

## РОЗДІЛ I. МОЛЕКУЛЯРНА ТА КЛІТИННА ФІЗІОЛОГІЯ

### ВЗАЄМОДІЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ КАЛЬЦІЙТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ У ПЕРМЕАБІЛІЗОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ

**С.В. Бичкова**

Львівський національний університет ім. Івана Франка  
s.bychkova@gmail.com

Для генерування внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів різні системи транспортування кальцію взаємодіють між собою. До них належать канали, що забезпечують вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) інозитолтрифосфатчутливі та ріанодинчутливі кальцієві канали, а також системи акумулювання кальцію у депо –  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ЕПР і  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій. Ми вивчали взаємодію  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ,  $\text{RyRs}$  та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером мітохондрій у пермеабілізованих гепатоцитах щурів. Дослідження проводили на нелінійних щурах масою 0,18–0,2 кг. Печінку перфузували зовнішньоклітинним розчином. Гепатоцити ізолювали ферментативно-механічним способом. Для пермеабілізації використовували сапонін (0,01 мг/мл), який додавали до внутрішньоклітинного розчину. Клітини фарбували хлортетрацикліном (ХТЦ; 20 мкмоль/л) і вимірювали інтенсивність флуоресценції комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ –ХТЦ за допомогою цитофлуориметра ЛЮОМAM-И-1. Встановлено, що у контролі додавання ріанодину (50 нмоль/л) та інозитолтрифосфату ( $\text{IP}_3$ ) (10 мкмоль/л) до середовища інкубування пермеабілізованих гепатоцитів викликає статистично достовірне збільшення вмісту мембранозв'язаного кальцію у них на 50,10 % ( $n = 9$ ,  $P < 0,05$ ) та 43,95 % ( $n = 10$ ,  $P < 0,05$ ), відповідно. Це збільшення ми пов'язуємо зі збільшенням вмісту кальцію всередині внутрішньоклітинних депо, очевидно, мітохондрій, яке відбувається за рахунок перерозподілу кальцію між органелами. Сумісна дія ріанодину та  $\text{IP}_3$  не викликає статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного кальцію у пермеабілізованих гепатоцитах щурів. Показано, що застосування рутенію червоного ( $10^{-5}$  моль/л) спричиняє зменшення вмісту мембранозв'язаного кальцію на 22,09 % ( $n = 7$ ,  $P < 0,05$ ), що відображає пригнічення ним функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій. Виявилося, що сумісна дія рутенію червоного та  $\text{IP}_3$  не викликає статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного кальцію у пермеабілізованих гепатоцитах щурів. Встановлено, що сумісна дія ріанодину та рутенію червоного викликає збільшення вмісту мембранозв'язаного кальцію на 17,41 % ( $n = 9$ ,  $P < 0,05$ ). Отже, наявність рутенію червоного у середовищі інкубування не перешкоджає впливу ріанодину. Зроблено висновок, що існує залежність між вивільненням кальцію з  $\text{IP}_3$ - і ріанодинчутливих каналів – одночасно їх не можна активувати, що очевидно, запобігає надмірному спустошенню депо. Також показано, що у пермеабілізованих гепатоцитах щурів взаємодія між  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером мітохондрій та каналами вивільнення кальцію з ЕПР залежить від типу каналу.

### РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В ОВУЛЯЦІЇ, МЕЙОТИЧНОМУ ДОЗРІВАННІ ООЦИТІВ, В ІМПЛАНТАЦІЇ ТА В РАНЬОМУ РОЗВИТКУ ЕМБРІОНІВ

**Т.В.Блашків**

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

Оксид азоту (NO) – важливий чинник у здійсненні оваріальної функції. Досліджували вплив блокторів NO-синтаз (NOS) на кількість овульованих яйцеклітин самиць мишей при використанні гормональної стимуляції суперовуляції; сумісний вплив блокторів NOS і донорів NO, і блокторів кальцієвих каналів на здатність ооцитів до мейотичного дозрівання *in vitro*; вплив різних блокторів NOS на процес мейотичного дозрівання ооцитів мишей *in vitro* у складі кумулюсно-ооцитних клітинних комплексів, виділених з фолікулів різних розмірів і на різних стадіях астрального циклу миші; вплив екзо-

генних простагландинів F2a і E2 на мейотичне дозрівання ооцитів мишей і участь NO в їх дії; вплив блокаторів NOS на показники ембріональної загибелі у самиць при схрещуванні їх з інтактними самцями; вплив блокаторів NO-синтаз, що пригнічують різні ізоформи NO, на морфологічні особливості пре- і постімплантаційних ембріонів мишей. Встановлено, що оваріальні NOS необхідні для забезпечення максимальної овуляції, а відсутність NO в преовуляторний період приводить до значних порушень у мейотичному дозріванні ооцитів; індукційна ізоформа NOS (iNOS) необхідна для кумулюсного розширення й мейотичного дозрівання, будучи посередником функції кумулюсного оточення, а її роль зростає з розвитком фолікула й ооцита; донори NO збільшують кількість оваріальних ооцитів і їх здатність до відновлення мейозу у мишей на стадії проеструса, стимулюють здатність до завершення мейотичного дозрівання ооцитів у мишей на стадіях діеструса й проеструса; блокатори NOS зменшують кількість оваріальних ооцитів, збільшують кількість ооцитів з атипічною морфологією й пригнічують їх мейотичне дозрівання на всіх досліджуваних стадіях естрального циклу. Максимальне зменшення кількості оваріальних ооцитів відбувалося на стадії еструса, а максимальне пригнічення здатності до завершення мейотичного дозрівання оваріальними ооцитами - на стадії проеструса; кальцієві канали задіяні в механізм дії NO при відновленні мейозу ооцитами; NO бере участь як в ефекті простагландинів на мейотичне дозрівання ооцитів; при введенні блокаторів NOS підвищуються значення показників ембріональної загибелі, збільшується пре- і постімплантаційна смертність ембріонів у ранній термін після введення препаратів, а також уповільнюється ембріональний розвиток на стадії дроблення й під час гастрюляції; специфічні інгібітори iNOS/eNOS/nNOS у концентрації  $10^{-5}$  моль/л значно пригнічують преімплантаційний розвиток ембріонів мишей, а саме, на стадії морули. NO бере участь в ефекті естрадіолу-дипропіонату на ооцити.

