітинній (з чіткими ядрами) і на 4-клітинній стадіях розвитку. Після періоду культивування за морфологічними ознаками ембріонів оцінювали стадію їх розвитку в порівнянні з такими в контролі (без впливу інгібітора NOS та донора NO). Підраховували кількість ембріонів на стадії дроблення (від 2 до 8 клітин) – чіткі межі, кількість клітин легко підраховується; 16-клітинна стадія – декомпактизація перед мітозом і рекомпактизація після завершення поділу; 32-клітинна стадія – формування бластоцель (початок кавітації) – утворення наповненої рідиною вакуолі. Використовували донор NO, нітропрурид натрію, а також такі фармакологічні інгібітори NOS: N-нітро-L-аргінинметиловий ефір, що пригнічує три відомі ізоформи; 7-нітроіндазол, що пригнічує nNOS; аміногуанідин – iNOS інгібітор, а також N<sup>w</sup>-нітро-L-аргінин – переважно eNOS інгібітор у концентраціях, підібраних за даними літератури та експериментально апробованих нами в дослідах на ембріонах мишей лінії СВА *in vitro*. Встановлено, що оксид азоту важливий дифузний регулятор передімплантаційного розвитку ембріонів, зокрема при переході від 2-х до 4-х клітин і на стадії дозрівання бластоцисти (понад 8 клітин). Нами вперше показано, що специфічні інгібітори iNOS, eNOS, nNOS у концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л здійснюють значний пригнічувальний вплив на передімплантаційний розвиток ембріонів мишей, а саме на стадії морули. Ми вважаємо, що рівні NO, які забезпечують різні ізоформи NOS і сумісно становлять критичні його концентрації, є необхідними для нормального розвитку ембріонів. Отримані результати підтверджують важливість NO в передімплантаційному розвитку ембріонів і його участь в одному з механізмів, які регулюють міотичний поділ таких ембріонів.

### НАТРІЙТРАНСПОРТУВАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ, ЩО ЗАЗНАЛИ ДОВГОТРИВАЛОЇ ПРИМУСОВОЇ АЛКОГОЛІЗАЦІЇ

І.Й. Влох, Н.М. Гринчишин, Л.П. Павлюст, А.В. Шкаволяк

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

В оцінці біологічної активності етанолу відрізняють два підходи – метаболічний і токсикологічний. В останньому випадку завжди йдеться про алкоголь, що за надмірного надходження в організм діє як потужний фармакологічний агент і фактор метаболічної дезінтеграції. Цей висновок обґрунтовує необхідність проведення інтенсивних досліджень у таких галузях, як фізіологія, біохімія, молекулярна біологія, психіатрія, неврологія для виявлення відповідних маркерів ризику хронічного алкоголізму. Метою нашої роботи було встановлення особливостей впливу хронічної алкогольної інтоксикації на два уабайнрезистентні натрійтранспортувальні механізми в еритроцитах 180 лабораторних щурів, у тому числі їх потомства першого та другого покоління. Вивчали зміни Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-протитранспортування та Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-котранспортування при споживанні щурами 15%-го етанолу впродовж 1–6 міс, а також у період післядії тривалістю 1–3 міс. Швидкість Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-протитранспортування виміряли методом Canessa (1989), швидкість Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-котранспортування – методом de Mendonsa та співавт. (1983). Упродовж 180-

добового періоду, під час якого лабораторні щури споживали етанол, швидкість  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -протитранспортування в основному зменшувалася: через 30 діб – на 21 %, через 60 діб – на 62 %, через 90 діб – на 41 %, через 150 діб – на 24 %, через 180 діб – на 17 %. В еритроцитах щурів, народжених від батьків, що споживали етанол, вірогідних змін швидкості даного іонного обміну не виявлено. Ступінь розвитку індукованих впливом етанолу змін швидкості  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -котранспортування, що проявлялися його посиленням, був більш високим порівняно з модуляцією  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -протитранспорту у тварин ідентичних експериментальних груп. Що ж стосується особливостей  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -котранспортування в еритроцитах особин з числа першого та другого покоління, витриманих за умов примусової алкоголізації, то в переважній більшості випадків надмірна активація механізму, за посередництвом якого відбувається ця транслокація, виявилася досить стійкою.

## МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ КАТІОНІВ ДВОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ З КАЛЬЦІЙТРАНСПОРТНИМИ СИСТЕМАМИ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ

Л. О. Дубицький

Львівський національний університет ім. Івана Франка

Одним із важливих напрямків дослідження молекулярних механізмів функціонування мітохондріальних кальційтранспортних систем є аналіз фізико-хімічних механізмів, що лежать в основі вибіркової транслокації ними  $\text{Ca}^{2+}$  та інгібування її катіонами інших металів. Для дослідження цих механізмів нами були застосовані методичні підходи, які ґрунтуються на інгібуванні транслокації кальцію кальційтранспортними системами катіонами інших лужноземельних і перехідних металів. Основними об'єктами досліджень були  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер і  $\text{Ca}^{2+}-\text{H}^+$ -обмінник ізольованих мітохондрій печінки щурів. Транслокацію  $\text{Ca}^{2+}$ -цими кальційтранспортними системами реєстрували радіоізотопними методами з використанням  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Було встановлено, що  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  (10–50 мкмоль/л) інгібують транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером за конкурентним типом. Для  $\text{Cd}^{2+}$  характерний змішаний тип інгібування цієї транспортної системи. Інгібіторні константи катіонів металів для  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера зменшується у такій послідовності:  $\text{Sr}^{2+}(66,49) > \text{Mn}^{2+}(49,29) > \text{Cd}^{2+}(10,36) > \text{La}^{3+}(2,11)$ .  $\text{Ca}^{2+}-\text{H}^+$ -обмінник за фізіологічних умов функціонує в режимі воднезалежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. Катіони металів конкурентно пригнічують цей вихід  $\text{Ca}^{2+}$  переважно за умови їхньої внутрішньомітохондріальної локалізації. За ефективністю інгібування цього транспорту вони утворюють ряд:  $\text{Ba}^{2+}(65,7) < \text{Sr}^{2+}(68,1) < \text{Mn}^{2+}(92,7) < \text{Co}^{2+}(93,8)$ . Ефективність інгібування кальційтранспортних систем мітохондрій катіонами металів залежить від констант стійкості їхніх комплексів з кисневмісними лігандами (ацетат, аспартат, глутамат) ентальпії їхньої гідратації та кристалографічних радіусів. Взаємодія катіонів металів з мітохондріальними кальційтранспортними системами значною мірою може модифікуватися внаслідок пригнічення ними процесів окиснення у дихальному ланцюгу та індукції неспецифічної проникності внутрішньої мембрани мітохондрій. Ефективність такого впливу катіонів металів корелює зі спорідненістю їх до сульфгідрильних груп біолігандів (цистеїн). Зроблено висновок, що вибіркова транслокація кальцію мітохондріальними кальційтранспортними системами визначається співвідношенням енергії зв'язку катіонів металів з кисневмісними групами кальційтранспортувальних центрів цих іонотранспортних білків і енергії їхньої гідратації, а також стеричними факторами. Взаємодія катіонів металів з кальційтранспортними системами мітохондрій може модифікуватися завдяки їхньому впливу на процеси окиснення у дихальному ланцюгу та неспецифічній проникності внутрішньомітохондріальної мембрани.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ІОННИХ КАНАЛІВ ВНУТРІШНЬОЇ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ ПІРАМІДАЛЬНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА

Д.Є. Дужий, О.А. Федоренко, С.М. Марченко

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

D\_DUZHYY@hotmail.com

Досліджувались іонні канали внутрішньої ядерної мембрани пірамідальних нейронів ділянок СА1 та СА3 гіпокампа щура. Спонуванням до цієї роботи були, зокрема відомості про можливість іонів кальцію проникати в ядро та запускати транскрипцію генів, важливих для утворення пам'яті. Передумовою були також дані, які продемонстрували наявність на внутрішній мембрані нейронів Пуркінє мозочка щура малоселективних катіонних каналів, а також кальцієвих каналів, що регулюються за допомогою  $IP_3$ -рецептора першого типу. Для дослідження іонних каналів на внутрішній мембрані ізольованих ядер нами був використаний метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patches у режимі фіксації потенціалу. Серед зареєстрованих каналів у симетричному розчині 150 ммоль/л КСІ найчастіше зустрічався канал з провідністю 240 пСм. Як показали досліди в несиметричному розчині КСІ/К–Glu це катіонний канал, який за кінетичними якостями та провідністю близький до малоселективного катіонного каналу, зареєстрованого раніше в ядрах нейронів Пуркінє мозочка щура. Вірогідність відкритого стану  $P_0$  цього каналу збільшувалася від значень, близьких до нуля при мембранному потенціалі –80 мВ до значень, близьких до одиниці при +80 мВ. Другим за частотою стривальності у внутрішній ядерній мембрані пірамідальних нейронів гіпокампа є  $IP_3$ -канал з провідністю 370 пСм і кінетикою схожою до каналів, виявлених в ядрах нейронів Пуркінє. Окрім перерахованих каналів у внутрішній мембрані ядер, що досліджували були зареєстровані поодинокі канали з іншою провідністю. Так, у ділянці СА3 у симетричному розчині був зафіксований канал з провідністю 700 пСм, а також канал з провідністю, що залежала від фіксованого потенціалу. Цей канал мав багато підрівнів провідності та флукував між ними. В ділянці СА1 був зафіксований канал з провідністю 356 пСм та декілька каналів з меншою провідністю. Зрештою, внутрішня мембрана ядер пірамідальних нейронів гіпокампа вміщує багато різноманітних каналів з домінуванням малоселективних катіонних каналів з провідністю 240 пСм і  $IP_3$ -каналів з провідністю 370 пСм. Отримані результати про наявність кальцієвих каналів у внутрішній мембрані ядер пірамідальних нейронів гіпокампа поряд з попередніми даними про їх наявність в ядрах нейронів Пуркінє на протигагу від їх відсутності у ядрах нейронів гранулярних нейронів мозочка свідчать про їх ймовірну важливість для кальційзалежних ядерних процесів цих специфічних нейронів.

