

Про проведення конференції молодих учених “Механізми внутрішньоклітинної сигналізації” в рамках українсько-польського співробітництва

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ elena@biph.kiev.ua

13–14 грудня 2007 р. проведено міжнародну конференцію молодих учених Інституту фізіології та Ненські Інституту експериментальної фізіології (Варшава, Польща) “Механізми внутрішньоклітинної сигналізації”. Організатор конференції – рада молодих учених Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. В конференції взяли участь 24 молоді вчені, які представляли, крім зазначених інституцій, такі наукові установи, як Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Університет Амстердама (Нідерланди), а також Львівський національний університет. У конференції взяли участь співробітники лабораторій Ненські Інституту – лабораторія біоенергетики та біомембран (керівник проф. Єжі Дужинські), лабораторія внутрішньоклітинних іонних каналів (керівник проф. Адам Шевчик), лабораторії молекулярної нейробиології (керівник проф. Лешек Качмарек). Усі учасники представили усні доповіді, які були оцінені членами комісії. На відкритті конференції зі вступним словом виступив директор Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця академік П.Г. Костюк, який нагадав, що молодіжний форум є четвертою конференцією, котра проводиться в рамках співробітництва двох інститутів, перша була в 2001 р. у Сулейові (Польща), друга – в 2002 р. в Києві, третя зустріч відбулася у Варшаві в 2005 р. П.Г. Костюк також розповів про історію двох інститутів. Так Ненські Інститут експериментальної біології Польської академії наук названий на честь польського вченого Марселя Ненські (1847–1901), який спеціалізувався в галузі біохімічного окиснення, метаболізму сечовини, структури гемоглобіну, червоного пігменту крові. Ненські отримав ступінь доктора медицини в Берліні та згодом працював в Берні (Швейцарія), де став директором Інституту медичної хімії університету. Зараз цей інститут називається Інститутом біохімії та молекулярної біології. Цікаво, що в 1891 р. Ненські запросили організувати спільно із відомим російським фізіологом Іваном Павловичем Інститут експериментальної медицини у Санкт-Петербурзі, де він і провів свої останні 10 років життя. Ненські Інститут було засновано у 1918 р. завдяки пожертвуванню близького колеги Марселя Ненські. Нині інститут спеціалізується в галузі біохімії та нейробиології.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України було засновано у 1953 р. в результаті злиття Інституту експериментальної біології та патології та Інституту клінічної фізіології, які в свою чергу, засновані в 1931 та 1934 рр. відповідно за ініціативою академіка О.О. Богомольця (1906–1946), який на той час був директором обох інститутів. Головні наукові інтереси Олександра Богомольця були спрямовані на дослідження алергії, імунології, гіпоксії, онкології, ендокринології та геронтології. На основі досліджень, проведених під керівництвом О.О. Богомольця, було розвинуто такі напрями фізіології, як фізіологія сполучної тканини, переливання крові, реактивність організму. Ним було розроблено антиретиккулярну цитотоксичну сироватку (у багатьох країнах її називають сироваткою О.О.Богомольця) — ефективний засіб для стимуляції фізіологічної системи сполучної тканини тощо. Нині Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця спеціалізується в

галузі молекулярної фізіології, біофізики, нейрофізіології та патофізіології.

Переможцями конкурсу, на думку журі, стали Марта Воевода (Варшава) з доповіддю «Мітохондріальний стрес у клітинах остеосаркоми людини» (1-ше місце), Катаржина Хрома (Варшава) із доповіддю «АТФ-регульовані калієві канали в мітохондріях мозку – дослідження поодиноких каналів» (2-ге місце), Василь Нагібін (Київ) із доповіддю «Роль протеасомального протеолізу у розвитку різних механізмів смерті неонатальних кардіоміоцитів при моделюванні аноксії-реоксигенації» (3-тє місце). Також були відмічені доповіді Олени Федоренко (Київ) «Іонні канали ядерної оболонки та їхня можлива роль» і Миколи Маменка (Київ) «Кокультивування нейронів вузлуватих гангліїв з раковими клітинами послаблює пригнічувальний ефект опіоїдів на струми, опосередковані P2X₂/3 рецепторами».

На закритті молодіжної наукової конференції голова ради молодих учених Інституту фізіології (д.б.н. О.О.Лук'янець) надала звіт про роботу конференції і відзначила кращі доповіді, за результатами висновків журі. Директор Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця академік П.Г. Костюк підвів підсумок роботи конференції. Він відмітив, що більшість доповідей молодих учених свідчать про високий теоретичний, методичний, практичний рівень і комплексний підхід до багатьох сучасних проблем фізіології та патофізіології. Це дослідження, проведені на рівні функціонування поодиноких каналів органел клітини, таких, як ядро та мітохондрії. Істотну увагу було приділено питанням, пов'язаним із вивченням патологічних станів, а також розглянуті молекулярно-генетичні і біохімічні аспекти досліджень.

Конференція сприяла плідній роботі молодих українських і польських дослідників, реалізації їх творчого потенціалу та зародженню нових ідей, познайомила їх з актуальними науковими проблемами, сприяла встановленню нових зв'язків і можливостей для співпраці. Кращим доповідачам було вручено дипломи та пам'ятні подарунки. Переможців із Інституту фізіології, крім того, було нагороджено поїздкою до Варшави, яку вони зможуть здійснити у цьому році для відвідання Ненські Інституту експериментальної фізіології. В період роботи конференції для польських дослідників було організовано екскурсію по лабораторіям Інституту фізіології, а також по місту.

**Тези конференції для молодих учених
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця та Ненські Інституту
експериментальної фізіології «Ukrainian-Poland Conference for young scientists»**

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКТИВНЫХ И КОНСТРУКТИВНЫХ
ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИЙ В ТКАНЯХ ОРГАНИЗМА ПРИ ГИПОКСИИ**

Т.В. Болгова

Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев nnd@2004ukr.net

На сегодняшний день, исследованию структуры, функции и биогенеза митохондрий (МХ) посвящено много работ, благодаря относительно недавним открытиям роли этих органелл в клеточной сигнализации и биоэнергетике, оксидативном стрессе и термогенезе, старении и клеточной гибели, развитию ряда заболеваний и адаптации к гипоксии. Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению морфофункционального состояния МХ, органоспецифичность изменений их при гипоксии, как правило, не рассматривается. Такой подход, по нашему мнению является недостаточно обоснованным, поскольку известно, что воздействие повреждающих агентов на МХ тесно связано с нарушением таких процессов, как ПОЛ, действием мембранных фосфолипаз, изменением экспрессии ряда генов, координирующих работу митохондриального аппарата клеток. Исходя из этого, мы позволили себе предположить, что реакция МХ будет разли-

чаться как в зависимости от ткани, так и от типа гипоксии. Цель нашей работы заключалась в изучении ультраструктурных изменений МХ в ткани легких, миокарда, мышечной ткани и продолговатом мозгу при острой, интервальной и циркуляторной гипоксии. Мы сделали попытку показать органоспецифичность деструктивных и конструктивных изменений МХ, и различия таких изменений в зависимости от типа гипоксического воздействия. Результаты нашего исследования говорит о наличии выраженной органоспецифичности ультраструктурных изменений митохондриального аппарата клеток исследуемых тканей организма. Морфофункциональное состояние МХ зависит как от типа гипоксического воздействия, так и от его длительности. При гипоксии, помимо изменения ультраструктуры органелл происходит интенсификация их биогенеза, выраженность которой также обусловлена видом исследуемой ткани и типом воздействия.