## **КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ КАК ДЕТЕРМИНАНТЫ КЛЕТОЧНОЙ ВОЗБУДИМОСТИ**

**Н.А. Богданова, Е.В. Долгая, Н.Х. Погорелая, И.С. Магура**

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев  
magura@biph.kiev.ua

Калиевые каналы являются важным детерминантом клеточной возбудимости и ключевым компонентом множества путей преобразования сигналов. Количество идентифицированных генов калиевых каналов не менее 80. Разнообразии эндогенных фенотипов калиевых токов значительно превышает это количество. Такие факторы, как альтернативный сплайсинг, посттрансляционная модификация и возможность не только гомо-, но и гетерологического ансамбля четырех субъединиц, формирующих пору, значительно расширяет функциональное разнообразие калиевых каналов. Потенциалуправляемые калиевые каналы существуют не как независимые единицы, отвечающие на изменение трансмембранного потенциала, но как макромолекулярные комплексы со вспомогательными белками. Комплексы способны интегрировать разнообразные клеточные сигналы. Взаимодействие со вспомогательными белками определяет сборку канального комплекса, его локализацию, стабильность, особенности воротных процессов, проводимость, ответы, обуславливающие преобразование сигналов. С характером активности калиевых каналов связывают электрическую нестабильность сердца после острой ишемии. Экспрессия калиевых каналов модулирует пролиферацию некоторых опухолевых клеток. Калиевые каналы являются мишенями для различных терапевтических воздействий. Фармакологические препараты, влияющие на калиевые каналы, широко используются при лечении различных заболеваний, включая сахарный диабет 2-го типа, гипертонию и сердечную аритмию. Некоторые из этих веществ, осуществляя непосредственное воздействие на калиевые каналы, могут так же влиять на липидный метаболизм. Набор калиевых каналов в данной ткани практически всегда крайне гетерогенен. Распределение калиевых каналов в плазматической мембране не носит случайного характера. Такие каналы образуют

кластеры в определенных регионах клетки. Локализация калиевых каналов может определяться наличием динамических микродоменов плазматической мембраны («рафтов»). Обнаружена совместная локализация кальциевых каналов и кальцийактивируемых калиевых каналов в пресинаптических терминалах. Это обстоятельство обеспечивает регуляцию продолжительности активированного состояния кальциевых каналов и играет важную роль в механизмах секреции нейромедиаторов. Разнообразие и пластичность динамически регулируемых калиевых каналов позволяет наиболее эффективно использовать их активность для потребностей клетки. Многообразие потенциалуправляемых калиевых каналов и неоднородность их распределения в дендритах играет важную роль в интегративной функции нейронов и определяет особенности возбудимости дендритных разветвлений, амплитуду возникающих в них постсинаптических потенциалов, временные характеристики и амплитуду распространяющихся потенциалов действия.

### **СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧЕРВОНИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БІЛКІВ, ЯКІ ЗМІНЮЮТЬ СПЕКТР ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ З ЧАСОМ**

**В.В.Верхуша, К.С.Морозова, М.В. Гоенага, Ф.В. Субчач, Є.Е.Перський**

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна;

Медичний коледж ім. А. Эйнштейна, кафедра анатомії і структурної біології, США

epersky@list.ru

Вивчені спектральні характеристики трьох мономерних червоних флуоресцентних білків, так званих флуоресцентних таймерів (ФТ), які були створені з вихідного білка mCherry. Основною особливістю цих білків є спроможність змінювати з часом свою флуоресценцію з блакитної на червону. Досліджені варіанти білків характеризуються великою (В), середньою (С) і низькою (Н) швидкостями визрівання хромофора від блакитного до червоного. Швидкість переходу від блакитної флуоресценції до червоної в діапазоні від 15 до 45<sup>0</sup> С зворотнопропорційна температурі. При 37<sup>0</sup> С максимумами блакитної флуоресценції спостерігаються через 0,25, 1,2 і 9,8 год для очищених ВФТ, СФТ і НФТ відповідно, а напівмаксимумами червоної флуоресценції – на 7,1, 3,9 і 28 год відповідно. На клітинній культурі HeLa продемонстровано, що різні швидкість і час визрівання хромофора дають змогу детектувати хронологію та просторову локалізацію молекулярних подій у клітині.

### **ОСОБЛИВОСТІ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ ЧЕРВОНИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БІЛКІВ, ЯКІ ЗМІНЮЮТЬ СПЕКТР ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ З ЧАСОМ**

**В.В.Верхуша, К.С.Морозова, Ф.В. Субчач, Ю.Г. Кот, Н.І. Буланкіна**

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна;

Медичний коледж ім. А. Эйнштейна, кафедра анатомії і структурної біології, США

epersky@list.ru

Визначена первинна структура трьох мономерних флуоресцентних білків, так званих флуоресцентних таймерів (ФТ), які за допомогою спрямованого сайт-специфічного і випадкового мутагенезу були одержані з мономерного червоного флуоресцентного білка mCherry. На відміну від вихідного білка ці мутанти з часом змінюють флуоресценцію з блакитної на червону і відрізняються один від одного швидкістю цього переходу – великою (ВФТ), середньою (СФТ) і низькою (НФТ). У порівнянні з вихідним mCherry ВФТ має 5 амінокислотних заміни. Серед них заміни Lys→Arg, Leu→Trp, Ala→Ser у позиціях 69, 84 і 224 амінокислотного ланцюга знаходяться всередині, а Glu→Lys, Ser→Thr у позиціях 34 і 151 - на зовнішній поверхні молекули – так званої «β-бочечки». В амінокислотній послідовності СФТ знайдені 9 амінокислотних заміни. Lys→Arg, Leu→Trp, Met→Ile, Leu→Met у позиціях 69, 84, 152 і 205 - внутрішні,

і Asn→Asp, Thr→Ser, Gln→Lys, Tyr→Cys, Arg→His у позиціях 23, 43, 194, 221 і 227 -зовнішні. НФТ має тільки 4 мутації, з яких три: Lys→Arg, Leu→Trp, Ala→Val у позиціях 69, 84 і 179 містяться у внутрішньому просторі молекули і одна, у позиції 30, Glu→Val – на її поверхні. Розглянуто структурну роль знайдених зовнішніх і внутрішніх амінокислотних замін у формуванні флуоресцентних особливостей ВФТ, СФТ і НФТ, що відрізняють їх як від флуоресцентних властивостей mCherry, так і один від одного.

## МИТОХОНДРІАЛЬНІ ПЕРЕНОСНИКИ І МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ

**Т.Ю. Вознесенська**

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

Для клінічного екстракорпорального запліднення важливо з'ясувати, які внутрішньофолікулярні фактори або умови можуть впливати на мітохондрії ооцитів і визначати їх функціональний стан. Вивчали вплив інгібіторів мітохондріальних переносників на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro*, а саме: інгібіторів аспартат-глутаматних, глутаматних і аспартатних переносників на здатність до мейотичного дозрівання ооцитів без кумулюсних клітин і ооцитів у складі кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів з “малих”, “середніх” і “великих” фолікулів. Досліджували вплив кумулюсних клітин на здатність до мейотичного дозрівання ооцитів в умовах дії інгібітора аспартат-глутаматних переносників і оцінювали здатність до мейотичного дозрівання ооцитів мишей різного віку в умовах дії інгібітора аспартатних переносників. Встановлено, що інгібітори мітохондріальних переносників пригнічують здатність до мейотичного дозрівання ооцитів із всіх досліджуваних груп фолікулів (менше ооцитів досягає метафази II – стадії формування першого полярного тільця, більший відсоток ооцитів затримується в метафазі I – стадії розчинення зародкового пухирця). Результати свідчать, що наявність кумулюсних клітин впливає на здатність ооцитів досягати метафази II у середовищі з інгібітором аспартат-глутаматних мітохондріальних переносників, а активність мітохондріальних переносників кумулюсних клітин пов'язана з фолікулярним розвитком і регулюється, хоча б частково, присутністю ооцита, а у разі видалення ооцитів їхні функції змінюються настільки, що секретовані ооцитом фактори залучені у взаємодію з іншими фолікулярними факторами й спільно регулюють активність мітохондріальних переносників кумулюсних і гранулярних клітин. Отримані результати про вплив інгібіторів аспартатних мітохондріальних переносників на мейотичне дозрівання ооцитів миші різного віку дають підстави для твердження, що функції мітохондріальних переносників як ооцитів, так і фолікулярних клітин змінюються також з віком і, напевно, при різних розладах (у жінок з безпліддям, при синдромі аутоімунного ушкодження яєчників, у разі передчасної менопаузи, після діагностичних маніпуляцій, пункцій фолікулів для екстракорпорального запліднення), а також вважати, що зміна функцій мітохондріальних переносників впливає на якість ооцитів і далі на запліднення й розвиток ембріона.