## REGULATORY ROLE OF MITOCHONDRIA IN CAPACITATIVE CALCIUM ENTRY

Krzysztof Zablocki, Joanna Szczepanowska,  
Rafal Koziel, Wojciech Brutkowski, Jerzy Duszynski

Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

j.duszynski@nencki.gov.pl

Accumulation of  $Ca^{2+}$  by mitochondria may have a complex effect on cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis: (i) mitochondria buffer the excess of cytosolic  $Ca^{2+}$  thereby decreasing the amplitude of calcium transients. Moreover, after termination of cell excitation and subsequent decrease in  $[Ca^{2+}]_c$  mitochondria release accumulated calcium, which prolongs the phase of enhanced  $[Ca^{2+}]_c$ ; (ii) mitochondria prevent slow inactivation of CCE by buffering  $Ca^{2+}$  close to  $Ca^{2+}$  channels in both ER and PM; (iii) mitochondria support the reloading of ER calcium stores, which in turn may limit CCE. The final effects of mitochondrial disturbances depend most probably on the type of cell and the mechanism of cell stimulation. Finally,

mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation is tightly connected with their energy status. This couples cellular energy metabolism to the spatio-temporary shaping of calcium signals.

## **ВПЛИВ NO НА МЕТАБОЛІЧНІ ЕФЕКТИ СУБСТРАТІВ ЦИКЛУ КРЕБСА**

**О.В. Іккерт, С.К. Гордій, М.О. Гальків, К.М. Мурашук**

Львівський національний університет ім. Івана Франка

Єдиного погляду щодо механізму впливу NO на процеси енергетичного забезпечення немає. Це пов'язано з використанням різних доз донорів і попередників біосинтезу оксиду азоту, а також умовами виділення мітохондрій (МХ). Giulivi зі співавторів вважає, що NO, який утворюється в МХ, модулює їхнє дихання та синтез АТФ внаслідок інгібування цитохромоксидази. Залежно від субстрату окиснення рівень продукування NO також може зазнавати змін через безпосередній вплив на активність NO-синтаз. Отже, субстрати окиснення дихального ланцюга можуть змінювати рівень продукування ендогенного оксиду азоту, що відповідно, може впливати на процеси енергозабезпечення за різних функціональних умов (підтверджено нашими дослідженнями), оскільки за умов введення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну досліджено зміну шляхів надходження субстратів у дихальний ланцюг. Зокрема, активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) зазнавала пригнічення, яке корелювало зі зниженням ефективності фосфорилування за умов окиснення сукцинату. Проте за цих умов зростала роль трансаміназних реакцій. Відомо, що утворення  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) у цих реакціях виступає додатковим джерелом надходження відновлених еквівалентів для підтримання функціональної активності МХФК I. Неоднозначність ефектів L-аргініну в разі окиснення глутамату з малатом і глутамату з піруватом, імовірно, зумовлена тим, що синтез L-аргініну в організмі ссавців пов'язаний з циклом сечовини, а той, відповідно – із циклом трикарбонових кислот. Як відомо, аргінінсукцинатсинтетаза каталізує конденсацію цитруліну та аспартату. За умов розпаду аргінінсукцинату утворюються аргінін і фумарат, який переноситься у МХ і окиснюється до оксалацетату. Для подальшої роботи циклу сечовини, потрібен аспартат, який утворюється за допомогою трансамінування оксалацетату аспаратамінотрансферазою (АсАТ) і супроводжується надходженням аспартату та КГ у цитозоль, а глутамату – у МХ. Отже, АсАТ задіяна в ендогенному синтезі L-аргініну і є більш залежною від змін NO-ергічної ланки регулювання. Саме цим можна пояснити отримане нами підвищення процесів енергетичного забезпечення за умов використання глутамату з піруватом як субстратів окиснення. Тобто метаболічні ефекти субстратів циклу трикарбонових кислот пов'язані з системою NO, тому можуть бути кориговані змінами функціональної активності NO-ергічної ланки регулювання функцій організму.

## **СТАН УЛЬТРАСТРУКТУР НИРКОВОЇ КОРИ БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ДОВГОТРИВАЛІЙ ДІЇ ЕТАНОЛУ**

**В.І.Ковалишин, С.В.Федевич**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії у самиць білих щурів, що впродовж шести місяців єдиним джерелом пиття мали 15%-й розчин етанолу, спостерігали в ниркових тільцях розширені та набряклі просвіти приносної і виносної артерій, капсули клубочка та гемокапілярів судинної петлі клубочка. Клітини щільної плями були дезорганізованими, а юктагломерулярні – дегранульованими. Електронно-щільні кортикальні шари цитоплазми вкорочених цитоподій подоцитів тісно прилягали одна до одної та перекривали фільтраційні щілини, тоді як фенестри ендотеліальних клітин гломерулярного фільтра були розширені, або разом з прилеглою цитоплазмою десквамовані в дезорганізовану плазму крові. Значні ділянки базальних мембран нефрону були нерівномірно потовщені та вмщували

імунні комплекси у вигляді депозитів. Епітеліальні клітини по всій довжині нефрону, а також у збірних ниркових каналцях мали зменшену електронну щільність цитоплазми, яка була насичена значною кількістю аутофаголізосом, дезорганізованими мітохондріями, розпушеними плазматичними мембранами. Характерним для ядер епітеліальних клітин каналців проксимальної частини нефрону була наявність розвинутих одного чи двох ядерець великого розміру. На фоні переважаючої кількості світлих клітин у збірних ниркових каналцях виявлялись поодинокі темні клітини, що мали підвищену електронну щільність ядра та цитоплазми, вщерть наповненої мітохондріями з великою кількістю деформованих крист. Окремі мітохондрії своїми кортикальними шарами тісно прилягали до острівців тубуловезикул, які, як відомо, відіграють важливу роль у регуляції секреції іонів водню. Для перитубулярних гемокапілярів була властива наявність у них лапатах мас грудкоподібної чи піноподібної конфігурації, гемолізованих еритроцитів, еритроцитів із значною і низькою електронною щільністю, тромбоцитів із згладженою формою, нейтрофільних гранулоцитів, лімфоцитів, а розширений субендотеліальний шар пронизаний пучками колагенових волокон. Отже, ультраструктурні зміни у нефронах і сполучній тканині ниркової кори довготривало алкоголізованих щурів свідчать про метаморфоз клітинних і неклітинних елементів у напрямку формування нетипових структурно-метаболических субстанцій, що забезпечують стійкий розвиток оксидативного стресу.

## ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСОЦІЙОВАНИХ КЛІТИН СІТКІВКИ ОКА ЩУРА

**Ю.О. Колодін, М.С. Веселовський, Н.М. Веселовська, С.А.Федулова**

Міжнародний Центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

Великий інтерес у фізіологічних дослідженнях сітківки становлять препарати ізольованих клітин, що дають набагато більше експериментальних можливостей для вивчення властивостей поодинокі клітини порівняно з препаратами *in situ*. У нашому препараті ізольованих клітин сітківки ока 21-добових щурів лінії Вістар була можлива надійна морфологічна ідентифікація двох типів клітин: гангліозних *s* біполярних. На ідентифікованих клітинах сітківки ока проводили експерименти з використанням фіксації потенціалу на мембрані клітини за допомогою методики *patch-clamp* у модифікації “ціла клітина”. Розділення типів вихідних потенціалкерованих калієвих струмів було проведене за відомими методиками, що використовують потенціалзалежність стаціонарної інактивації цих струмів, завдяки чому ідентифікувалися струми різних типів: струм А-типу, зі швидкою інактивацією ( $I_A$ ), з повільною інактивацією ( $I_K$ ), та без інактивації, струм М типу ( $I_M$ ). Для цього перед тестовим деполяризувальним зсувом потенціалу подавалися кондиціювальні зсуви, або використовувалася деполяризація клітини до  $-20$  мВ з наступними гіперполяризувальними зсувами. У гангліозних клітинах сітківки були великі вхідні струми, що активувалися деполяризувальними при підтримуваному потенціалі  $-65$  мВ. Ці клітини характеризувалися наявністю  $I_A$ ,  $I_K$  і відсутністю  $I_M$ . Біполярні клітини мали гетерогенні електрофізіологічні властивості, що узгоджується з даними про наявність різних типів цих клітин у сітківці. Найчисленніша група біполярних клітин відзначалося тим, що не було вхідного струму (що свідчить про відсутність потенціалкерованого натрієвого струму), також калієвим струмом, що не мав значної інактивації протягом 24 мс деполяризувального зсуву потенціалу. Однак дві клітини мали інші властивості. Першій властива наявність вхідного струму при деполяризувальних зсувах потенціалу, а також калієвий струм, що значно інактивувався протягом зсуву. Друга характеризувалася відсутністю вхідних струмів та калієвим струмом, що значно інактивувався протягом зсуву. Ця клітина була перевірена на наявність  $I_A$ ,  $I_K$  і  $I_M$ , та в неї були ідентифіковані  $I_A$ ,  $I_K$  при відсутності  $I_M$ . Цікавим фактом є те, що попередній кондиціювальний зсув потенціалу на мембрані до  $-120$  мВ викликав появу в цій клітині значного вхідного струму, що, можливо, свідчить про наявність низькопорогового кальцієвого струму, який інактивується при  $-65$  мВ.

Таким чином, гетерогенні властивості вхідних і вихідних струмів ретинальних клітин зумовлені наявністю різних типів і підтипів клітин, що підтверджується відмінностями між ними у всіх типах провідності.

## **РОЛЬ ТРАНСЛОКОНОВОГО КОМПЛЕКСУ У ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ПАСИВНОГО ВИТОКУ КАЛЬЦІЮ З ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА У АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ**

**О.Копач<sup>1</sup>, Н.Войтенко<sup>2</sup>, М.Клевець<sup>1</sup>, Н.Федірко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Національний університет ім. Івана Франка, Львів;

<sup>2</sup>Інститут фізіології НАН України ім. О.О.Богомольця, Київ

За фізіологічних умов концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в агоністчутливих внутрішньоклітинних депо відображає баланс між захопленням кальцію  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазою (SERCA) та його пасивним вивільненням. Механізми пасивного вивільнення кальцію (типова властивість усіх  $\text{Ca}^{2+}$ -депонуючих органел) із ендоплазматичного ретикулума (ЕР) ацинарних клітин підщелепної слинної залози є нез'ясованими. Метою нашої роботи було вивчення механізмів пасивного витоку кальцію з ЕР ацинарних клітин прямим вимірюванням концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  всередині ендоплазматичного ретикулума ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) в mag-fura-2/AM зафарбованих клітинах. Концентрація іонізованого кальцію у цитоплазмі ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) була зафіксована на рівні її фізіологічного значення (100 нмоль/л) за допомогою ЕГТА/ $\text{Ca}^{2+}$ -суміші. Ми встановили, що пригнічення роботи SERCA внаслідок інкубування пермеабілізованих ацинарних клітин з тапсигаргіном чи за умов безкальцієвого середовища спричинювало посилення пасивного витоку  $\text{Ca}^{2+}$ , що проявлялось у поступовому зменшенні  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ . Таке пасивне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  є нечутливим до тапсигаргіну, гепарину чи рутенієвого червоного, що свідчить про його незалежність від роботи SERCA,  $\text{InsP}_3$ - чи ріанодинових рецепторів. Однак ми встановили, що обробка ацинарних клітин інгібітором синтезу білка пуроміцином (0,1–1 ммоль/л), яка призводить до видалення поліпептидів, які ростуть, із ЕР-рибосомотранслоконових пор, супроводжується посиленням пасивного витоку  $\text{Ca}^{2+}$ . Механізм пуроміциніндукованого пасивного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  не пов'язаний із модуляцією роботи SERCA,  $\text{InsP}_3$ - чи ріанодинових рецепторів. Таким чином, із одержаних результатів можна зробити висновок, що пасивне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР ацинарних клітин підщелепної слинної залози відбувається через транслоконову пору у мембрані ЕР.

## **ДИНАМІЧНА ВЗАЄМОДІЯ КАЛЬЦІЙРЕГУЛЮЮЧИХ СТРУКТУР**

**О.П. Костюк, П.Г. Костюк**

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

Взаємодія різних кальційрегулюючих внутрішньоклітинних структур становить одну з найбільш цікавих проблем для вивчення основних функцій нервової системи та впливу на них патологічних змін. За останніми даними, при передачі сигналу збудження існує тісний зв'язок між функцією таких внутрішньоклітинних органел, як мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум (як ріанодинчутливий, так і інозитолтрифосфатний). При цьому мітохондрії відіграють роль не лише у підтриманні енергетичного стану клітини, але й працюють як активне кальційзахоплююче депо. Нині є дані про мультифакторний характер дії мітохондрій, пов'язаний з ендоплазматичним ретикулумом за допомогою локальних та осциляторних кальцієвих сигналів (кальцієвих транзєнтів), можливої участі в регулюванні інактивації кальцієвих депо L-типу та компенсаторного входу кальцію, а також їх участі у формуванні пластичності нервової системи. Були проведені дослідження на ноцицептивних нейронах для виявлення взаємодії мітохондрій і ріанодинчутливим ендоплазматичним ретикулумом, між собою та можливим впливом мітохондрій на компенсаторний вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через депокеровані мембранні канали. При аплікації мітохондріального протонофору СССР амплітуда кальцієвих сигналів різко підвищувалась, а також збільшувалась швидкість

спаду кальцієвого транзєнта та його плато вїдносно контрольних показників. Надалї вїдмїчалося прискорення швидкостї повернення кальцію до базального рївня. При аплїкацї рїанодину амплїтуда кальцієвого транзєнта навпаки, знижувалася, але повернення вмісту кальцію до базального рївня суттєво уповільнювалося. Впливу на кальцієве плато не вїдмїчалося. Аплїкацїя СССР на фонї спаду рїанодин-їндукованого транзєнта викликала додаткове пїдвищення концентрацїї кальцію у цитозолї. При порївняннї транзєнтїв, зумовлених надходженням  $\text{Ca}^{2+}$  до ендоплазматичного ретикулума та мїтохондрїй, виявилося, що мїтохондрїї швидше та бїльш їнтенсивно захоплюють кальцїй, нїж ендоплазматичний ретикулум, який бїльш повільно вїддає його, що свїдчить про взаємочасть мїтохондрїй та рїанодинчутливого ендоплазматичного ретикулума у захопленнї  $\text{Ca}^{2+}$ . Швидше за все такий процес пояснюються тим, що мїтохондрїї суттєво захоплюють кальцїй не лише при його надходженнї у цитозоль, але і при його викиданнї з їнших внутрїшнїх кальцієвих депо. Одночасно було вїдмїчено, що спустошеннє ендоплазматичного ретикулума викликає вхїд  $\text{Ca}^{2+}$  з зовнїшньоклітинного середовища та його коротке часове пїдвищення у цитозолї. Це можна розцїнювати як компенсаторний вхїд  $\text{Ca}^{2+}$  через депокерованї кальцієвї канали. Процес обмїну кальцію мїж мїтохондрїями та ендоплазматичним ретикулумом може вїдбуватися і у зворотному напрямку ( тобто мїтохондрїї можуть захоплювати кальцїй, що виходить з ендоплазматичного ретикулума). Для порївняння нами було проведено дослїдження функцїї мїтохондрїй при патологїчному станї – цукровому дїабетї. Вїдмїчалося пїдвищення вмісту цитозольного кальцію при зниженнї амплїтуди захоплення кальцію мїтохондрїями. При цьому також у ноцицептивних нейронах уповільнювалася постїйне часу наростання концентрацїї кальцію та уповільнення його виходу з мїтохондрїй. Таким чином, функцїя мїтохондрїй та ендоплазматичний ретикулум вїдїграють суттєву роль у регуляцїї вмісту кальцію і у патологїчних умовах.