**COMPARISON OF T-TYPE CHANNELS mRNA EXPRESSION LEVELS
IN THALAMUS OF WAG/Rij AND WISTAR RATS**

O.I. Boldyryev, V.E. Dosenko, Y.M. Shuba

International Center of Molecular Physiology, Kyiv; O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv alexey@biph.kiev.ua

In the WAG/Rij rat, a model for human absence epilepsy, spike-wave discharges (SWD) and absence epileptic behaviour develop after the age of 3 months but its genetic basis is still unknown. Although there is pharmacological evidence for the involvement of the T-type calci-

um channels in SWD generation in thalamo-cortical loop, no direct investigation of the thalamic nuclei, which demonstrate robust T-channel expression, has been carried out on this model. We hypothesize that a changed expression of $\alpha 1$ -subunits of one or more low-voltage

activated Ca^{2+} channel types in reticular thalamic nucleus (RTN) underlies the development of SWD. To test this hypothesis we compared 6-month-old WAG/Rij rats with nonepileptic, age-matched control Wistar rats by quantitative reverse-transcribed PCR. Level of $\text{Ca}_v3.3$ mRNA expression was 4–8-fold higher than $\text{Ca}_v3.1$ one in both control and epileptic animals confirming isolation of RTN region. The expres-

sion of all three subtypes was shown in both strains. $\text{Ca}_v3.1$ mRNA expression was 1.6-fold upregulated in WAG/Rij compared to control while $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$ mRNA levels showed no difference (both $n=7$). We suggest $\text{Ca}_v3.1$ gene may carry a polymorphism inside or there is some outer mechanism (transcriptional factors, spike activity etc.) which can alter its transcription in WAG/Rij model.

ALTERATION OF T-TYPE CALCIUM CHANNELS PROPERTIES IN SMALL DRG NEURONS OF DIABETIC RATS

A. Briede^{1,3}, E. Khomula², A. Borisyuk³, P. Belan³, N. Voitenko³

¹University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ²International Center for Molecular Physiology of NAS, Kyiv; ³O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv Andrea.Briede@student.nva.nl

One of the most frequent complications of *Diabetes Mellitus* is diabetic neuropathy. Patients experience a changed pain sensation like hypoalgesia, hyperalgesia and allodynia. The key mediators in nociceptive signaling are the low-voltage operated (T-type) calcium channels. Our hypothesis is that the calcium signaling is altered during diabetes and that this may cause diabetic neuropathy. We investigated properties of T-type calcium current in the small C-fiber DRG neurons. These neurons play a key role in thermal and mechanical nociception. It was shown in literature that the T-type calcium currents of mediate DRG-neurons are altered under diabetic condition, but the same calcium currents of the small DRG neurons were never examined before. The currents in these neurons are really small, but they cause a $[\text{Ca}^{2+}]$ elevation in the cell so they do play a role in the calcium signaling. We found that the T-type

current calcium current of the small DRG neuron was enhanced by L-cysteine and suppressed by 20 mM Ni^{2+} , thus supporting an idea that majority of this current was mediated by the $\text{Ca}_v3.2$ subtype. That is in good agreement with time constants of activation and inactivation of observed current. We found that under diabetic condition the voltage dependence of activation and the kinetics of the activation were not significantly changed, but there was a significant difference in the voltage dependence of inactivation. Neurons from rats with diabetic neuropathy showed that the steady state inactivation curve shifted on 7 mV to depolarization direction without changes in slope factor. T-type calcium channels impairments may contribute to the development of diabetic-induced sensory neuropathy.

Supported by the JDRF grant # 1-2004-30 and INTAS grant # 8061

MITOCHONDRIAL STRESS IN HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS

M. Wojewoda, J. Szczepanowska, J. Duszynski

Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland m.wojewoda@nencki.gov.pl

Mitochondria are involved in a variety of biological processes such as ATP synthesis, fatty acid oxidation, reactive oxygen species (ROS)

production and calcium homeostasis. Mitochondrial stress can lead to the significant deregulation of cellular physiology. In our experiments,

we have used three human osteosarcoma cell lines: WT human osteosarcoma, cybrid human osteosarcoma with 98% penetration of the mtDNA T8993G in *ATP6* gene (NARP) and human osteosarcoma lacking mtDNA (Rho0). We have observed changes in cellular redox state and basic calcium level in NARP and Rho0 cells. Both ROS and Ca^{2+} level within cells are involved in cell signaling and, especially, in signals from mitochondria to nucleus. Therefore, we have investigated biogenesis of mitochon-

dria and level of mitochondrial transcription factor A (TFAM) as well as level of calcineurin, which are changed in cells with chronic mitochondrial stress. ROS may induce stress responses by altering expression of specific nuclear genes. We have found significant changes in the expression of some antioxidative enzymes such as cytosolic superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) and thioredoxin reductase (TrxR1) which suggests involvement of ROS in mitochondrial-nuclear crosstalk.

DEVELOPMENT OF NEUROPATHIC COMPLICATIONS IN STZ-DIABETIC RATS

V. Viatchenko-Karpinski, N. Voitenko

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
viatchen@biph.kiev.ua

One of the main problems related to diabetes mellitus is development of diabetic complications, which are considered to be a direct manifestation of the disease. Neuropathic complications are among the most severe consequences of diabetes. There are many forms of diabetic peripheral sensory neuropathy – some patients have an increased sensation of pain, some of them can't feel pain at all. In particular, there could be development of hyper (increased) or hypo (decreased) sensation to heating. It was reported by Culcutt in 2004 that after shorter durations of diabetes rats showed transient thermal hyperalgesia after 4 weeks which progressed to thermal hypoalgesia after 8 weeks. We determined thermal sensitivity of rats by their reaction to hindpaw heating in plantar test by Hargreaves method. In our experimental condi-

tions we have found that experimental rats in 6-7 weeks after induction of diabetes by i.p. injection of streptozotocin (STZ, 80 mg/kg) reveal equally both thermal hyper- and hypoalgesia. After establishing of thermal abnormalities, we studied the influence of long-term treatment of diabetic rats with calcium-channels blocker nimodipine. Diabetic rats were treated with nimodipine (20 mg/kg with food) during 3 weeks. Nimodipine treatment decreased of amount of rats with hyperalgesia and increased amount of rats with hypoalgesia. At the same time, nimodipine treatment partially decreased parameters of thermal hypo- and hyperalgesia in diabetic rats. The novel findings of this report indicate that chronic nimodipine treatment can ameliorate the existing experimental neuropathy in diabetic rats.