## ВПЛИВ ДЕФОСФОРИЛЬОВАНОГО 2',5'-ТРИОЛІГОАДЕНІЛАТУ НА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНУ РУХЛИВІСТЬ Т-ЛІМФОЦИТІВ МИШІ

**О.В. Долга<sup>1</sup>, Н.Х. Погорела<sup>1</sup>, З.Ю. Ткачук<sup>2</sup>, І.С. Магура<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ  
dolgaya@biph.kiev.ua

Вивчення ролі цитокінів та їх вторинних посередників у механізмах регуляції метаболізму клітин – актуальна задача сучасної біології. Фосфорильований триолігоаденілат – внутрішньоклітинний посередник у процесі дії інтерферону та низки інших цитокінів. Увага дослідників до цієї сполуки зумовлена пошу-

ком нових противірусних і протипухлинних лікарських препаратів. Застосування фосфорильованого триолігоаденілату обмежується тим, що внаслідок своєї високої полярності ця сполука не проникає в еукаріотні клітини. Дефосфорильований (коровий) триолігоаденілат (2',5'АрАрА) завдяки високій ефективності проникнення через клітинні мембрани, проявляє *in vitro* антимітогенну, антипроліферативну і нейротропну активність при введенні безпосередньо в культуральне середовище. Механізм взаємодії 2',5'АрАрА з клітиною нині невідомий. Біологічна активність хімічних сполук (у тому числі і 2',5'АрАрА) значною мірою визначається їх здатністю взаємодіяти з плазматичною мембраною. Найважливішою фізико-хімічною характеристикою мембрани є величина поверхневого заряду, яка відображає її функціональний і структурний стан. Величина цього заряду визначає примембранну концентрацію іонів і біологічно активних молекул, впливає на функціонування потенціалзалежних мембранних механізмів, відіграє важливу роль у міжклітинних взаємодіях. Від щільності поверхневого заряду залежить електрофоретична рухливість (ЕФР) клітини. Методом мікроелектрофорезу досліджували ранні зміни поверхневого заряду Т-лімфоцитів селезінки миші, індуковані 2',5'АрАрА. Показано, що в перші години під впливом останнього достовірно збільшується абсолютне значення ЕФР Т-лімфоцитів у порівнянні із контрольним значенням. Ефект 2',5'АрАрА залежав від його концентрації в інкубаційному середовищі та тривалості впливу. Отримані результати дають змогу зробити висновок про те, що сумарний негативний поверхневий заряд стимульованих 2',5'АрАрА Т-лімфоцитів більший, ніж у контрольних клітин.

## **ВПЛИВ ЗМІН РЕЖИМІВ ХАРЧУВАННЯ НА АДАПТИВНІ МОЖЛИВОСТІ КОЛАГЕНОВОГО МАТРИКСУ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ**

**О.В. Жигаліна, О.В. Наглов, Н.А. Нікітіна**

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

[zmt@vil.com.ua](mailto:zmt@vil.com.ua)

Калорійно обмежена дієта є одним з найбільш фізіологічних методів подовження життя, що пригнічує процеси старіння. З іншого боку обмежена дієта є також і стресорним фактором. Нами була застосована модель, де після використання короткочасно обмеженої дієти (повноцінний корм через добу протягом 2 тиж) дослідних тварин відгодували (комбікорм *ad libitum* протягом 2 тиж), а потім переводили на стандартний корм на 1 міс. Для перевірки адаптивних можливостей сполучної тканини відповідати на вплив зміни режимів харчування цикл „голодування–відгодівля” повторювали. Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар, вік яких на початок експерименту був 3 і 19 міс. Об’єктом дослідження були ахіллові і хвостові сухожилля, шкіра спини і хвоста. Оцінювали зміни структурної стабільності колагенових утворень за вмістом колагену, ступенем поперечного зв’язування надмолекулярних колагенових утворень – за розчинністю при нагріванні; характером внутрішньо- та міжмолекулярних зшивок в колагеновому матриці (за результатами аналізу електрофоретичного розподілу в ПААГ продуктів термолабільного колагену). Показано, що у колагені всіх вивчених органів як при першому, так і при другому голодуванні структурна стабільність колагенових утворень знижується (вміст колагену, кількість поперечно зв’язаних агрегатів термолабільного колагену зменшується, а розчинність і кількість незв’язаних агрегатів – збільшується). При відгодівлі спостерігається зворотний процес. Ефект прямо залежить від сили навантаження на орган і більш виразний для молодих тварин. Виявлена різниця між першим і другим циклом зміни режимів харчування. У молодих щурів другий цикл призводить до менш істотних змін вмісту колагену і більш виразних у поперечному зв’язуванні. Ці зміни проходять за рахунок внутрішньо- і міжмолекулярних зшивок. У дорослих щурів на першому етапі змінюється лише вміст колагену і кількість внутрішньомолекулярних зшивок, а на другому – ще й міжмолекулярних зшивок, при незначній зміні вмісту колагену. Таким чином, при порівнянні першого і другого циклів „голодування–відгодівля” відзначені різні стратегії пристосування сполучної тканини до дії стресорних чинників.

**ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА И СТРЕПТОКИНАЗЫ НА КЛЕТКИ НЕОКОРТЕКСА ПРИ ПОВРЕЖДАЮЩЕМ ЭФФЕКТЕ ИОНОВ АММОНИЯ****О.Н. Жук, В.Н. Никандров, Е.И. Вашкевич**