## **ВЗАЄМОДІЯ ІОНІВ ОДНОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ З СИСТЕМАМИ $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -ЗАЛЕЖНОГО ВИХОДУ $\text{Ca}^{2+}$ З МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ**

**Н.В. Крив'як, Л.С. Вовканич, Л.О. Дубицький**

Львівський національний університет ім. Івана Франка

В останнї десятирїччя доведено їснування в мїтохондрїях серця, м'язїв, печїнки та їнших тканин систем  $\text{Na}^+$  і  $\text{H}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$ . Проте властивостї цих мїтохондрїальних кальцїйтранспортувальних систем вивченї недостатньо. Наша робота присвячена кїнетичному аналізу взаємодїї їонїв одновалентних металїв з  $\text{Na}^+$ - і  $\text{H}^+$ -залежними системами виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мїтохондрїй печїнки. Дослїдження проводили на їзольованих мїтохондрїях печїнки шурїв. Вихїд  $\text{Ca}^{2+}$  з мїтохондрїй реєстрували електрометричним методом з використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -селективного електрода фїрми "Orion" (модель 9320). Встановлено, що залежнїсть швидкостї виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мїтохондрїй печїнки вїд концентрацїї  $\text{H}^+$  у позамїтохондрїальному просторї має сигмоподїбний характер. За допомогою аналізу отриманої концентрацїйної залежностї у координатах Хїлла встановлено, що  $V_{\text{max}}$   $\text{H}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  становить 1,67 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /хв•мг бїлка,  $K_m$  – 13,29 нмоль/л, коефїцієнт Хїлла - 1,6. Залежнїсть швидкостї  $\text{Na}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  їз їзольованих мїтохондрїй печїнки вїд концентрацїї  $\text{Na}^+$  у позамїтохондрїальному середовищї також адекватно описується сигмоподїбною кривою. Лїнеаризацїя отриманої залежностї у координатах Хїлла засвїдчила, що  $K_m$   $\text{Na}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з їзольованих мїтохондрїй печїнки для  $\text{Na}^+$  становить 8,41 нмоль/л,  $V_{\text{max}}$  – 1,92 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /хв•мг бїлка, а коефїцієнт Хїлла – 1,95. Внесеннє катїонїв одновалентних металїв ( $\text{Ti}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) у суспензїю мїтохондрїй супроводжується пригнїченням  $\text{H}^+$ - і  $\text{Na}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з цих органел переважно за конкурентним типом. За здатнїстю пригнїчувати  $\text{H}^+$ -залежний вихїд  $\text{Ca}^{2+}$  з мїтохондрїй катїони одновалентних металїв (0,1 – 40,0 ммоль/л) утворюють такий ряд ( $I_{50}$ , ммоль/л):  $\text{Cs}^+$  (2057,69) >  $\text{Rb}^+$  (183,26) >  $\text{Li}^+$  (158,68) >  $\text{Ti}^+$ (0,33). Їнгїбувальний вплив катїонїв одновалентних металїв на  $\text{Na}^+$ -залежний вихїд  $\text{Ca}^{2+}$  з мїтохондрїй бїльш значний і збїльшується у такїй послїдовностї ( $I_{50}$ , ммоль/л):  $\text{Cs}^+$  (337,11) >  $\text{Rb}^+$  (122,63) >  $\text{Li}^+$  (24,59) >  $\text{Ti}^+$ (0,59). Ефективнїсть їнгїбу-

вання  $\text{Na}^+$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  катіонами металів досить добре узгоджується зі значеннями їхньої ентальпії гідратації, потенціалу іонізації та електронегативності атома, а також з константами стійкості комплексів катіонів металів з ЕДТА. Проведений аналіз свідчить, що транслокація  $\text{H}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -обмінником мітохондрій та інгібування його катіонами одновалентних металів пов'язані із взаємодією цих іонів з кисневмісними групами іонотранспортувальних центрів обмінника і, вірогідно, супроводжуються процесами зворотної дегідратації-гідратації цих іонів.

### **ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ АЛОСТЕРИЧНОГО ВПЛИВУ ЗМІН ЗОВНІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ $\text{K}^+$ НА ВОРІТНІ МЕХАНІЗМИ ПОТЕНЦІАЛКЕРОВАНИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ**

**В.В. Кучер, Н.Я. Бойко, Н.Х. Погорєла, Н.В. Іванчук, І.С. Магура**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
magura@biph.kiev.ua

Важливим питанням у дослідженні іонних каналів і механізмів збудливості є вивчення структур, що зумовлюють функціонування та модуляцію ворітних механізмів іонних каналів та їх властивостей. У наших дослідженнях вивчалися молекулярні механізми, що забезпечують алостеричний вплив змін зовнішньоклітинної концентрації іонів калію  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  на ворітні механізми потенціалкерованих калієвих каналів. Домінуюча калієва провідність робить лінію клітин феохромоцитоми щура РС-12 зручним об'єктом для таких досліджень. Відомо, що структури зовнішнього устя і/чи селективного фільтра калієвого каналу можуть виконувати функцію воріт у механізмах повільної інактивації. В процесі повільної інактивації Р-типу бере участь селективний фільтр і можуть спостерігатися зміни селективності. У наших дослідженнях змін селективності в процесі інактивації не спостерігали. Ймовірно, селективний фільтр не брав участі в цьому процесі та інактиваційні ворота розташовані на зовнішньому усті калієвого каналу. Це питання потребує подальшого вивчення. Для виявлення можливих конформаційних змін зовнішнього устя при зміні  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  були проведені досліди з зовнішньоклітинного блокування калієвих каналів тетраетиламонієм (ТЕА), оскільки локус зв'язування ТЕА розташований на зовнішньому усті каналу. При збільшенні  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  з 5 до 20 ммоль/л ефективність блокування каналів іонами ТЕА зростала, подальше збільшення концентрації викликало зворотний ефект. Така поведінка може бути спричинена одночасним проходженням двох процесів: конформаційних змін у зовнішньому усті при змінах  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  і конкуренцією іонів калію та ТЕА за місце зв'язування на зовнішньому усті калієвого каналу. Проходження іона через канал є результатом послідовної його взаємодії зі структурами пори, а оскільки останні не є жорсткими, то зміни конформації пори в місцях зв'язування іона, зокрема на зовнішньому усті каналу, за рахунок алостеричних впливів можуть призводити до змін властивостей ворітних механізмів інактивації.

### **EXPRESSION OF METHYLATED-DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR MECP2 IN THE RAT BRAIN**

**J.D. Leah<sup>1</sup>, C. Rabe<sup>1</sup>, D.D. Pearse<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Biomedical Sciences, Griffith University, Australia;

<sup>2</sup>School of Medicine, University of Miami, USA

Stimulation of nociceptive sensory nerves, and axotomy both cause long-term changes in the functioning of neurons. These changes must be mediated by alterations in gene activity. Such alterations can be mediated by inducible and constitutive transcription factors such as Fos and Jun, and CREB and SRF, respectively. However, changes in neuronal functioning that persist over much longer times must involve more permanent alterations in the genome. One such alteration could be methylation of CpG base pairs in the promoters of genes. These methylated sites are bound by the transcription factor protein MeCP2. MeCP2 represses gene transcription by



tethering histone deacetylases causing chromatin condensation, by interacting with the TFIIB protein of the basal transcription machinery, and by interfering with RNA splicing. In these experiments we determined if stimulation of nociceptive sensory nerves, and axotomy, cause changes in the levels of MeCP2 in the affected neurons. Nociceptive sensory neurons were stimulated by injection of 50  $\mu$ l of 2% formalin under the ventral skin of one hindpaw of awake rats (Wistar, 250-350g). Neurons in the substantia nigra were axotomized by unilaterally transecting the medial forebrain bundle; or spinal sensory and motoneurons were axotomized by transecting the sciatic nerve in one hindlimb. The rats were given Pethidine and allowed to recover under observation. At different times after treatment, rats were killed with an anaesthetic overdose (Nembutal) and perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, and 50  $\mu$ m cryostat cut sections were immunocytochemically processed with two antisera against MeCP2 at dilutions of 1:10,000 to 1:70,000. MeCP2 expression was quantified as labeled cells per section (c/s), with the counting done "blind".

Stimulation of nociceptive C-fibers by injection into the hindpaw caused a 20 percent increase in the numbers of MeCP2 labeled cells in the CA1 and CA2 areas of the hippocampus 12 and 24 hours later (ANOVA,  $n = 6$ ,  $P < 0.005$  in both cases). No changes were seen in the other hippocampal areas. Increased numbers of MeCP2 labeled cells were also seen in the parietal, hindlimb sensory, frontal, and retrosplenial cortices. Transection of the medial forebrain bundle caused a 60 percent decrease in the numbers of MeCP2 labeled neurons in the substantia nigra on the axotomized side seven days later ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). There were no changes in the numbers of MeCP2 labeled cells in the sensory ganglion or motoneurons after axotomy. Thus, manipulations that are known to cause persisting changes in neuronal functioning also cause alterations in the levels of the transcription factor MeCP2 which binds to methylated DNA and produces persisting changes in gene expression. It remains to be shown that there are indeed changes in the methylation status of the relevant genes.