Supported by the JDRF grant # 1-2004-30

MATRIX METALLOPROTEINASE-9 IN SYNAPTIC PLASTICITY: LTP AND NMDA RECEPTOR CURRENTS

T.Gorkiewicz^{1,2}, M.Balcerzyk¹, T.Wojtowicz³, P.Michaluk¹, J.W. Mozrzymas³, L.Kaczmarek¹

¹ Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland; ² Department of Biophysics, University of Life Sciences, Warsaw, Poland; ³ Department of Biophysic, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland t.gorkiewicz@nencki.gov.pl

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a zinc dependent endopeptidase that acts extracellu-

larly and can cleave components of extracellular matrix and modify extracellular environment. It

is induced in many brain structures, such as the hippocampus, prefrontal cortex and amygdala upon neuronal activation. It has been shown that MMP-9 is involved in maintenance of late phase of LTP in hippocampal CA3 to CA1 pathway as well as in the prefrontal cortex. Herein, we have examined if LTP is MMP-9-dependent in the pathway from basolateral to central amygdala and we have found that in slices from MMP-9 knock out mice the late phase of LTP is abolished. The same effect was obtained when inhibitor of MMP-9 was used in rat amygdala slices. A mechanism engaging MMP-9 in synaptic plasticity may involve MMP-9 activity directly on NMDA receptors, which are important for induction and stabilization of LTP. To determine the effect of MMP-9 on NMDA receptors we performed whole cell patch clamp recording from single cultured hip-

poampal cells. Using fast perfusion system we applied either recombinant MMP-9 (rMMP-9) or its specific inhibitor S24994 and investigated the properties of the NMDA receptor current. Application of MMP-9 inhibitor caused about 14% reduction of deactivation time that was fully reversible. Presence of rMMP-9 in Ringer solution affected the following properties of NMDA receptors current: (i) desensitization time that was reduced by about 28%; this action was irreversible. (ii) rise time that after application of rMMP-9 was also reduced (by ca. 30%), however, this effect was fully reversible. These results imply a functional interaction between MMP-9 and NMDA receptors, however the exact nature of this phenomenon remains unknown. Probably, MMP-9 does not cleave directly NMDA receptor subunits but rather acts on a yet to be identified signaling pathway.

ЕКЗОГЕННІ ПУРИНИ РЕГУЛЮЮТЬ ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ

Н.Я. Гричан¹, О.В. Копач², Н.В. Войтенко², Н.В. Федірко¹

¹Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка; ²Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, grychannatali@gmail.com

Функціонування ацинарних клітин слинних залоз перебуває під переважаючим парасимпатичним контролем, однак, наявні непрямі свідчення можливої участі екзогенних пуринів у модуляції секреції. Для з'ясування цього ми проводили рестрацію $[Ca^{2+}]_i$ у завантажених фура-2/АМ клітинах підщелепної слинної залози та аналіз показників слиновиділення в умовах *in vivo*. Нами показано, що сумісна аплікація да ацинарних клітин ацетилхоліну (АХ) та АТФ викликала $[Ca^{2+}]_i$ -транзйенти з амплітудою, яка достовірно не відрізнялась від амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів, індукованих тільки АХ. Проте за таких умов спостерігалось вірогідне збільшення напів-ширини $[Ca^{2+}]_i$ транзйентів. Раніше нами було показано, що активації P_1 рецепторів аденозином не супроводжується достовірними змінами $[Ca^{2+}]_i$ в ацинарних клітинах. Однак у цій роботі ми показали, що одночасна аплікація до ацинарних клітин АХ та аденозину ініціювала $[Ca^{2+}]_i$ -транзйенти з

амплітудою, достовірно більшою за таку, викликану тільки АХ. Одержані результати свідчать про здатність пуринів модулювати процеси $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації, викликані активацією холінорецептоів, що ймовірно може супроводжуватися змінами секреторної активності досліджуваних клітин. Для перевірки висловленого припущення ми провели аналіз показників слиновиділення *in vivo*. З'ясувалось, що внутрішньоочеревинне введення тваринам АТФ призводило до посилення секреції рідкого, електролітного та білкового компонентів слини. З іншого боку, внутрішньоочеревинне введення тваринам аденозину призводило до пригнічення секреції рідкої слини та збільшення її білкового компоненту. Крім того, за умов одночасного введення агоністів холіно- та P_2 -рецепторів (пілокарпін та АТФ відповідно) нами виявлено: 1) зменшення швидкості слиновиділення та концентрації Ca^{2+} у слині порівняно з ефектом тільки пілокарпін

та їх посилення порівняно з ефектом лише АТФ; 2) зменшення концентрації білка у слині порівняно до ефектів окремо АТФ та пілокарпіну. Одночасна активація P_1 - та холінорецепторів призводила до суттєвого зменшення швидкості слиновиділення та збільшення вмісту білка у слині. Таким чином, активація

P_1 -рецепторів призводила до посилення секреції слини збагаченої білковим компонентом та Ca^{2+} тоді як, активація P_2 -рецепторів – до посилення секреції рідинного компоненту. Отже, одержані у цій роботі результати дають змогу постулювати наявність нового механізму регуляції слиновиділення за участю пуринів.