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

nadulich@mail.ru

Одной из причин дегенерации клеток нервной ткани является агрессия ионов  $\text{NH}_4^+$ , накапливающихся при дисбалансе системы  $\text{NH}_4^+$ -глутамат в мозгу. Вследствие этого особо значимы молекулярно-клеточные механизмы устойчивости к такому повреждающему действию при ряде патологических состояний. С 1999 г. нами установлен ряд фактов регуляторного действия белков системы «плазминоген–плазмин» (плазминогена, Pg и его сильнейшего активатора стрептокиназы, SK) на структурные и функционально-метаболические особенности ряда типов клеток нервной ткани в культуре, на электрическую активность нейронов отдельных ядер ствола головного мозга. В данной работе исследовали способность Pg и SK «снимать» деструктивный эффект  $\text{NH}_4^+$  на клетки неокортекса новорожденных крыс в органотипической культуре. Методом электронной микроскопии показано, что при культивировании эксплантатов в питательной среде DMEM, содержащей 15% телячьей эмбриональной сыворотки (ТС), клетки нервной ткани сохраняли структурную организацию. При переводе культур на среду с дефицитом по белкам сыворотки (0,5% ТС) уже через 24 ч в астроцитах отмечены конденсация хроматина, появление множества глыбок гиперхромного материала с предпочтительной локализацией у внутренней мембраны ядра, которая расслаивалась, образуя выпячивания в сторону цитоплазмы. Цитоплазматические органеллы теряли характерную морфологию и вакуолизировались. В ядрах нейронов – реактивные изменения. В нейропиле отростки теряли правильную форму, их мембрана расслаивалась, исчезали органеллы. При культивировании на такой среде с добавлением SK (2000 МЕ/мл) или Pg (10 мкг/мл) деструктивные изменения отсутствовали. Интересной особенностью является обилие в нейронах митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами при добавлении SK. Внесение  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (0,1 М) в питательную среду с 0,5 % ТС приводило к резкому изменению ультраструктуры клеток, в первую очередь астроцитов: накоплению электронноплотного материала у внутренней мембраны ядра, деструктивным проявлениям в цитоплазме (ее вакуолизации, появлению миелиновых телец и исчезновению на отдельных участках плазматической мембраны). Добавление в этом случае SK или Pg предохраняло клетки от деструктивных изменений в течение всего периода исследования – 24 ч.

**ОЦЕНКА ВЕРОЯТНОСТИ КОМПЛЕКСИРОВАНИЯ ЛИГАНДА С РЕЦЕПТОРОМ****В.Н. Казаков, Т.И. Панова, Б.Г. Попов**

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

panova-tatyana@mail.ru

Ранее в радиолигандных исследованиях показано, что опиоидный модулятор коеновая кислота (КК) влияет на активность G-белков в мембранах мозга крыс только на фоне одновременного добавления к мембранам «классических» опиоидных лигандов (аналога лей-энкефалина DALE, морфина). Но базальная активность G-белков не меняется при инкубировании мембран только с КК отдельно, т.е. в этом случае её модулирующий эффект не проявляется. Предполагается, что это обусловлено особенностями взаимодействия КК с опиоидным рецептором. Принимается во внимание гипотеза, что лиганды пептидной и алкалоидной природы имеют разные точки связывания с рецептором: пептиды взаимодействуют одновременно с карманом (ключевая аминокислота – аспарагин (Asp) и с точками селективности (ключевые аминокислоты – триптофан (Trp) и лизин (Lis), а алкалоиды – только с карманом. Активация кармана приводит к активации G-белка и ответу клетки, а активация участков селективности вызывает

интернализацию рецептора. Для оценки вероятности комплексования КК с ключевыми аминокислотами рецептора моделировали их взаимодействие и рассчитывали энтальпии ( $\Delta H$ ) связей. Использовали полуэмпирический метод РМ-3, позволяющий получать корректные результаты при квантовохимических расчётах систем с открытыми оболочками, в которых есть неспаренные электроны. Чтобы программа нашла локальный минимум на поверхности потенциальной энергии, две молекулы разводили друг от друга на большое расстояние (50Å). Запускали оптимизацию геометрии, после чего получали искомую структуру и её термодинамические параметры. Оптимизация геометрии заключается в поиске структуры, из множества возможных, находящейся в минимуме поверхности потенциальной энергии. Вероятность образования связи тем выше, чем меньше для неё потребуется энергии (отрицательные значения  $\Delta H$ ). И, наоборот, чем больше необходимо энергии (положительные значения  $\Delta H$ ), тем ниже возможность образования такой структуры. Получили:  $\Delta H$  связи «КК-Asp» высокая (+17,5 ккал/моль), что говорит о низкой вероятности связывания КК с карманом опиоидного рецептора, а следовательно, и о невозможности активировать G-белки и запускать внутриклеточный ответ. А значения  $\Delta H$  связей «КК-Trp» и «КК-Lis» отрицательные: -8,7 и -27,6 ккал/моль, т.е. высока вероятность комплексования КК с участками селективности рецептора, а следовательно, и интернализация рецептора. Интернализация приводит к восстановлению чувствительности одной части рецепторов и деградации – другой. Продукты деградации активизируют синтез новых рецепторных молекул. Полученные результаты позволяют объяснить, почему КК самостоятельно не влияет на активность G-белков, но модулирует связывание других лигандов.

## **КВІТКИ, ПЛОДИ ТА НАСІННЯ КЛІТИН НЕФРОНІВ У ГЕНЕЗІ ПЛАЗМІНОЗАЛЕЖНОЇ КОАГУЛЯЦІЙНО-ПЕПТИЗАЦІЙНОЇ ДИСТРОФІЇ НИРКОВОЇ КОРИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНОМУ РІВНІ**

**В.І. Ковалишин**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Після електронно-мікроскопічних відкриттів чоловічих андроцею та гінцею ядер сперматозоїдів чоловіків, жіночого гінцею та андроцею ядер яйцеклітин жінок, явища енантіоморфізму в тромбіно- і плазмінозалежному коагуляційно-пептизаційному генезі ультраструктурного гомеостазу ниркової кори стало можливим вивчення аналогічних до сперматозоїдів і яйцеклітин морфо-генетичних складових у соматичних клітинах. Методом трансмісійної електронної мікроскопії вивчали ниркову кору на 1-й, 15-й хвилині, 1-й, 5-й, 24-й годині після внутрішньовенного введення 6-місячним білим щурам-самцям плазміну в дозі 200 од/кг. Контролем були 1-, 6-, 27-місячні інтактні білі щурі та квітки рослин /*Capsella bursa-pastoris*, *Rosa canina*, *Cerasus vulgaris*/. Напівтонкі зрізи квіток контрастували в розчинах уранілацетату і цитрату свинцю, фотографували та вивчали за допомогою світлооптичних приладів. Виявлено, що в крові гемокапілярів, сполучній тканині та клітинах нефронів ниркової кори, починаючи з 1-ї хвилини після введення білим щурам плазміну розвивалася плазмінозалежна коагуляційно-пептизаційна дистрофія. На 5-й годині цього процесу від фібрилярних центрів ядерця ядра епітеліальних клітин, особливо проксимальної частини каналців нефронів, простягалися в цитоплазму хромосомоподібні вирости. Від бокових частин таких виростів відходили системи нанотрубочок, що з'єднували окремі аутофаголізосоми, апоптотичні тіла, пероксисоми, мітохондрії, а також яйцеподібної форми утвори довжиною близько 2100 нм. При порівняльному аналізі складових яйцеподібних утворів, сфотографованих електронним мікроскопом, зі складовими квіток рослин, сфотографованих світлооптичними приладами, відповідно виявлена їх топологічна ідентичність: система нанотрубочок – квітконіжка; стінка яйцеподібного утвору – квітколоже і гіпантій; булавоподібний утвір – тичинка; колбочкоподібний утвір – плодолисток; тісно поєднані між собою колбочкоподібні утвори – маточка; утвір кулястої форми із

грубозернистим матеріалом – насінний зачаток. У цитоплазмі епітеліальних клітин нефронів при плазм-інозалежній коагуляційно-пептизаційній дистрофії, як і у контролі, виявлялися також похідні квіток – плоди довжиною близько 700 нм, що наповнені насінням діаметром близько 100 нм, аналогічно, як в стручечках *Capsellae bursae-pastoris*.