#### PROPERTIES OF NEUROTRANSMITTER RELEASE FROM SINGLE VESICLES

**E.A. Lukyanetz<sup>1,2</sup>, O.M. Pochynyuk<sup>1</sup>, O.L. Zaika<sup>2</sup>, O.V. Sadovyj<sup>2</sup>, P.G. Kostyuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; Ukraine;

<sup>2</sup>International Center for Molecular Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv  
elena@biph.kiev.ua

It is well known that adrenal chromaffin cells are originated from common precursor cells with sympathetic neurons, and their main function is release of neurotransmitter such as adrenaline and noradrenaline. The release of these catecholamines in chromaffin cells is triggered by elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ). The rise of  $[Ca^{2+}]_i$  induces the exocytosis which can be result from  $Ca^{2+}$  entering through voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels, via ionotropic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) as well as activation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) producing  $IP_3$  and releasing  $Ca^{2+}$  from intracellular stores. In our previous experiments we have shown that properties of  $Ca^{2+}$  transients induced by activation of nAChRs and mAChRs are quite different. We described two populations of chromaffin cells, which differently responded on AChR stimulation. In the first group (n-cells), consecutive ACh applications evoked persistent  $Ca^{2+}$  transients, whereas desensitizing transients were observed in the other group (m-cells). The cytochemical staining showed that n-cells contained adrenaline, whereas m-cells - noradrenaline. Therefore, we concluded that nAChRs and mAChRs are differentially expressed in adrenergic and noradrenergic chromaffin cells respectively. Further, we analyzed secretory responses in these two types of cells using Fura-2 fluorescent measurements and amperometric recording of single secretory events from the same cells. The influence of different types of stimulation on the secretion of catecholamines from secretory vesicles has been fulfilled by using an electrochemical technique in configuration "amperometry". We have shown that the mean frequency of quantal release during cell stimulation with ACh definitely higher then during cell depolarization by KCl. A comparative analysis of single secretory events has shown that in case of stimulation by acetylcholine the single secretory quanta had a definitely shorter duration, rise and decay times as compared with those during depolarization. Their amplitude in the first case was also definitely higher. However, the statistical analysis of

the area of single secretory spikes did not reveal substantial difference during both types of stimulation. A mathematical modeling of the dynamics of the secretory processes led to the conclusion that the experimentally demonstrated deceleration of the secretory process during membrane depolarization by potassium chloride comparing with stimulation of acetylcholine receptors may occur due to a decrease in the diameter of the pore formed during fusion of the secretory vesicle with the cell membrane. We also discuss the difference in single secretory events in two types of chromaffin cells.

## **ІНТЕГРАТИВНА ФУНКЦІЯ НЕРВОВИХ КЛІТИН І КАЛІЄВІ КАНАЛИ**

**I.C. Magura**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
magura@biph.kiev.ua

У центральній нервовій системі людини ідентифіковано майже 1000 різновидів нейронів. Певним чином це пов'язано з вибірковою експресією комбінацій іонних каналів. Встановлені відмінності механізмів електричної збуджуваності соми, дендритів, аксона, нервових закінчень, що також значною мірою визначається характером розподілу іонних каналів. За умов динамічної регуляції каналів існує можливість їх ефективного використання для інтегративної функції нейрона. Важлива роль у цій функції нейронів належить калієвим каналам. Вони відіграють важливу роль у багатьох сигналперетворювальних шляхах центральної нервової системи. Їх розглядають як головний детермінант мембранної збудливості. Вони забезпечують специфічність відповіді нейрона на вхідні сигнали, зокрема на ті, що пов'язані з активністю синапсів. За структурою  $\alpha$ -субодиниць калієві канали розділяють на три родини. Цим каналам властива наявність консервативного сегмента, що являє собою сигнатурну послідовність, яка формує селективний фільтр. Представники всіх трьох родин беруть участь у багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах. Калієві канали можуть бути мішенями для низки фармакологічних впливів. Дослідження ворітних механізмів калієвих каналів виявили важливий феномен – кумулятивну інактивацію, що є прикладом різновиду пам'яті нейрона, яка безпосередньо не залежить від активності синапсів. Молекулярний механізм цього явища пов'язаний з функціонуванням селективного фільтра. На кожний нейрон центральної нервової системи припадає у середньому 1000 синапсів, які розташовані переважно на дендритах, площа поверхні котрих може сягати приблизно 95 % від загальної поверхні нейрона. Дендритам властиві складні механізми електричної активності, пов'язаної з інтеграцією синаптичних сигналів. У діяльності дендритів слід відмітити виникнення потенціалів дії, що ретроградно розповсюджуються. Їхні параметри зумовлені типом, кінетикою, просторовим розподіленням і модуляцією іонних каналів, особливо калієвих. Останні значно контролюють збуджуваність дендритів і впливають на перебіг постсинаптичних потенціалів.

## **МЕХАНІЗМ СТЕАТОГЕННОЇ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ**

**T.M. Макаренко**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Жировий гепатоз є широко розповсюдженою патологією, особливо у країнах з високим рівнем розвитку. До патогенетичних чинників належать аліментарні фактори, гіпоксія, стрес. Проте найголовнішими залишаються ксенобіотики, що потрапляють в організм з продуктами харчування, й такі фармпрепарати, як цитостатики, антидепресанти, антиаритмічні, гормональні засоби тощо. Головним моментом у патогенезі розвитку жирового гепатозу є порушення балансу між швидкістю утворення нейтральних тригліцеридів і їх катаболізмом і порушення виведення їх з клітини. Розвиток жирового гепатозу пов'язують зі зміною транспорту жирних кислот і мітохондріальними процесами окиснення й енергозабезпечення.

чення. Оскільки процеси детоксикації та формування ліпопротеїнових частинок у гепатоцитах пов'язані з функціонуванням ендоплазматичного ретикулула, то метою нашої роботи було визначити характер розвитку медикаментозного жирового гепатозу залежно від активності системи мікросомального окиснення. Експерименти проводили на безпородних щурах-самцях масою 250–300 г, яких утримували на стаціонарному раціоні віварію. Жировий гепатоз викликали внутрішньоочеревинним введенням тетрацикліну гідрохлориду за 24 год до досліджень. Ступінь жирового гепатозу оцінювали спектрофотометрично за вмістом триацилгліцеридів. Мікросомальну фракцію отримували препаративним центрифугуванням. Вміст цитохрому P-450 визначали за Omura, Sato (1964). Дозозалежне зниження вмісту цитохрому P-450 під впливом одноразового введення тетрацикліну відбувалося паралельно зі зниженням активності анілінгідроксилази, р-нітроанізолдеметилази і амінопірин-N-деметилази та корелювало із зростанням рівня триацилгліцеридів гепатоцитів. Аналогічне зниження активності системи мікросомального окиснення відбувалося при попередній індукції фенобарбіталом. При дослідженні прямої дії тетрацикліну на мікросомальну фракцію печінки виявлено, що вміст цитохрому P-450 значно знижувався, починаючи з концентрації тетрацикліну 10–4 моль/л. При цьому вміст цитохрому P-420 не змінювався. Аналогічні результати були отримані при дослідженні анілінгідроксилазної активності мікросом печінки щурів при різних дозах тетрацикліну. Було зроблено такі висновки: 1. Розвиток жирового гепатозу корелює з ураженням системи мікросомального окиснення незалежно від вихідного вмісту цитохрому P-450. 2. Попередня індукція системи мікросомального окиснення фенобарбіталом не попереджала тетрацикліновий стеатоз. 3. Одним з механізмів розвитку жирового гепатозу може бути ураження ендоплазматичного ретикулула, критерієм якого є вміст цитохрому P-450.

## СХЕМА КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ CHIRONOMUS PLUMOSUS

**В.В.Манько, М.Ю.Клевець, С.В.Бичкова, О.Ю.Великопольська**

Львівський національний університет ім. Івана Франка

Клітини слинних залоз *Chironomus plumosus* L. відрізняються від інших секреторних клітин розмірами, формою і розміщенням органел, що повинно суттєво впливати на внутрішньоклітинні кальційзалежні процеси. Можливим первинним посередником для досліджуваних клітин є АТФ, оскільки у плазматичній мембрані секреторних клітин ми ідентифікували P2X- і P2Y-рецептори. Як відомо, активація P2X-рецепторів призводить до надходження ними  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного середовища та до деполяризації плазматичної мембрани, що забезпечує активацію потенціалкерованих калієвих каналів і наступну їхню кальцій- і потенціалзалежну інактивацію. Крім того, деполяризація мембрани має часове обмеження для розвитку кальцієвої відповіді ще й внаслідок активації високопорогових потенціалкерованих калієвих і хлорних каналів. Цілком можливо, що частина  $\text{Ca}^{2+}$  потрапляє в клітину через  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. Але головне значення обмінника, як і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани, є виведення  $\text{Ca}^{2+}$  у позаклітинне середовище. Важливу роль у просторовому обмеженні кальцієвої відповіді відіграє  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій, які розташовані щільним шаром вздовж базальної мембрани. Активація P2Y-рецепторів запускає вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{I}\Phi_3$ -чутливого депо. Підсилюється це вивільнення активацією ріанодинчутливих кальцієвих каналів, які узгоджено функціонують з  $\text{I}\Phi_3$ -чутливими каналами за принципом осциляторної одиниці. Обмежується кальцієвий сигнал у цій частині клітини лише  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою внутрішньоклітинних депо. Тому можна стверджувати, звертаючи увагу на великі розміри ядра чи відсутність менш-більш розвинутого ретикулула біля апікальної частини плазматичної мембрани, що у цій частині клітини кальцієвий сигнал має свої особливості. Отже, у досліджуваних секреторних клітинах функціонують два чіткі домени, які сформовані за участю плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулула, мають різний набір кальційтранспортних систем і виконують, мабуть, різне функціональне навантаження. Цілком логічно припустити, що завданням кальцієвого сигналу,

спричиненого підвищенням проникності плазматичної мембрани для  $\text{Ca}^{2+}$ , є регулювання процесів екзоцитозу. Відповідно, активація кальцієвої відповіді за участю  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих і ріанодинчутливих кальцієвих каналів внутрішньоклітинних депо повинна супроводжуватися підвищенням синтезу продуктів секреції та їхнім екзоцитозом.