ЕКСПРЕСІЯ СУБОДИНИЦЬ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА NIF В РІЗНИХ ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПРИ ГІПОКСІЇ

Т.І.Древицька, В.Є.Досенко, І.М.Маньковська

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Незважаючи на те, що процеси адаптації до різних типів гіпоксії розглядаються досить давно, нині залишається багато нез'ясованих питань щодо їх молекулярно-генетичних аспектів. NIF – димерний фактор транскрипції, який складається з двох субодиниць, α - та β -. Гени-мішені NIF регулюють широкий спектр таких клітинних процесів, як ангиогенез, ріст, диференціація, проліферація, енергетичний обмін, еритропоез, апоптоз тощо. В експериментах на дорослих щурах-самцях лінії Вістар визначали рівень експресії мРНК субодиниць NIF-1 α , NIF-1 β , NIF-2 α і NIF-3 α у легенях, серці, нирках і литковому м'язі за умов нормоксії, при гострій гіпоксії (дихання газовою сумішшю з 12 % O_2 протягом 2 год) та за умов інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ). ІГТ проводили за такою схемою: дихання 12 % O_2 в N_2 протягом 15 хв з 15-хвилинними нормоксичними інтервалами, 5 циклів щодня впродовж 2 тиж. Методи дослідження включали: виділення то-

тальної РНК, кількісну зворотну транскрипцію, полімеразну ланцюгову реакцію, програмний аналіз і статистичну обробку отриманих результатів. При гострій гіпоксії спостерігалася тенденція до збільшення експресії мРНК субодиниць NIF-2 α , експресія мРНК гена NIF-3 α вірогідно збільшилася в серці, легенях і нирках. Адаптація до гіпоксії супроводжувалася модуляторним впливом на експресію субодиниць NIF-3 α у відповідь на гостру гіпоксію. Після 14-добового ІГТ, рівень експресії мРНК цієї субодиниць вірогідно знижувався у легенях та серці. У тренуваних ІГТ щурів, яких піддавали впливу гострої гіпоксії протягом 2 год, спостерігалася значне зниження експресії мРНК NIF-3 α у серці, легенях і нирках на відміну від нетренуваних. Таким чином, розкрито деякі нові молекулярно-генетичні механізми регуляції кисневого гомеостазу та адаптації до нестачі кисню, які можуть бути використані як критерії стійкості організму до гіпоксії.

INVESTIGATION OF MECHANISMS OF CARDIOPROTECTION EFFECTS OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

О.Е. Kyrylenko, А.М. Shysh., О.О. Moybenko

О.О. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
kirilenko@list.ru

The purpose of this work was to investigate the cardioprotection effects omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), phospholipids membrane modification by omega-3 PUFA on the worked

heart under ischemia, lipid peroxidation (LPO) and nitric oxide (NO) production in experimental and clinical studies. It was shown, that addition of omega-3 PUFAs to the diet decreased

omega-6 PUFAs in plasma lipids and erythrocyte membranes in patients with ischemic heart disease (IHD). In clinical studies was shown the improvement myocardial contractility, increased fractions of emission, decrease of extrasystols quantity. At the patients the decrease fractions of atherogenic lipids, normalization of parameters of curtailing of blood was marked. These data were confirmed in experimental researches. It was content with subsequent reduction of TxB_2 and LTC_4 production and also increased omega-3 PUFAs content in cardiac rats tissue. Supplement of omega-3 PUFAs decreased frequency of reperfusion-induced myocardial arrhythmias in this group (in 5,4-fold). The time of myocardial function recovery after ischemia (heart rate, left ven-

tricular development pressure), was shorter compare to control group. Also in this group end-diastolic pressure and coronary vessels resistance during reperfusion were lower. Besides that it was shown that pre-treatment with omega-3 PUFA attenuated LPO, strengthened activity of antioxidant enzymes during reperfusion. It was established that membrane phospholipids modification with omega-3 PUFA raised cNOS activity, reduced iNOS activity, in conditions of ischemia-reperfusion compare to control. Our data suggest that omega-3 PUFA have cardioprotective effects in IHD patients and experimental researches: normalization of lipid metabolism, parameters of curtailing of blood, limited LPO, decreased arachidonic acid metabolites and enhances NO generation.

FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF A COLD RECEPTOR IN RAT PROSTATE

A. Kondratskyi, G. Sotkis, O. Boldyrev, K. Kondratska, O. Lyubanova, Y. Shuba

International Center of Molecular Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
artikon@biph.kiev.ua

The member of Transient Receptor Potential (TRP) channel family, TRPM8, has been shown to function as a cold receptor in sensory neurons. Interesting, that aside from sensory neurons TRPM8 channel is also abundantly expressed in prostate - the tissue, which is not subjected to any significant temperature variations. Whereas there are many evidences suggesting the expression and functions of TRPM8 in cancerous human prostate, little is known about this channel in the normal rat prostate. Here we identified a cold- and menthol-activated current in rat prostate epithelial cells on functional level. We showed that sudden decrease of the bath temperature from 33° C to 21° C elicited a rapidly de-

veloping, outwardly rectifying membrane current in freshly isolated rat prostate epithelial cells. Application of chemical analog of cooling, menthol (100 microM), evoked similar responses at room temperature. Both cooling- and menthol-activated currents could be inhibited by heating. Also we have found that cold- and menthol-activated currents are present only in luminal secretory epithelial cells of the rat prostate, whereas basal epithelial cells were not responsive. Our results are the first ones demonstrating functional existence of cold/menthol-sensitive TRPM8 channel in the plasma membrane of normal prostate epithelial cells and its restriction to the luminal secretory cell phenotype.

CAPACITATIVE CALCIUM ENTRY INDUCED BY ACTIVATION OF RYANODINE RECEPTORS OF ENDOPLASMIC RETICULUM IN RAT DRG NEURONS

S. V. Korol, T. Yu. Korol, O. P. Kostyuk, P. G. Kostyuk

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
serzhking@gmail.com

Characteristics of calcium channels activated by depletion of endoplasmic reticulum ryanodine-

sensitive calcium stores were studied in acute isolated dorsal root ganglion (DRG) neurons by

means of patch clamp technique in the whole cell modification. Current-voltage relation of such store-operated calcium channels that provide capacitatively calcium entry was obtained as difference between integral one of all calcium channels of the cell after caffeine application and whole cell current-voltage dependence of voltage-gated calcium channels obtained in control conditions. Store-operated calcium currents could be induced by series of hyperpolarizing

pulses at replacing of calcium free caffeine-containing solution by caffeine free saline with calcium 2 mM. Thus, it was established that there is one else calcium entry mechanism besides voltage-operated and receptor-dependent ones in DRG neurons. It was concluded that capacitatively calcium entry induced by depletion of ryanodine-sensitive intracellular stores is one of the constituents of calcium signaling in DRG neurons.