## **КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНІ КАЛІЄВІ КАНАЛИ ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ В ДІАБЕТИЧНІЙ МОДЕЛІ ГІПЕРАКТИВНОГО СЕЧОВОГО МІХУРА**

**Д.А. Кришталь, В.В. Рекалов, Я.М. Шуба**

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

Серед ускладнень діабету, які суттєво впливають на якість життя хворих, є нетримання сечі. Нині головний метод лікування синдрому гіперактивного сечового міхура (СГАСМ), який лежить в основі нетримання сечі, полягає у використанні антагоністів мускаринових  $M_3$ -холінорецепторів гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора, а також ботулотоксину А, який зв'язується з пресинаптичними холінергічними нервовими закінченнями. Однак оскільки ці препарати мають суттєві побічні дії, актуальним залишається виявлення додаткових механізмів регуляції скорочення ГМК детрузора при СГАСМ. Кальційзалежні калієві канали великої провідності (ВК-канали) відповідають за реполяризацію потенціала дії ГМК детрузора та за генерацію спонтанних гіперполяризацій у відповідь на локальні вивільнення кальцію (спарки) із ріанодинчутливих кальцієвих депо. Ми порівняли макроскопічні струми через ВК-канали ( $I_{ВК}$ ) ГМК детрузора нормальних щурів і щурів із СГАСМ, викликаним стрептозотоциніндукованим діабетом, з перспективою використання цих каналів як можливих мішеней для фармакологічної корекції спонтанного сечовипускання. Струми ізольованих ГМК детрузора реєстрували за допомогою методу patch-clamp, а компонент, пов'язаний з активацією ВК-каналів, виділяли на основі його чутливості до специфічного блокатора паксиліну. Після розвитку діабету щури виявляли явні зовнішні ознаки нетримання сечі. При цьому в ГМК їх детрузора густина  $I_{ВК}$ , активованого деполяризацією до 0 мВ, становила всього  $0,3 \text{ пА/пФ} \pm 0,05 \text{ пА/пФ}$ , що майже в 20 разів менше порівняно з  $5,4 \text{ пА/пФ} \pm 0,04 \text{ пА/пФ}$  у контрольних тварин. Частота і амплітуда спонтанних транзйентних  $I_{ВК}$  при -20 мВ також зменшувалися з  $12 \text{ Гц} \pm 1,5 \text{ Гц}$  і  $0,87 \text{ пА/пФ} \pm 0,05 \text{ пА/пФ}$  у контролі відповідно до  $2,4 \text{ Гц} \pm 0,6 \text{ Гц}$  і  $0,47 \text{ пА/пФ} \pm 0,06 \text{ пА/пФ}$  при діабеті. Отримані результати свідчать, що зменшення  $I_{ВК}$  внаслідок зниження експресії ВК-каналів, їх дисфункції та/або порушення функціонування ріанодинових  $\text{Ca}^{2+}$ -депо може відігравати суттєву роль у генезі СГАСМ.

## **ВПЛИВ ГАБАПЕНТИНУ НА TRPV1-КАНАЛИ У ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ ДІАБЕТИЧНОЇ ПОЛІНЕЙРОПАТІЇ**

**О.П. Костюк, С.В. Романенко, П.Г. Костюк**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України  
ekostyuk@biph.kiev.ua

Мембранні канали TRPV1 або так звані ванілоїдні рецептори (капсаїцинчутливі) – гострочутливі до проведення больових стимулів на периферії. Найбільший рівень їх експресії спостерігається в нервовій тканині. Вперше ці канали були виявлені в нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв (ДКГ) малого та середнього розмірів, тобто в первинних ноцицептивних нейронах. За своїми властивостями такі рецепторканалні комплекси є полімодальними, але переважно вони відповідають за больову температурну чутливість. Було показано, що у різних випадках розвитку больової чутливості спостерігаються зміни експресії та властивостей TRPV1-каналів. Серед патологічних станів широко розповсюджених нині є



цукровий діабет, який, як відомо, супроводжується (особливо на перших етапах розвитку) різкою гіпералгезичною полінейропатією. Нами було показано, що амплітуда кальцієвих транзентів у щурів з цукровим діабетом призводила до зміни кальцієвих транзитів: у середніх і малих нейронах вона становила 12 та 8% відповідно, що може свідчити і про відповідне відчуття гіпералгезії. Таку гіпералгезію пов'язують з суттєвим внеском TRPV1-каналів. Препаратів, що могли б зменшувати гіпералгезичний біль остаточно не вироблено і пошуки тривають. Останнім часом була звернута увага на такий препарат, як габапентин. Особливістю цієї речовини порівняно з іншими препаратами є низький рівень побічних ефектів. Тому нашу увагу привернуло саме дослідження габапентину як у цілому, так і в умовах цукрового діабету, та його можливого впливу на TRPV1-канали. Середня амплітуда кальцієвих транзентів в умовах аплікації габапентину у групах нейронів середніх розмірів при цукровому діабеті становила  $352,1 \text{ нмоль/л} \pm 87,8 \text{ нмоль/л}$ , а у маленьких лише  $497,9 \text{ нмоль/л} \pm 34,2 \text{ нмоль/л}$ . Несподіваним для нас був той факт, що під впливом габапентину у великих нейронах в умовах цукрового діабету величина гіперкалієвих транзентів також зменшувалася. Для більш чіткого виявлення таких параметрів впливу габапентину на щурів з діабетичною полінейропатією внаслідок можливої участі капсаїцинчутливих каналів (TRPV1) було проведено деякі дослідження на нейронах середнього розміру, де дія габапентину проявлялася більше. Для цього проводився додатковий капсаїциновий тест. Середня амплітуда гіперкалієвого транзєнта в умовах прикладання габапентину при цукровому діабеті для капсаїцинчутливих нейронів становила у такому разі  $371,7 \text{ нмоль/л} \pm 72,2 \text{ нмоль/л}$ . У популяції маленьких нейронів вплив габапентину на капсаїцинові нейрони не був достовірним, порівнюючи з контрольними показниками. Очевидно при діабетичній нейропатії саме такий вплив габапентину на TRPV1-канали є його характерною рисою.