### **ДІЯ ІМУНОАКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ КЛІТИННО-ЗВ'ЯЗАНОГО БІЛКА А ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА НА ЗБУДЖЕННЯ ТА ГАЛЬМУВАННЯ В ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗАХ КИШЕЧНИКА**

**Н.В. Меленевська, М.С. Мірошніченко, І.Б. Філіппов, Л.С. Холодна, М.Ф. Шуба**

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Методом одинарного сахарозного містка досліджували вплив клітинно-зв'язаного білка А (КЗБА) золотистого стафілокока на гальмівні ефекти АТФ, оксиду азоту та за допомогою методу флуоресцентних зондів – на механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньких м'язах (ГМ) *taenia coli* морської свинки. Також досліджувався вплив КЗБА на АТФазну активність актоміозину ГМ шлунка свині за допомогою методу Фіске–Суббароу. Було встановлено, що імуноактивна субстанція золотистого стафілокока – КЗБА деполаризує мембрану гладеньком'язових клітин (ГМК) *taenia coli*, усуває гальмівну дію на них АТФ (або УТФ), та нітропрусиду натрію. На початку аплікації КЗБА як АТФ-, так і УТФ-викликана гіперполяризація ГМК збільшувалася. Бактеріальна субстанція підсилювала, а з часом пригнічувала швидкий компонент нікотинвикликаного розслаблення, активованих гістаміном ГМ. Підсилення усувалося блокатором NO-синтаз  $\text{N}^{\omega}$ -нітро-L-аргініном. КЗБА пригнічував гальмівну дію АТФ (або нітропрусиду натрію) на гістамінове скорочення ГМ, але посилював їх холінергічне збудження. Всі ці процеси мали зворотний характер. КЗБА збільшував збудження ГМ *taenia coli*, викликане ацетилхоліном (АХ) або гіперкалієвим розчином Кребса. Також ця речовина підсилювала кофеїн (КФ)-, карбахолінвикликані кальцієві сигнали, навантаженої індо-1 суспензії ГМК, а також КФ та АХ, викликані в номінально безкальцієвому розчині Кребса скорочення мультиклітинних препаратів ГМ. На фоні пригніченої КЗБА гальмівної дії нітропрусиду натрію, АТФ викликав деполаризацію мембрани. КЗБА в малій концентрації потенціював АТФазну ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -;  $\text{Mg}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$  при наявності EGTA) активність гладеньком'язового актоміозину.

### **СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОНЕНТІВ КРОВІ ЯК МАРКЕРИ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**

**О.М. Мороз<sup>1</sup>, Р.О. Влох<sup>2</sup>, І.Й.Влох<sup>1</sup>, Н.М. Гринчишин<sup>1</sup>, Т.Г.Дудок<sup>2</sup>, А.М.Федорович<sup>3</sup>, К.П. Дудок<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького;

<sup>2</sup>Інститут фізичної оптики МОН України, Львів;

<sup>3</sup>Львівський національний університет ім. Івана Франка

Раніше нами було виконано цикл робіт для з'ясування ролі модуляції окремих структур крові в патогенезі шизофренії та алкоголізму. Зокрема досліджено електронні спектри гемоглобіну та інших компонентів крові, а отримані результати використано для опрацювання мембранних концепцій розвитку вказаних захворювань. Обґрунтовано, що ці захворювання супроводжуються змінами конформацій молекул досліджуваних білків, що, в свою чергу, чинить вплив на коливальні спектри інфрачервоної ділянки та циркулярного дихроїзму, спектри комбінаційного розсіювання світла та флуоресценсії. Внаслідок гетерогенності патологічних змін у хворих, що страждають на алкоголізм, як альтернативну стратегію використовують створені моделі хронічної алкогольної інтоксикації на лабораторних тваринах. Врахову-

ючи, що вплив етанолу на мембрани змінює їх структуру і що ці ефекти значною мірою відповідають за розвиток толерантності та фізичної залежності стосовно алкоголю, нами виконано експериментальне дослідження, мета якого полягала у встановленні особливостей впливу на спектральні характеристики окремих компонентів крові довготривалого споживання етанолу лабораторними щурами та їх потомством. Забір крові для вирішення поставлених завдань – встановлення спектральних характеристик – проводили через 1, 3 та 6 міс примусового споживання тваринами 15%-го розчину етанолу. В ці ж часові інтервали відокремлювали по 2–3 пари тварин для природного запліднення та отримання потомства 1-го та подальшого покоління. Частину щурів поступово переводили в режим споживання води. Подібний період післядії тривав 30 діб. На основі аналізу результатів спектральних досліджень нами встановлено, що спорідненість гемоглобіну етанолінтоксикованих щурів до кисню є нижчою у порівнянні зі значеннями у інтактних тварин. Виявлено також наявність змін в електронних спектрах поглинання гемоглобіну та імуноглобулінів за умов внесення в реакційну суміш хімічних реагентів (цибакрону та перекису водню), що засвідчує наявність конформаційних перебудов вищезгаданих біоструктур.

## МЕМБРАНОМОДЕЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕТЕРОПОЛІЯДЕРНИХ СПОЛУК

**Г.В. Островська, О.М. Філінська, Т.В. Рибальченко, А.В. Бичко,  
В.П. Лозовий, С.В. Яблонська, В.К. Рибальченко**

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

При різноманітних видах патологічних процесів у печінці людини і тварин спостерігається порушення функцій мембран, включаючи зміну їх проникності і зсув активності мембранозв'язаних ферментів. У попередніх наших дослідженнях встановлено, що новосинтезовані гетерополядерні сполуки Cu(II) та Co(III) з діетаноламіном (ДЕА) з потенційною фізіологічною активністю, виявляють гальмівну дію на інтенсивність секреції жовчі у щура, хоча зміни цих процесів не супроводжуються порушенням структури печінки. Можливо, це свідчить про вплив даних речовин-  $[\text{Cu}_2\text{Co}_2(\text{H}_2\text{DEA})_2(\text{DEA})_4]\text{Br}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$  (№1) та  $[\text{Cu}_2\text{Co}_2(\text{H}_2\text{DEA})_2(\text{DEA})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (№2) на процеси транспорту неорганічних іонів через плазматичні мембрани гепатоцитів. На моношарових мембранах з азолектину та біомолекулярних ліпідних мембранах (БЛМ) з фосфатидилхоліну показано, що ці сполуки практично не діють на поверхневий натяг моношарів та електропровідність БЛМ. Це свідчить, що молекули даної речовини не здатні подолати електростатичний мембранний бар'єр і лише адсорбуються в зоні полярних голівок ліпідів. Також встановлено, що вплив складових гетерополядерних сполук ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , іонів ДЕА та  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) на електричні показники БЛМ суттєво відрізняється від ефектів, що спостерігались у разі дії самих сполук. Таким чином, адсорбуючись у зоні високої щільності зарядів, речовини не зазнають деструкції або розриву координаційних зв'язків. За умов впливу даних речовин на екто-АТФазну активність встановлено стрімке пригнічення активності мембранозв'язаного ферменту. При концентрації  $10^{-4}$  моль/л сполука №1 знижує активність ферменту на 88 %, при дії сполуки №2 – на 68 % порівняно з контролем. Подібна закономірність спостерігається і при дії сполуки №2 на  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазну активність. Проте при мінімальних концентраціях ( $10^{-9}$  та  $10^{-8}$  моль/л) ферментативна активність збільшується на 35–45 %, а при  $10^{-7}$  моль/л активність стрімко спадає приблизно на 50 % і залишається на такому рівні до максимального підвищення концентрації ( $10^{-4}$  моль/л). Враховуючи той факт, що ці речовини адсорбуються лише на поверхні мембрани, взаємодіють безпосередньо з позамембранними петлевими доменами АТФаз, змінюючи їх конформацію, можна припустити, що гетерополядерні сполуки міняють афінність ферментів до іонів кальцію.