РОЗВИТОК РЕАКТИВНОГО АСТРОГЛІОЗУ В ГІПОКАМПІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

Ю.В. Лебідь, М.О. Орловський, Г.О. Ушакова, Г.Г. Скібо

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ lebed@biph.kiev.ua

У наших попередніх дослідженнях встановлено, що протягом перших 14 діб розвитку цукрового діабету виникають ознаки ушкодження гіпокампа: відбувається зменшення кількості нейронів і конденсація хроматину в них. Оскільки нейрони гіпокампа мають тісні функціональні та структурні зв'язки з астроцитами, пошкодження нейронів супроводжуються змінами стану астроцитів. Виходячи з того, що стан астроцитів у ранній період цукрового діабету майже не вивчався, метою нашої роботи було з'ясування змін вмісту специфічного гліального маркера GFAP у гіпокампі щурів протягом перших двох тижнів розвитку експериментального (стрептозотозинного) цукрового діабету. Вміст GFAP у гіпокампі вивчали імуоферментним методом; кількість астроцитів, їх площу та загальну площу GFAP-позитивного матеріалу оцінювали за допомогою мікроскопії імуногістохімічно забарвлених зрізів гіпокампа на 3, 7 та 14-ту

добу діабету. Було встановлено, що в перші три доби вірогідно зниження вмісту GFAP в гіпокампі (з $6,77 \pm 0,36$ до $3,50$ мгк/мл $\pm 0,43$ мгк/мл) через зменшення числа астроцитів та їх площі. Надалі відмічалось збільшення кількості астроцитів. На 7-му добу розвитку діабету цей показник сягав рівня вищого за контрольний у всіх зонах гіпокампа. З 7-ї по 14-ту добу кількість GFAP-позитивних клітин в СА2 та СА3 зоні не змінювалась, однак їх площа вірогідно збільшувалася на 42,4 та 42,9% відповідно. Отримані результати свідчать про те, що протягом перших трьох діб стрептозотозинного діабету зменшується кількість астроцитів, проте, після 7-ї доби вони збільшуються ймовірно внаслідок їх проліферації та міграції з інших зон мозку. Значне збільшення кількості астроцитів, вмісту GFAP і площі клітин з 7-ї доби діабету свідчать про розвиток реактивного астрогліозу, що формується поряд з пошкодженням і загибеллю нейронів гіпокампа.

КОКУЛЬТИВУВАННЯ НЕЙРОНІВ ВУЗЛУВАТИХ ГАНГЛІЇВ З РАКОВИМИ КЛІТИНАМИ ПОСЛАБЛЮЄ ПРИГНІЧУВАЛЬНИЙ ЕФЕКТ ОПОЇДІВ НА СТРУМИ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ $P2X_{2/3}$ -РЕЦЕПТОРАМИ

М.В. Маменко, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, О.О. Кришталь

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ manivic@ukr.net

У нейронах вузлуватих гангліїв експресуються $P2X_3$ -рецептори з швидкою кінетикою десен-

ситизації та рецептори з повільною кінетикою десенситизації ($P2X_{2/3}$ та $P2X_2$ -рецептори).

Експерименти, які проводилися в галузі дослідження болю протягом останніх років, засвідчують, що рецептори, до складу яких входять $P2X_3$ -субодиниці, залучені до сприйняття та передачі ноціцептивних сигналів. Опіюїдні рецептори, у свою чергу, широко розповсюджені у різних структурах центральної та периферичної нервової системи та утворюють головну внутрішню знеболювальну систему. Велика кількість даних свідчить про те, що знеболювальні ефекти опіюїдів можуть опосередковуватись як центральними, так і периферичними механізмами. Зокрема, повідомлялося, що опіюїдні та $P2X_{2/3}$ -рецептори сенсорних нейронів щурів функціонально взаємопов'язані. Агоністи μ -опіюїдних рецепторів пригнічують струми, опосередковані $P2X_{2/3}$ -рецепторами, на 50 %. Струми, опосередковані $P2X_{2/3}$ -рецепторами, пригнічуються опіюїдами через G-білок спряжені механізми. З іншого боку, відомо, що перебіг онкологічних захворювань супроводжується розвитком больових станів, нечутливих до опіюїдної терапії. Механізми, що опосередковують такий нечутливий до опіюїдів біль, залишаються нез'ясованими. Тому вплив селективного

агоніста m-опіюїдних рецепторів ендоморфіну-1 на $P2X_{2/3}$ -рецептори нейронів вузлуватих гангліїв досліджувався після кокультивації з раковими клітинами (NCTC 2472) за відсутності прямого фізичного контакту. Після 2-3 діб кокультивації пригнічення АТФ-індукованих струмів опіюїдним лігандом залежало від кінетики десенситизації струму. Чим «повільнішою» була відповідь нейрона на прикладання АТФ, тим менше проявлявся пригнічувальний вплив ендоморфіну-1. Частка клітин з «повільними» АТФ-активованими струмами також збільшувалася під час кокультивації. Вона становила 71% після 4-5 днів кокультивації порівняно з 44 % у контролі (культивування без ракових клітин). Кокультивація нейронів вузлуватих гангліїв з фібробластами не призводила до змін у регуляції $P2X_{2/3}$ -опосередкованих струмів опіюїдами, як це відбувалося у разі кокультивування з раковими клітинами. Таким чином, ракові клітини, на відміну від фібробластів, здатні змінювати характеристики струмів, опосередкованих $P2X_{2/3}$ -рецепторами. Зокрема, суттєво зменшується регуляція АТФ-активованих струмів з повільною кінетикою десенситизації ендоморфіном-1.

THE ROLE OF THE PROTEASOMAL PROTEOLYSIS IN DEVELOPMENT OF DIFFERENT MECHANISMS OF RAT NEONATAL CARDIOMYOCYTES DEATH AT MODELING OF ANOXIA-REOXYGENATION

V.S. Nagibin, V.E. Dosenko, L.V. Tumanovska, O.O. Moybenko

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
nvasya@ukr.net

This work is dedicated to the study of rat neonatal cardiomyocytes death in culture at modeling of anoxia-reoxygenation. It was shown that not only necrotic cell death but also some types of programmed cell death (as apoptosis and autophagic cell death) occur in cardiomyocytes culture at anoxia-reoxygenation modeling. We first showed that all types of proteolytic activities of proteasome (trypsin-like, chymotrypsin-like and postglutamyl peptide hydrolase) are decreased at anoxia and not completely restored at reoxygenation. The use of proteasomal inhibitors on primary rat neonatal cardiomyocytes culture (clasto lactacystin, 5 μ M and MG-132, 10 μ M) leads

to the development of apoptotic and autophagic cell death programs. So we can make a conclusion that inhibition of proteasomal proteolysis during anoxia-reoxygenation may lead to the development of apoptotic and autophagic cell death. When the inhibitors of programmed types of cell death were used (inhibitor of caspase-3 (DEVD) to prevent apoptotic cell death and N3-methyladenine to prevent autophagic one) during modeling of anoxia-reoxygenation or at application of proteasomal inhibitors, the number of necrotic cardiomyocytes was significantly increased. For example at application of DEVD and N3-methyladenine in combination during clasto

lactacystin action the necrotic cardiomyocytes number was increased in 13.4 times ($P < 0.001$). So the trying to decrease general myocardium injury by preventing of pro-

grammed types of cell death leads to the dramatic increase in the number of necrotic cardiomyocytes and is not perspective way in cardioprotection.