## **КАЛЬЦІЄВІ СИГНАЛИ, ВИКЛИКАНІ ВИСОКОЧАСТОТНОЮ ІМПУЛЬСАЦІЄЮ В ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИНАХ СІТКІВКИ ЩУРІВ**

**К.І. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
kir.kuznet@gmail.com

Гангліозні клітини сітківки (ГКС) передають аферентну інформацію від зорових рецепторів до ЦНС. Характерною особливістю цих клітин є їх здатність до високочастотної генерації потенціалів дії (ПД) у відповідь на деполяризацію. З літературних даних відомо, що у центральних нейронах основну роль у генерації високочастотної імпульсації відіграють калієві канали родини Kv3. Нами було досліджено вплив  $500 \text{ мкмоль/л}$  тетраетиламонію (ТЕА), що у даній концентрації є блокатором Kv3-каналів, на високочастотну імпульсацію ГКС, викликану прикладанням деполяризуючих струмів тривалістю  $500 \text{ мс}$  та амплітудою  $50\text{--}150 \text{ пА}$ , і на параметри окремого ПД. Аплікація ТЕА зменшувала частоту імпульсації нейронів з  $61,9 \pm 2,4$  до  $21,8 \text{ мс} \pm 2,7 \text{ мс}$  ( $n=11$ ) та збільшувала ширину (на половині висоти) окремого ПД з  $1,1 \pm 0,1$  до  $2,7 \text{ мс} \pm 0,2 \text{ мс}$  ( $n=11$ ). Основним шляхом входу іонів кальцію у клітину є активація потенціалкерованих кальцієвих каналів під час перебігу ПД. За допомогою кальційчутливого барвника Indo-1, який у концентрації  $100 \text{ мкмоль/л}$  додавався до внутрішньоклітинного розчину, було зареєстровано зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію під час генерації високочастотної імпульсації ГКС, викликаній електричною стимуляцією. Амплітуда кальцієвого сигналу лінійно залежала від частоти генерації ПД. При аплікації ТЕА, що збільшувало ширину окремого ПД, концентрація вхідних іонів кальцію в перерахунок на окремих потенціал дії збільшувалася з  $2,6 \pm 0,4$  до  $3,9 \text{ нМ} \pm 0,8 \text{ нМ}$  ( $n=4$ ). Отримані результати свідчать про ключову роль калієвих каналів родини Kv3 у забезпеченні короткої тривалості окремого ПД у ГКС, що зумовлює можливість генерації високочастотної імпульсації та водночас обмежує вхід іонів кальцію у клітину протягом окремого ПД; останнє може являти собою запобіжний механізм від кальційопосередкованої цитотоксичної загибелі.

**ВИВЧЕННЯ ПЕРЕТВОРЕННЯ РИБОФЛАВІНУ У ФАД ЗА ВЗАЄМОДІЇ ЕМБРІОНАЛЬНИХ І СФОРМОВАНИХ ТКАНИН В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ****О.В. Кулібаба, С.М. Кобильник, А.О. Янчукова, С.А. Петров**

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

Механізми взаємодії ембріональних і сформованих тканин за умов трансплантації вивчені недостатньо. Особливості змін метаболізму вітамінів у таких умовах зовсім не досліджені. Тому ми вирішили з'ясувати особливості утворення коферментної форми рибофлавіну – ФАД в ембріональних і дорослих тканинах за умов підсадки ембріональної очередини та ембріональних м'язів до аналогічних сформованих тканин щурів. Нами встановлено, що через одну добу після підсадки вміст вільного рибофлавіну як у підсадженої ембріональній тканині, так і в сусідніх ділянках сформованих тканин істотно зменшується. При цьому вміст ФАД і в ембріональних тканинах, і в сформованих тканинах збільшується приблизно в два рази. Таким чином, отримані нами результати свідчать, що трансплантація ембріональних тканин до сформованих тканин призводить до прискорення утворення коферментної форми – ФАД з вільного рибофлавіну як в ембріональних, так і в сформованих тканинах.

**СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕФОРМАЦІЇ ШКІРИ НА ВМІСТ ШИФФОВИХ ОСНОВ У КОЛАГЕНІ ТИПУ I, ЯКИЙ В НІЙ СИНТЕЗУЄТЬСЯ****Т.В. Костіна, Є.Е.Перський, М.В. Гоєнага, Н.А.Нікітіна**Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна  
epersky@list.ru

In vitro досліджено вплив деформації сполучнотканинних клітин шкіри 3-місячних щурів при її механічному розтягуванні в діапазоні напруг ( $0,075-0,18$ ) МН/м<sup>2</sup> на вміст шиффових основ у колагені типу I, який синтезується в цих умовах. Показано, що під дією напруження знижується інтенсивність внутрішньоклітинної стадії процесингу колагену – окиснювального дезамінування в ньому залишків лізину та гідроксилізину. Це призводить до зменшення питомої частки альдегідних і збільшення – е-аміногруп в молекулах колагену, що повинно знижувати спроможності для конденсації цих радикалів і утворення міжмолекулярних ковалентних зшивок типу шиффових основ. Вимірювання спектрів флуоресценції колагену типу I, синтезованого в шкірі, показало, що інтенсивність смуги емісії з довжиною хвилі 420 нм, характерної для шиффових основ, зменшується з підвищенням напруження в шкірі. В інфрачервоних спектрах колагену типу I проаналізовано інтенсивність смуги поглинання 1640 см<sup>-1</sup>, яка є характерною частотою коливання шиффових основ в потрійній спіралі молекули колагену. Виявлено, що інтенсивність цієї смуги поглинання в колагені обернено пропорційна напруженню, при якій він синтезується в шкірі. Таким чином, деформація сполучнотканинних клітин призводить до зміни структурних параметрів молекул колагену, які в них синтезуються.

**ГІСТОЛОГО-МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ СТРУКТУРНИХ ЗМІН ДЕРМИ ШКІРИ ПРИ ЇЇ ДЕФОРМАЦІЇ****Ю.Г. Кот<sup>1</sup>, Г.І. Губіна-Вакулік<sup>2</sup>, А.Б. Єль Та'алу<sup>1</sup>, О.М. Пономаренко<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна;<sup>2</sup>Харківський державний медичний університет  
kot\_jurij@inbox.ru

Досліджено динаміку морфологічного стану та морфометричних показників дерми шкіри під дією механічного напруження у 3-місячних щурів-самців лінії Вістар. Зразки шкіри спини піддавали

статичному розтягуючому напруженню в діапазоні від 0,025 до 0,48 МН/м<sup>2</sup> протягом 6 год у розчині Рінгера-Кребса при 37° С і фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну. Зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином і пікрофуксіном за ван-Гізоном. Препарати аналізували при збільшенні у 400–600 крат. Оцінювали структурний стан епітелію та дерми, інтенсивність забарвлення колагенових волокон, морфологію клітинної складової дерми. У діапазоні напружень 0,025–0,24 МН/м<sup>2</sup> колагенова складова тканини стає більш щільною, її густина і інтенсивність забарвлення збільшуються в 1,4 і 1,6 раза. Значно збільшуються товщина та щільність кератинового шару шкіри. Суттєвих змін стану релаксованого базального епітелію не помічено. Серед клітин дерми не спостерігаються сферично-фіброцитарні форми. Домінують веретеноподібні та зірчасті форми, що відповідає морфологічному стану активно синтезуючих фібробластів. При нарузі 0,24–0,48 МН/м<sup>2</sup> інтенсивність забарвлення колагену дерми суттєво знижується, проте в 2,6 раза збільшується забарвлення некротизованого колагену. Щільність колагенової сітки тканини, що перебували під напруженням 0,48 МН/м<sup>2</sup>, зменшується у 2,4 раза. Спостерігається порушення тканинної будови, про що свідчать значні розриви у гіподермі та відслонення релаксованого епітелію. Кератиновий шар потоншується та майже не проглядається. У дермі з'являються поодинокі клітини еліпсоїдної та сферичної форми, хоча веретеноподібний і зірчастий типи переважають. Це свідчить про порушення взаємовідношення клітина-матрикс і зменшення активно синтезуючих форм фібробластів при нарузі вищій за 0,24 МН/м<sup>2</sup>. Наводиться кореляція отриманих гістологічних і біохімічних результатів з результатами досліджень.