**МОЖЛИВОСТІ МОДУЛЯЦІЇ МЕМБРАННОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ****Т. І. Панова**

Донецький державний медичний університет ім. М. Горького

Кальцієві канали і сполучена з ними  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза є одними з ефекторів на шляху мембранної сигналізації від опіоїдних рецепторів. Коенова кислота модулює зв'язування лігандів з опіоїдними рецепторами. Детально механізм дії цієї кислоти на мембрану недосліджено. Якщо він такий самий, як і у опіоїдів, то доречно очікувати наявності будь-якої залежності активності кальцієвих механізмів від коенової кислоти. Метою нашої роботи було з'ясувати, чи впливає коенова кислота на активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази. Використано метод швидкого виділення плазматичних мембран з тканин спинного мозку і дорсальних гангліїв. Тканини мозку подрібнювали та гомогенізували на льоду в тефлон-скляному гомогенізаторі Даунса у 5-кратному об'ємі 25 ммоль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,3). Гомогенат центрифугували 5 хв (350 g, 4°C), потім супернатант центрифугували у ступінчастому градієнті щільності Перкола 20 хв (100000 g, 4 °C) При цьому мембрани розділилися за допомогою їх флотації в ступінчастому градієнті Перкола на 5 фракцій. Після закінчення центрифугування кожену фракцію окремо заморожували при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Надалі для проведення досліджень АТФазної активності аліквоти отриманих препаратів мембран фракції розморожували та преінкубували 45 хв в інкубаційному буфері, в який додавали мічений АТФ (250000 розпадів на пробу) і 0,5 ммоль/л немічений АТФ, а також  $\text{CaCl}_2$  і кальмодулін (1 мкг/мл). Інкубування тривало 30 хв при  $37^{\circ}\text{C}$  у Thermomixer comfort. Реакцію зупиняли додаванням охолодженого фосфату натрію. Осаджали центрифугуванням. Аліквоти супернатанту переносили в сцинтиляційну рідину й аналізували в сцинтиляційному лічильнику Rackbeta. Результати представляли у вигляді значень радіоактивності та відповідної їм активності ферментів, виражених у вигляді вилученого із АТФ ортофосфату на 1 мг білка за 1 хв. Вивчення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази показало, що цей фермент не чутливий до дії коенової кислоти в її фізіологічних концентраціях: 1, 10, 50, 100 мкмоль/л. І лише при концентрації 250 мкмоль/л (тобто занадто великій для специфічної дії) ми спостерігали зміни активності АТФази.  $K_m$  і  $V_{max}$   $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази майже не змінювалися. З цієї причини припускаємо, що  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза не є мішенню дії коенової кислоти безпосередньо. Отже, виражений анальгетичний ефект коенової кислоти, який ми відмічали при її внутрішньоочеревинному введенні морфійзалежним шурам у стані абстинентного синдрому, і який пов'язаний з моделювальною дією на опіоїдні рецептори, не може бути пов'язаний з активацією кальцієвої АТФази і кальцієвими механізмами. В цьому механізм моделювальної дії коенової кислоти на опіоїдні рецептори несхожий з механізмами інших відомих модюляторів.

*Робота підтримана грантом Президента України на 2005 рік.***ВИВЧЕННЯ ДІЇ ЕПОКСИПОХІДНОГО 2',5'-ТРИОЛІГОАДЕНІЛАТУ НА КЛІТИНИ НЕЙРОБЛАСТОМИ ЛЮДИНИ IMR 32****О.М. Рожманова<sup>1</sup>, О.В. Долга<sup>1</sup>, Н.Х. Погорєла<sup>1</sup>,  
І.С.Магура<sup>1</sup>, З.Ю. Ткачук<sup>2</sup>, І.О. Михайлопуло<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;<sup>3</sup>Інститут біоорганічної хімії АН Беларусі, Мінськ  
malysheva@serv.biph.kiev.ua (О.М. Рожманова)

За останні роки досліджено низку регуляторних систем, які контролюють життєдіяльність клітин. Одна з них – система 2',5'-олігоаденілату (2–5А). Вона має широкий спектр біологічних функцій. Нині за-

гальмовизнано, що 2-5A є внутрішньоклітинним медіатором антивірусної дії інтерферону. Крім того 2-5A бере участь у регуляції росту, проліферації, диференціювання та апоптозу клітин. Дослідження останніх років показали, що синтезованим аналогом 2-5A притаманна висока біологічна активність. Вони мають антивірусні, антипроліферативні та імуносупресорні властивості. Це свідчить про перспективність пошуку нових лікарських препаратів серед цих сполук. Метою нашого дослідження було вивчення дії епоксипохідного 2',5'-триолігоаденілату (2',5'-ероху $A_3$ ) на клітини нейробластоми людини IMR 32, що культивували *in vitro*. Ця сполука нетоксична та стійка до дії клітинних фосфодіестераз. Клітини культивували при наявності 2',5'-ероху $A_3$  ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) протягом 22 год. Показано, що 2',5'-ероху $A_3$  гальмує їх ділення. Через 22 год кількість клітин зменшувалася на 20 % щодо контролю. Антипроліферативна дія 2',5'-ероху $A_3$  супроводжувалася змінами у транспорті іонів натрію, калію та кальцію. Активність  $Na^+$ ,  $K^+$ - та  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФаз після дії 2',5'-ероху $A_3$  зменшувалась удвічі у порівнянні з контролем. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що 2',5'-ероху $A_3$  впливає на проліферацію клітин IMR 32 і зробити припущення стосовно того, що синтезовані аналоги 2-5A можуть бути цінними сполуками для потенційного використання їх в медицині як антипухлинних препаратів.

### **ЗМІНИ АКТИВНОСТІ НАДН<sub>2</sub>-ЗАЛЕЖНОЇ МЕТГЕМОГЛОБІНРЕДУКТАЗИ У ГЕМОЛІЗАТІ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКЗОГЕННОГО ВВЕДЕННЯ L- АРГІНІНУ**

**Ю.М. Федевич, О.Я.Склярів**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Метаболічні ефекти NO реалізуються як на внутрішньоклітинному, так і на вищих, системних, рівнях організації багатоклітинних організмів. До цих ефектів належить і вплив NO на рівень забезпеченості тканин та органів киснем. Враховуючи те, що спорідненість NO до гемоглобіну у 8000 разів більша, ніж у  $O_2$ , оксид азоту при фізіологічних концентраціях робить свій внесок у формування киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну через утворення метгемоглобіну, S-нітрозогемоглобіну (SNO -Hb) і нітрозилгемоглобіну (HbFe $^{2+}$  NO). Метою наших досліджень було визначення впливу введення попередника оксиду азоту – L-аргініну в сумарній дозі 500 мг/кг за добу на активність НАДН<sub>2</sub>-залежної метгемоглобінредуктази, як інтегрального показника, який є зв'язуючою ланкою між системами гемоглобіну та оксиду азоту. Дослідження були проведені на безпородних щурах-самцях масою 250–300 г, які утримувалися на звичайному раціоні віварію. Дослідним тваринам внутрішньочервно вводили L-аргінін ("Curtis Healthcare", Польща) у дозі 250 мг/кг маси, двічі на добу через 6 год. Визначення активності метгемоглобінредуктази проводили на основі приросту вільного гемоглобіну, метгемоглобіну та оксиду азоту із застосуванням реактива Грісса. Введення L-аргініну призводило до підвищення вмісту метгемоглобіну ( $1,97 \pm 0,24$  щодо  $1,25 \% \pm 0,24 \%$ ) загального гемоглобіну. За цих умов в організмі відзначається підвищення вмісту  $NO_2^-$  до критичного рівня ( $5,21 \pm 0,30$ ) мкмоль/мл. На фоні посилення вільнорадикальних процесів, що індуковані введенням L-аргініну та утворенням надлишкових кількостей NO, знижується активність НАДН<sub>2</sub>-залежної метгемоглобінредуктази, яка підтримує відповідний пул відновленого гемоглобіну. Цей показник становить ( $0,44 \pm 0,035$ ) мкмоль  $\cdot$  хв $^{-1} \cdot$  г $^{-1}$ . Імовірно, відбувається uszkodження активного центру метгемоглобінредуктази сполуками вільнорадикальної природи, серед яких важливе місце належить пероксинітриту. Можливо, що зниження активності цього ензиму також пов'язане із порушенням синтезу НАДН<sub>2</sub>, що, у свою чергу, може лімітувати його активність. Очевидно як наслідок цих процесів спостерігається підвищення вмісту метгемоглобіну. Таким чином, введення L-аргініну призводить до підвищення концентрації оксиду азоту у крові, а також до збільшення вмісту метгемоглобіну в еритроцитах. Токсичні ефекти NO проявляються пошкодженням киснезв'язувальних властивостей гемоглобіну через зниження активності метгемоглобінредуктази, яка перешкоджає окисненню гемоглобіну та зниженню його киснетранспортної функції.