INFLUENCE OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC FIELDS OF A MICROWAVE RANGE ON PHARMACOLOGICAL ANALGESIA AT MICE

O.M. Nesin, O.V. Gura, Iu.P. Lymans'kyi

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
gonchar@biph.kiev.ua

Nowadays pharmacological preparations (analgesic remedies) are considered as the main tools against pain in medical practice. However along with medical action they often cause undesirable side effects. Considering this the non-pharmacological methods of analgesia are widely used lately, among them the influence of low-intensity electromagnetic fields of a microwave range. Aim of investigation: Studying of an effect of the combined using of analgesics (analgin and tramadol) and the low-intensity microwaves for suppression of the somatic and visceral pain at mice. On the model of formalin (5% formalin, 25 μ l s.c.) and writhing (2% acetic acid, 80 μ l, i.p.) tests development of pain behavioral reaction at mice after isolated, and also the combined application pharmacological analgesics (analgin and tramadol) and microwaves, applied on antinociceptive acupuncture points (AP) E-36 was investigated. It is shown, that the

influence of microwaves (30-300 GHz, $3 \cdot 10^{-9}$ W/ sm^2) on the antinociceptive AP E-36 decreased duration of the pain response caused by irritation of somatic ($p < 0.05$) and visceral ($p < 0.01$) nociceptors that testifies about antinociceptive action of the microwave irradiation, applied on antinociceptive AP. For the first time it is shown, that at the combined application of half of average single doses analgesics (analgin or tramadol) and microwaves irradiation of AP E-36, antinociceptive effect has been approached to that effect after isolated application of total average single doses of the above mentioned preparations or exceeded such effect. Thus, application of low-intensity microwaves, applied on the antinociceptive AP, enables to lower appreciably doses analgesic remedies, achieving thus of an optimum level of analgesia, and, accordingly to reduce side effects, which accompany with action of pharmacological remedies.

ВПЛИВ ПОЛІПЕПТИДНОГО КОМПОНЕНТА LSP315 ОТРУТИ ПАВУКА LYCSA НА P2X3 РЕЦЕПТОРИ DRG НЕЙРОНІВ ЩУРІВ

Г.А. Савченко, Я.А. Бойчук, О.О. Кришталь

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv
bo@biph.kiev.ua

У проекті пошуку модуляторів передачі болювих імпульсів серед пептидів токсину павука *Lycosa* виявлено пептид *lsp315*, що селективно впливає на струми, опосередковані P2X3-рецептороканалними комплексами на DRG нейронах щурів. Активність пептиду досліджували за допомогою конвенційного

методу patch-clamp. Пригнічення струму через P2X3-рецепторо-каналні комплекси відбувається при дії *lsp315* на рецептор у десенситизованому стані. Пригнічення є зворотним. У разі значного впливу на амплітуду струму *lsp315* не змінює деактиваційну кінетику залишкового струму. IC50 пептиду становить

12,5 нмоль/л. Величина модулюючого ефекту пептиду не залежить від типу застосованого агоніста (АТФ чи ЦТФ). При дії lsp315 на закритий стан рецепторо-рецепторокомплексного канального комплексу P2X3 у 19 % випадків

спостерігався незначний потенціальний ефект, сила якого варіювала у межах від 7 до 40 %. lsp315 є потенційним агентом для досліджень структурно-функціональних властивостей P2X3-рецепторів.

РОЛЬ СИНАПТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В СЕКРЕЦИИ ХРОМАФИННЫХ КЛЕТОК

А.В. Садовый², О.М. Починюк¹, О.Л. Заика², Е.А. Лукьянец^{1,2}

¹Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев; ²Междунар. центр молек. физиологии НАН Украины, Киев sadoviy@biph.kiev.ua

В работе исследовалось влияние таких синаптических белков, как синаптотагмин, Munc-13 и Munc-18 на кинетические свойства секреции в хромаффинных клетках крысы, используя специфические антитела для каждого белка, которые вводились в клетку в ходе эксперимента. Объектом исследований служили хромаффинные клетки, полученные из надпочечников крыс-самок линии Вистар. Для исследований использовали микрофлуоресцентный и амперометрический методы, а также специфические к каждому белку антитела: анти-STG, анти-Munc-13-1, анти-Munc-13-3 и анти-Munc-18. Одновременно в клетку вводили флуорисцирующий краситель декстран-FITC для контроля попадания антитела во внутрь клетки. Процесс экзоцитоза инициировался двумя путями: 1) активацией потенциалзависимых кальциевых каналов, путем аппликации гиперкалиевого раствора (50 ммоль/л), 2) активацией ацетилхолиновых рецепторов путем аппликации ацетилхолина (1 ммоль/л). Инъекция всех антител приводила к снижению частоты появления секреторных пиков регистрируемых карбоновыми микроэлектродом. Наиболее существенно этот эф-

фект наблюдался при введении анти-STG во внутриклеточное пространство. Влияние анти-Munc-18 приводило к замедлению кинетических характеристик секреторных пиков, возможно из-за незначительного сужения фузийной поры. Кроме того, при действии анти-Munc-18 наблюдалось разделение клеток по значению снижения частоты секреторных событий на две субпопуляции. В первой совокупности клеток, после инъекции анти-Munc-18 наблюдалось большее снижение вероятности появления секреторных пиков (~71%), тогда как во второй группе, наблюдался намного меньший уровень этого значения (~12%). При введении во внутриклеточную среду специфических антител к Munc-13, наблюдалось довольно существенное снижение частоты секреторных появлений. При введении анти-Munc-13-1 подавление секреторных пиков было более выражено, чем при воздействии на клетку анти-Munc-13-3. Временные характеристики оставались неизменными в обоих случаях. Нами было сделано заключение, что все исследуемые синаптические белки принимают активное участие в секреторных процессах хромаффинных клеток надпочечника.