## КАЛЬЦІЄВІ ДЕТЕРМІНАНТИ МОЗКОВИХ ФУНКЦІЙ

**П.Г. Костюк**

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

Основними властивостями нервової клітини є, з одного боку, її здатність генерувати нервові імпульси, а з іншого — передавати утворені сигнали всередину клітини, де вони можуть запускати чи модулювати всі базисні клітинні процеси. Ця внутрішньоклітинна сигналізація має першорядне значення для нормального функціонування нервової системи, й головну роль у ній відіграють іони кальцію. Характеристики кальцієвих сигналів визначаються складним комплексом молекулярних механізмів, які варіюють у різних типів нейронів; це призводить до відповідних функціональних особливостей таких клітин. Нашими дослідженнями розкрито складний комплексних молекулярних механізмів, які формують кальцієві сигнали під час генерації короткочасних і тривалих фізіологічних процесів, забезпечують можливість широкої модуляції амплітудних, часових і просторових характеристик таких сигналів. Важливо, що ці механізми істотно порушуються при найпоширеніших і найтяжчих формах патологічних змін в організмі. Детальний аналіз зазначених змін, завдяки можливості прямого вимірювання змін вмісту Ca<sup>2+</sup> в окремій клітині та в її внутрішніх субклітинних структурах, безсумнівно, має першочергове значення як для розкриття природи генералізованих патологічних процесів, так і для пошуку ефективних шляхів їх компенсації. В наших дослідженнях ми вивчали це питання на тваринах, які перебували у трьох експериментально викликаних генералізованих патологічних станах: гіперглікемії, порушення кислотно-лужного балансу та гіпоксії. При виникненні діабетичної гіперглікемії та розвитку відповідних невропатичних змін найістотнішим порушенням є значне подовження фази слідового підвищення вмісту Ca<sup>2+</sup> в цитозолі після збудження сенсорних нейронів. Таке підвищення може бути основою як тривалої потенціації передачі ноцицептивних сигналів, тобто гіпералгезії, так і можливої її тривалої депресії (за надмірного підвищення цього вмісту). При гіпоксії одним з істотних порушень є стійке підвищення базового вмісту Ca<sup>2+</sup> та аномально уповільнене повернення цього рівня до норми після викликаних збудженням кальцієвих транз'єнтів. Важливо що подібні зміни відбуваються і у перебігу фізіологічного процесу старіння. Такі зміни здатні призводити до активації протеолітичних ферментів, й отже,

до посилення явищ клітинного некрозу й апоптозу, що з часом виключатиме з функціонування в нейронних мережах дедалі більшої кількості інтегрованих у них нервових клітин. Відповідно пошук ефективних засобів регуляції кальцієвого гомеостазу в нервових клітинах є дуже актуальним нашим завданням.

## **ВПЛИВ ГІПОКСІЇ НА КАЛЬЦІЄВУ СИГНАЛІЗАЦІЮ В НЕЙРОНАХ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ГІПОКСІЇ ТВАРИН**

**І.О. Лук'янець<sup>1</sup>, П.Г.Костюк<sup>1,2</sup>, О.О. Лук'янець<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

ilukyan@biph.kiev.ua

Відомо, що у відповідь на зниження парціального тиску кисню у савців можуть відбуватися зміни на рівні всього організму, локальному та на клітинному. Відповідно до цих змін може відбуватися і адаптація до них. На системному рівні змінюються дихання та кровообіг, на клітинному рівні адаптація може відбуватися через інтенсифікацію процесу анаеробного дихання із залученням гліколізу. Також гіпоксія може індукувати експресію певних генів. Крім адаптивних фізіологічних відповідей організму на зниження вмісту кисню, гіпоксія/ішемія також активує патологічні процеси, які спостерігаються при деяких патологіях, таких, як інсульт, інфаркт тощо. Найбільш вразливими до гіпоксії/ішемії є структури мозку – стовбур мозку, гіпокамп, кора мозку тощо. Довготривала гіпоксія/ішемія часто призводить до незворотних процесів і загибелі нейронів через некроз та апоптоз. В основі цих процесів лежить значне підвищення вмісту вільного кальцію в цитоплазмі клітин. Метою наших досліджень було вивчення особливостей функціонування кальцієвого гомеостазу нейронів “гіпокситолерантних” тварин в умовах експериментальної гіпоксії. В наших експериментах за допомогою мікрофлуоресцентного методу вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію та полярографічного методу вимірювання парціального тиску кисню ми досліджували зміни кальцієвого гомеостазу в умовах експериментальної гіпоксії на нейронах “гіпокситолерантного” виду – срібного карася. Наші експерименти показали, що в нейронах мозочку карася добре представлені основні системи, призначені для очищення цитоплазми клітини від надлишкового кальцію, серед них ми дослідили участь мітохондрій,  $Ca^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулума, а також  $Ca^{2+}$ -АТФази та  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник цитоплазматичної мембрани. Нами були досліджені особливості функціонування цих систем в умовах гіпоксії в нейронах мозочку “гіпокситолерантного” карася.

## **МЕХАНІЗМИ КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНОГО ВИВЛНЕННЯ НЕЙРОТРАНСМІТЕРІВ**

**О.О. Лук'янець<sup>1</sup>, О.В. Садовий, П.Г. Костюк<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

elena@biph.kiev.ua

Основним механізмом, що забезпечує синаптичну передачу в нервових клітинах або секрецію гормонів в ендокринних клітинах є екзоцитоз. Останній являє собою процес злиття синаптичних або секреторних везикул із плазматичною мембраною, внаслідок чого формується пора, через яку вміст везикул – гормони або медіатори вивільнюються із клітини у зовнішнє середовище. Головним сигналом, який запускає екзоцитоз є підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в цитозолі клітини. У разі злиття мембрани везикули із цитоплазматичною мембраною та при формуванні трансмембранної пори бере участь ціла низка спеціалізованих синаптичних білків. Серед них основним компонентом є

білковий комплекс SNARE (від англ. soluble NSF attachment receptor). Білки SNARE є невеликими, але широко представленими мембранними білками, які мають цитозольний домен (SNARE-домен), здатний до утворення зворотного зчеплення. Основою SNARE-комплексу є синтаксин-1 і білок SNAP-25, що знаходяться на клітинній мембрані, і синаптобrevін, локалізований на поверхні синаптичної везикули. Нині нараховується близько 60 SNARE-білків, які можуть також зв'язуватися із різними компартментами клітини. Ці білки діляться на дві функціональні категорії: везикулярні (v-SNARE), які локалізовані на везикулах і мембранні (t-SNARE). В останній час виявляється все більша кількість синаптичних білків, залучених в процеси екзоцитозу, функцію яких можна віднести до регуляторних факторів, роль котрих у процесі екзоцитозу недостатньо вивчена. В наших експериментах ми досліджували значення деяких синаптичних білків та їх вплив на вивільнення медіаторів (катехоламінів) у хромафінних клітинах надниркової залози щура. Використовуючи амперометричний метод вимірювання секреції за допомогою карбонових волокон, мікрофлуоресцентної мікроскопії та мікроін'єкції специфічних антитіл до синаптичних білків із родини Munc-18, Munc-13 та інших, ми охарактеризували особливості їх експресії та ролі в процесі екзоцитозу.