**ДОСЛІДЖЕННЯ КАТІОНСЕЛЕКТИВНОГО КАНАЛУ  
ВНУТРІШНЬОЇ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ Т-ЛІМФОЦИТІВ****О.А. Федоренко, С.М. Марченко**Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ  
elena.fedorenko@biph.kiev.ua

Наша робота присвячена дослідженню іонних каналів ядерної мембрани Т-лімфоцитів. Нині нема даних з біофізичних властивостей внутрішньоклітинних каналів, хоча транспортна система між цитоплазмою та каріоплазмою має велике значення для складної генетичної регуляції, яка відбувається в цих клітинах. Використовуючи метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patches у режимі фіксації потенціалу були досліджені іонні канали на внутрішній мембрані ізольованих ядер Т-лімфобластів людини лінії Jurkat (субклон JMR). Були зареєстровані канали двох типів, які відрізнялися за своєю провідністю, селективністю та кінетикою. Перший тип каналів мав провідність 370 пСм у симетричному розчині 150 ммоль/л КСІ і був проникним для іонів хлору. Другий канал за таких умов мав провідність 152 пСм та інактивувався при великих від'ємних потенціалах (-60 мВ і нижче). Більшість часу він перебував у відкритому стані та сильно флуктував. Цей канал характеризувався вхідним випрямленням. Дослідження провідності цього каналу показало, що він є проникним для іонів калію і натрію та непроникним для хлору. Незважаючи на велику кількість спроб, не вдалося зареєструвати іонні струми при додаванні у внутрішньопіпетковий та зовнішній розчини іонів кальцію. Це дало нам підставу вважати, що  $\text{Ca}^{2+}$ , імовірно, блокує ці канали. Таким чином, ми вперше зареєстрували катіонселективні канали на ядерній мембрані Т-лімфоцитів. Фізіологічне значення цього явища поки що не встановлено, але можна припустити, що ці канали відіграють важливу роль у підтримці іонного балансу між цитоплазмою і люменом ендоплазматичного ретикула та ядерною оболонкою клітини.

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ  
И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ПАРАМЕТРЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ  
В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ****Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк**

Выяснено, что угнетающее влияние налоксона на электрические процессы нервных клеток виноградной улитки прямо пропорционально зависит от величины кальциевого тока, протекающего через их мембрану. Салициловая кислота оказывает тормозное влияние на импульсную активность нейронов, а ее производные салицилаты кобальта (СК) и цинка (СЦ) противоположное ей – активационно-модулирующее. Под влиянием этих солей наблюдалось увеличение частоты импульсации и у некоторых нейронов возникали колебания мембранного потенциала (МП) и пачечный ритм генерации импульсов. Влияние этих солей на молчащие неидентифицированные нейроны проявлялось в появлении у них импульсной активности, которая, в большинстве случаев, сохранялась на протяжении всего времени экспозиции. Приложение СК и СЦ на изолированную клетку ППа1 обуславливало появление устойчивой пачечной активности. Показано, что эти соли являются экзогенными функциональными аналогами иницирующего фактора и механизм их влияния связан с увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ (возможно и цГМФ) и не зависит от входящего кальциевого тока. При внутриклеточной стимуляции 256 клеток висцерального ганглия (ВГ), в его центральной части обнаружен нейрон, который опосредованно угнетает электрическую активность клетки ППа1 и в так называемой зоне Е выявлен нейрон, моносинаптически возбуждающий клетку ППа2. Кроме того, среди тестированных 100 пар клеток ВГ найдены три пары синаптически связанных неидентифицированных нейронов, причем во всех случаях связь возбуждающая. Про-



веденное сравнение лабильности синаптических контактов показало, что наибольшей эффективностью характеризуется связь нейрона ВГ с клеткой ППа2. После обнаружения данных синаптических контактов мы провели исследование влияния вышеперечисленных веществ на процессы синаптической передачи. Обнаружено, что налоксон и салициловая кислота тормозят синаптические процессы, вызывая значительное увеличение латентного периода (ЛП) ответов постсинаптических клеток. Изменения ЛП при действии СК и СЦ находились в следующей зависимости: в случае отсутствия колебаний МП наблюдалось уменьшение ЛП, при наличии таковых флуктуаций на фоне деполаризации наблюдалось уменьшение ЛП, а при гиперполяризации, напротив, его увеличение.

## **НОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕЛИТТИНИНДУЦИРОВАННОГО ЛИЗИСА ЭРИТРОЦИТОВ**

**Н.В.Ширяев, В.В.Ширяев, А.М.Ефименко, А.В.Лузин**

Таврический национальный университет им.В.И.Вернадского, Симферополь  
pediatr@csmu.strace.net

Основной пептид пчелиного яда мелиттин обладает выраженным свойством лизировать клеточные мембраны, в том числе мембраны эритроцитов. Нами исследовалось влияние некоторых белков сыворотки крови на цитолитическую функцию мелиттина. Показано, что часовая преинкубация минимальных литических доз мелиттина с аутологичной сывороткой крови, разведенной в 30 раз в  $4,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л веронал-NaOH-буферном растворе (рН 7,4), содержащем (моль/л): NaCl – 0,15,  $MgCl_2$  –  $5 \cdot 10^{-4}$  и  $CaCl_2$  –  $1,5 \cdot 10^{-4}$ , полностью ингибировала лизис при последующем добавлении эритроцитов. Более того, даже добавление сыворотки через 15 мин после смешивания мелиттина и эритроцитов обладало небольшим ингибирующим действием, выраженным при концентрации мелиттина 0,8 и 1,0 мкг/мл. Данный ингибирующий эффект мы постарались приурочить к действию определённых белков сыворотки. Оказалось, что бычий сывороточный альбумин обладает выраженным ингибирующим эффектом (100 мкг/мл,  $P < 0,01$ ), в то время как для человеческих иммуноглобулина G и C1q ингибирующий эффект на мелиттининдуцированный лизис эритроцитов незначителен. Бычий сывороточный альбумин, добавленный к мелиттину за час до эритроцитов, вызывал почти полное ингибирование лизиса. Одновременно этот белок, добавленный через 15 мин после смешивания эритроцитов и мелиттина, оказывал, как и цельная сыворотка, небольшой ингибирующий эффект, обнаруживавшийся при концентрации мелиттина 0,8 и 1,0 мкг/мл. Важная информация о поведении бычьего сывороточного альбумина при мелиттининдуцированном лизисе эритроцитов была извлечена из опытов с «проинкубированными» эритроцитами, которые до использования в эксперименте хранились в веронал-NaOH-буферном растворе при  $+4^\circ C$  10–11 сут, но не демонстрировали после хранения значительного спонтанного лизиса. При добавлении белка через 15 мин после смешивания мелиттина и эритроцитов ингибирующий эффект альбумина при действии литических доз мелиттина сохранялся, однако для «проинкубированных» эритроцитов наблюдался выраженный активирующий эффект альбумина на утечку гемоглобина из эритроцитов при сублитических дозах мелиттина (0,2–0,4 мкг/мл,  $P < 0,01$ ). Данный результат позволяет заключить, что существует по меньшей мере два принципиально разных механизма действия мелиттина на эритроцитарную мембрану, на которые бычий сывороточный альбумин влияет противоположным образом.

**Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-ПРОТИТРАНСПОРТ В ЕРИТРОЦИТАХ  
ТА У  $\beta$ -КЛІТИНАХ ОСТРІВЦІВ ЛАНГЕРГАНСА ЛАБОРАТОРНОГО ЩУРА****А.В. Шкаволяк**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Мета роботи – зіставлення кінетичних показників Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-протитранспорту в еритроцитах та в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса лабораторного щура. Еритроцити одержували з крові, забір якої в гепаринізовані пробірки здійснювали з хвостової вени щура.  $\beta$ -клітини острівців Лангерганса виділяли методом Ласу, Kostianowsky (1967). В названих об'єктах виміряли стандартну активність ( $V_{std}$ ) та максимальну швидкість ( $V_{max}$ ) стимульованого позаклітинним Li<sup>+</sup> виходу іонів внутрішньоклітинного Na<sup>+</sup>. Константу спорідненості Міхаеліса до вмісту позаклітинного Na<sup>+</sup> ( $K_m(Na^+_o)$ ) визначали графічним методом. Обчислювали співвідношення  $V_{max}/K_m(Na^+_o)$ , а також з'ясували, чи істотною є різниця значень зазначених показників, виміряних в еритроцитах одних і тих самих дослідних тварин з інтервалом 7 діб. Встановлено, що інтеріндивідуальні відмінності показників, обстежених в еритроцитах в обидва часові періоди, знаходяться у вузьких межах. Що стосується залежності інтенсивності цього обміну від концентрації іонів внутрішньоклітинного Na<sup>+</sup>, то в даному дослідженні одержано докази, що характер транслокації вказаного іону з еритроцитів та з  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса є подібним. Однак для інших кінетичних показників Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-протиранспорту в зазначених об'єктах існують істотні відмінності. Зокрема, стандартна активність та максимальна швидкість Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-протитранспорту в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса виявилися на 54 та 40 % відповідно вищими, ніж такі в еритроцитах. Особливо великі відмінності зареєстровано з боку  $K_m(Na^+_o)$ , яка в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса є вдвічі нижчою порівняно з такою в еритроцитах, та співвідношення  $V_{max}/K_m(Na^+_o)$ , тоді як його значення в  $\beta$ -клітинах є втричі вищими, ніж в еритроцитах. Не виявлено кореляційного зв'язку між стандартною активністю та максимальною швидкістю цього обміну в еритроцитах, а в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса вказаний зв'язок має середній ступінь щільності.