CHANGES IN CA²⁺-PERMEABILITY OF AMPA RECEPTORS OF DORSAL HORN NEURONS AFTER PERIPHERAL INFLAMMATION

A. Sotnik¹, O. Kopach¹, J. Galik² and N.Voitenko¹

¹O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv; ²Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Science, Kosice, Slovak Republic sotnic@biph.kiev.ua

Spinal dorsal horn (DH) neurons express both Ca²⁺-permeable (GluR2-lacking) and Ca²⁺-im-

permeable (GluR2-containing) AMPARs. Targeted disruption of the GluR2 gene not only pro-

duces an increase in the number of spinal Ca^{2+} -permeable AMPARs, but also facilitates spinal nociceptive plasticity and enhances long-term inflammatory hyperalgesia, suggesting that changes in AMPAR properties including the increased AMPAR Ca^{2+} -permeability due to GluR2 loss on synaptic membrane in dorsal horn neurons might play a critical role in spinal central sensitization underlying chronic pain. However, how spinal AMPA receptors exert their functions in persistent pain is unclear. Here, we showed that peripheral injection of Complete Freund's adjuvant (CFA) into a hind paw increased the number of cobalt-positive neurons in the ipsilateral dorsal horn at 24 h post-CFA compared to that at 24 h post-saline. Moreover, CFA injection produced facilitation of AMPA

receptor-mediated currents and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in the substantia gelatinosa neurons of spinal cord at 24 h post-CFA, induced by bath application of AMPA. Finally, CFA-induced inflammation increases inward rectification index values of AMPAR-mediated excitatory postsynaptic currents. These findings indicate that peripheral inflammation might cause a switch of Ca^{2+} -impermeable AMPA receptors expressed on many spinal dorsal horn neurons into Ca^{2+} -permeable AMPA receptors. As spinal cord Ca^{2+} -permeable AMPA receptors are critical for the induction of enhanced pain responses, our results might explore a novel mechanism underlying the development and maintenance of chronic pain.

Supported by the JDRF grant # 1-2004-30 and INTAS grant # 8061

THE PARTICIPATION OF PLASMA MEMBRANE STRUCTURES AND INTRACELLULAR CALCIUM STORES IN THE FORMATION OF INTRACELLULAR CALCIUM SIGNALS IN SENSORY NEURONS

I.V. Stepanova

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv
inna@biph.kiev.ua

Increase in intracellular concentration of free calcium ions in cytosol is a universal signal, regulating a wide spectrum of cellular functions. There are two major ways of increasing Ca^{2+} concentration in cell cytosol. The first one is linked with calcium influx from the extracellular medium, and the second one – with the release of these ions from intracellular calcium stores. In nerve cells Ca^{2+} influx is accompanied by the activation of voltage-gated and/or receptor-operated ion channels in the plasma membrane, permeable for Ca^{2+} . In our work an attempt to analyze the mutual contribution of mitochondria and ER to the formation of intracellular calcium signals has been made, as well as to elucidate possible connection between the degree of ER Ca^{2+} capacity and activation of additional Ca^{2+} influx site from the extracellular medium into cytosol as well as the mitochondrial influence to such store-activated signals has been made in rat nociceptive primary sensory neurons. Such Ca^{2+} entry into cytosol of neurons induced by depletion of intracellular

calcium stores (so called store-regulated Ca^{2+} entry, SOCE) was for a long time considered to be a mechanism necessary for providing the increase in intracellular Ca^{2+} concentration exclusively in nonexcitable cells. Changes in intracellular Ca^{2+} induced by the depletion of endoplasmic reticulum (ER) by different mechanisms were studied in isolated rat nociceptive dorsal root ganglia neurons using indo-1 fluorescent technique. Amplitude and kinetic characteristics of CCE induced by active or passive depletion of ER were analyzed. The first type of depletion achieved by direct stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) or ryanodine receptors (RyRs) of endoplasmic reticulum. Passive depletion of ER was due to suppression of Ca^{2+} uptake by endoplasmic reticulum calcium ATPases inhibitor thapsigargin. Different mechanisms of ER depletion induced SOCE transients, which differ from each other by main parameters. These facts allow us to suggest different activation mechanisms of such CCE signals. Application of mitochondrial protonophore

CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) changed the kinetics of CCE transients de-

cay, so we suggested the participation of mitochondria in CCE signaling.

IONIC CHANNELS OF THE NUCLEAR ENVELOPE AND THEIR POSSIBLE ROLE

O.A. Fedorenko, D.E. Duzhyy, S.M. Marchenko

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
fea80@ukr.net

In eukaryotic cells chromosomes are isolated from the cytoplasm by the nuclear envelope pieced by numerous nuclear. Besides a number of ionic channels were found in the nuclear membranes, but their functions remained mainly unexplored. In our work we have investigated ion channels in the membranes of nuclei isolated from cerebellar Purkinje neurons, pyramidal neurons of CA1 region and granule neurons of the dentate gyrus of the hippocampus and Jurkat-cells. Our experiments revealed variety of spontaneously active ionnic channels in the NE membranes. Different types of cells express different sets of ion channels in their nuclear membranes. But some of the channels share similar properties and we tried to classify them on the basis of their biphysical properties. As a result we have got three types of spontaneously active nuclear ionic channels: large conductance cationic channels (LCCC), CIC channels, other chloride channels. The physiological role of these ionic nuclear channels is not clear, but

they may be important for the ion balance between the cytoplasm and the lumen of the nuclear envelope. Inositoltrisphosphate receptors were found in the inner nuclear membrane of pyramidal neurons from CA1 region of the hippocampus and cerebellar Purkinje neurons. So the nuclear envelope of these cells can function as Ca^{2+} store. We were unable to record inositoltrisphosphate or ryanodine receptors in the nuclear membranes of granular neurons of the dentate gyrus. We suppose that different mechanisms of Ca^{2+} regulation take place in these cells. Channel activity of the IP_3 -receptors was voltage-dependent. The probability of the open state of InsP_3Rs was much higher at positive potentials and decreased at negative potentials. The similar voltage-dependence of activity was demonstrated by LCCC. That is why we hypotised that IP_3Rs and LCCC can form the minimal system for the functioning of the NE as the Ca store. We suggest that these two types of ion channels take part in the regulation of the Ca^{2+} signal in the nucleus.

ATP REGULATED POTASSIUM CHANNEL IN BRAIN MITOCHONDRIA – SINGLE CHANNEL STUDIES

K.Choma^{1,2}, P.Bednarczyk^{1,2}, K.Dolowy¹, A.Szewczyk²

¹Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences SGGW, Warsaw, Poland; ²Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland k.choma@nencki.gov.pl

Various types of ion channels are presented in mitochondria. It was proved that mitochondrial ATP-regulated potassium channel (mitoK_{ATP}) and mitochondrial Ca-activated big conductance potassium channel (mitoBK_{Ca}) are involved in cytoprotection but the mechanism of this is still unknown. In our study we used Black Lipid Membrane Technique which allows measure single channel activities. The submitochondrial particles isolated from inner mitochondrial membrane

from rat brain were incorporated into artificial planar lipid bilayer and after reconstitution single channel activity was measured. The potassium channel with a mean conductance of 219 ± 15 pS in symmetrical 450/450 mM KCl (cis/trans) solution was recorded. We examined effect of different channels modulators on channel activity. The potassium channel is inhibited by complex ATP/Mg^{2+} and this effect is reversed by BMS 191095 but with reduced amplitude. Amplitude

decrease is caused by magnesium ions. Magnesium ions change channel activity only after addition to the trans compartment in our experimental conditions. Inhibitor of mitoBK_{Ca} channel – iberiotoxin IbTx and inhibitor of mitochondrial voltage gated potassium channel (mitoKv1.3) – margatoxin MrTx

have no effect on channel activity. Surprisingly, inhibitor of mitoK_{ATP} channels – 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) does not change channel activity. We identified mitochondrial potassium channel ATP – regulated (mito K_{ATP}) from rat brain mitochondria which is insensitive to 5 – HD.

ALTERATIONS IN CALCIUM SIGNALING MEDIATED BY T-TYPE CALCIUM CHANNELS AND VANILLOID RECEPTOR 1 (VR1) IN DORSAL ROOT GANGLION (DRG) NEURONS OF DIABETIC RATS

E.Khomula¹, A. Briede^{2,3}, A. Borisjuk³, V. Viatchenko-Karpinski³, P. Belan³, N.Voitenko³

¹International Center for Molecular Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²University of Amsterdam, The Netherlands; ³O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv eugen_kh@biph.kiev.ua

Previous contributions of our laboratory have demonstrated changes of intracellular calcium signaling in nociceptive neurons of rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes. Here, on the same model, we have studied diabetes-induced changes in T-type calcium and capsaicin-induced currents as well as in cytosolic Ca²⁺ transients ([Ca²⁺]_i) evoked by corresponding currents in small IB4-positive capsaicin sensitive DRG neurons (nociceptors). Also we have investigated differences between changes observed in neurons of diabetic rats with thermal hypoalgesia and in neurons of diabetic rats with thermal hyperalgesia. Young (8-9 weeks) diabetic male rats (4-6 weeks after induction of STZ-diabetes) and age-matched control animals were taken for the experiments. Diabetic rats were divided in two groups, hyper- and hypoalgesic, based on results of plantar test. After isolation, L4-L6 small IB4-positive capsaicin sensitive DRG neurons were voltage-clamped and loaded with a calcium dye, Fura-2, via a patch pipette. [Ca²⁺]_i transients were recorded simultaneously with currents. Activation of VR

1 was performed by bath application of capsaicin. We have found that in small nociceptive DRG neurons peak current density of T-type calcium current was significantly enhanced in both hypoalgesic and hyperalgesic diabetic rats. Amplitudes of [Ca²⁺]_i transients were also enhanced in neurons of diabetic rats regardless of form of the neuropathy. VR1 current density as well as amplitudes of [Ca²⁺]_i transients was decreased in neurons of hypoalgesic rats. The same responses were increased in neurons of rats from the hyperalgesic group. Thus, we have found that diabetes induced significant changes in calcium signaling mediated by T-type calcium current and VR1 in small IB4-positive DRG neurons. Observed changes were distinct in different forms of diabetic neuropathy. We assume that specific alterations in calcium signaling mediated by T-type calcium channels and VR1 in DRG neurons contribute to the development of diabetes-induced thermal hypo- and hyperalgesia.

Supported by the JDRF grant # 1-2004-30 and INTAS grant # 8061

AMPA RECEPTOR-DEPENDENT HIPPOCALCIN TRANSLOCATIONS

V. P. Cherkas

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
cherkas@biph.kiev.ua

Hippocalcin (HPCA) is a Ca²⁺-binding protein, which belongs to the family of neuronal Ca²⁺ sen-

sors. It has been shown that Ca²⁺-dependent HPCA activation in hippocampal neurons is one of the

necessary steps involved in expression of NMDA receptor dependent long-term depression and in production of a slow afterhyperpolarization. At the same time molecular and biophysical mechanisms underlying its action in these neurons have not been investigated yet. In this work using Yellow Fluorescent Protein-tagged Hippocalcin (HPCA-YFP) we have studied if and how free calcium concentration changes evoked by AMPA receptor activation can be decoded by HPCA translocations. Local applications of glutamate to an apical dendrite of hippocampal neurons in conditions when only the AMPA type of ionotropic glutamate receptors can be activated result-

ed in a fast (rise time of 1-2 s), reversible, synchronous and reproducible HPCA translocations to the same set of sites on the dendritic tree. The translocation transients induced by AMPAR activation was mainly due to indirect action of glutamate resulting in AMPA receptor-dependent depolarization, following voltage operating calcium channels activation and $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Analogous results were obtained when an agonist of AMPA receptors, AMPA, was iontophoretically applied. Thus, we conclude that HPCA, by means of AMPAR activation, possesses the ability to conduct information processing in parallel in many sites within a neuron.

AN EFFECT OF MITOCHONDRIAL IONOPHORE CCCP ON IMPULSE ACTIVITY OF ISOLATED CA1 HIPPOCAMPAL NEURONS

V.A.Yavorsky, E.A. Lukyanetz

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv
jva@biph.kiev.ua

The protonophore CCCP is widely used substance to explore intracellular calcium regulation due to its property to switch off the mitochondrial potential and block calcium uptake by mitochondria. Switching off the mitochondria located near the surface may change the external impulse properties of excitable cell. We have studied an activity of isolated CA1 hippocampal neurons from Wistar rats using perforated patch-clamp method in current clamp mode by two protocols: a) repetitive depolarization pulses with the same amplitude. The estimation of impulse activity was calculated as interspike intervals (ISI) set in correspondence to spike number from the beginning of current pulse. Averaging of these data over multiple (12) protocols gives mean ISI characteristic showing the repetitive activity of neuron and his accommodative properties; b) ramp protocol with slow rising from -30 pA to +50 pA during 10 sec, where neurons may demonstrate endogenous spiking activity. We found that administration of CCCP rapidly blocked the repetitive and endogenous spike activity of isolated neurons in less than half of minute. Besides, the first evoked action potential still was present thus proving cells possibility to generate the potentials. The minimal concentrations of CCCP

blocking the cell activity varied over cells and ranged from 50 to 200 nM. The effect might be partly reversible if CCCP was added in concentrations below then 1 mM within 5 minutes. In conditions of low concentrations (10-50 mM) the effect of CCCP was developed for a long time, but was small or no changes were observed in the period of spike generation. Application of 20 mM lanthanum greatly increased the neuron activity - both repetitive and endogenous spiking. When applied before, lanthanum strongly reduced and slowed the effect of CCCP. We have defined the elevation of CCCP minimal concentrations up to 4-6 mM, with more than 3 minutes needed to block repetitive activity by 10 mM CCCP. Application of lanthanum could not restore impulse activity which already was blocked by CCCP. We suppose that under CCCP influence, calcium enters into neuron via voltage-dependent channels and can not be stored by mitochondria. Elevation of calcium concentration becomes above the normal values that partly may be due to calcium release from mitochondria. This in turn induces irreversible changes, may be through Ca-dependent kinase activity blocking repetitive and endogenous impulse activity for a long period.