### **ЗМІНИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ ПРИ СИНАПТИЧНІЙ АКТИВАЦІЇ НЕЙРОНІВ ІЗОЛЬОВАНОГО ВЕРХНЬОГО ШИЙНОГО ГАНГЛІЯ ЩУРА**

**В.Ю. Маслов**

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

Відомо, що канал нікотинового ацетилхолінового рецептора (НХР) є достатньо добре проникним для іонів кальцію, що робить потенційно можливим додаткове збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію та відповідний вплив на функціонування нейрона симпатичного ганглія при його синаптичній активації. У нашій роботі було досліджено зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію у окремому нейроні ізольованого верхнього шийного ганглія (ВШГ) щура при прямій і синаптичній стимуляції у діапазоні частот, що ресструвалися у попередніх дослідах із відведення фонові активності цих нейронів. Внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію вимірювали під час електрофізіологічного дослідження з використанням флуоресцентного барвника Indo-1. Барвник у концентрації 0,5 ммоль/л додавали до розчину, яким заповнювали мікроелектроди (2 ммоль/л глюконат калію), та іонофоретично вводили у клітину (струм від  $-0,4$  до  $-0,8$  нА протягом 5–15 хв). При прямій стимуляції нейрона окремий потенціал дії (ПД) викликав кальцієвий сигнал з середньою амплітудою  $42$  нмоль/л  $\pm$   $5$  нмоль/л та постійною спаду  $1,3$  с  $\pm$   $0,1$  с ( $n=9$ ). При періодичній стимуляції (0,5–5 Гц) вміст кальцію лінійно залежав від частоти ПД, середнє значення коефіцієнта пропорційності становило  $156$  нмоль/лс  $\pm$   $19$  нмоль/лс ( $n=11$ ). Середні значення постійних часу зростання та спаду концентрації кальцію становили  $5,6$  с  $\pm$   $0,7$  с та  $4,9$  с  $\pm$   $0,6$  с ( $n=11$ ) відповідно. При синаптичній активації динаміка кальцієвих сигналів була подібною: окремий ПД викликав сигнал з середньою амплітудою  $45$  нмоль/л  $\pm$   $5$  нмоль/л та постійною спаду  $1,2$  с  $\pm$   $0,2$  с ( $n=8$ ), вміст кальцію лінійно залежав від частоти ПД з середнім коефіцієнтом пропорційності  $196$  нмоль/лс  $\pm$   $47$  нмоль/лс ( $n=5$ ) та постійними часу зростання та спаду відповідно  $4,9$   $\pm$   $0,6$  та  $4,1$  с  $\pm$   $0,5$  с ( $n=11$ ). Дещо більші зміни концентрації кальцію при синаптичній стимуляції у порівнянні з прямою пояснюються, вірогідно, додатковим входом кальцію через канал НХР, проте ця різниця виявилася статистично недостовірною. Також не було виявлено змін концентрації кальцію при синаптичній підпороговій активації нейронів ВШГ (частота стимуляції 1–10 Гц). Таким чином, у фізіологічному діапазоні частот синаптичної активації нейрона ізольованого ВШГ щура додатковий вхід іонів кальцію через канал НХР суттєво не впливає на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію. Слід зауважити, що цей висновок стосується лише змін концентрації кальцію у сомі нейрона та теоретично не виключає можливості виникнення фізіологічно значимих локальних (примембранних або у дендритах) змін концентрації кальцію при активації НХР.

**DYNAMICS OF POTASSIUM CHANNELS ACTIVITIES****I.S. Magura, E.I. Magura, Ageev Sh., N.A. Bogdanova**O.O. Bogomoletz Institute Physiology National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv  
magura@biph.kiev.ua

Potassium ( $K^+$ ) channels are major determinants of membrane excitability, influencing the resting potential of membranes, wave forms and frequencies of action potentials, and thresholds of excitation. Potassium channels fulfill important function in many signal transduction pathways in the nervous system. Complex processing and integration of the signals observed in neurons are facilitated by a diverse range of the gating properties of the ion channels in this cell type, particularly of the voltage-gated  $K^+$  channels ( $K_v$ ). A distinctive combination of the  $K^+$  channels endows neurons with a broad repertoire of the excitable properties and allows each neuron to respond in a specific manner to a given input at a given time. The properties of many  $K^+$  channels can be modulated by second messenger pathways activated by neurotransmitters and other stimuli.  $K^+$  channels are among the most frequent targets of the actions of several signaling system. Voltage-gated  $K^+$  channels exist not as independent units merely responding to changes in transmembrane potential but as macromolecular complexes able to integrate a plethora of cellular signals that fine tune channel activities. Specificity of information is generally encoded by the kinetics of action potential frequency, duration, bursting, and summation. A neuron (or specific axon or dendrite), when it is required to change its firing pattern, can rapidly regulate the gating behavior of existing channels. If longer term modifications in firing patterns are required, the cell may alter the transcriptional expression of ion channel genes for diverse functions. The number of  $K^+$  channel genes is relatively large; however, the diversity of endogenous  $K^+$  current phenotypes observed from various excitable cells is much greater. Additional processes such as alternative splicing, posttranslational modification, and heterologous assembly of pore-forming subunits in tetramers contribute to extend the functional diversity of the limited repertoire of  $K^+$  channel gene products. Even greater diversity can be achieved through interactions between  $K^+$  channel proteins and accessory proteins. The number of likely therapeutic indication for  $K^+$  channel modulators will increase as insight into the dynamics of expression of these channels in various diseases grows and the issue of the required selectivity is resolved.

**СИСТЕМА КАЛЬЦІЙФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОДИНИЦЬ У СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИНАХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ CHIRONOMUS PLUMOSUS****В.В. Манько**Львівський національний університет ім. Івана Франка  
vvmanko@gmail.com

Спираючись на експериментальні дослідження кальційтранспортувальних систем секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L., які проведені на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського національного університету ім. Івана Франка, була запропонована концепція кальційфункціональних одиниць. Кальційфункціональна одиниця – це абстрактна модель, яка складається з одного кальцієвого каналу (системи пасивного транспортування),  $Ca^{2+}$ -помпи (системи активного транспортування) та клітинної мембрани, що забезпечує компартменталізацію  $Ca^{2+}$ . Вона може перебувати у трьох станах – спокою, активності та інактивації. Стан спокою характеризується наявністю динамічної рівноваги між вхідним і вихідним (відносно цитозолу) потоками  $Ca^{2+}$  та високою чутливістю до фізіологічного агоніста. Внаслідок дії агоніста вхідний потік стає більшим над вихідним (стан активності),  $[Ca^{2+}]_i$  збільшується, що запускає клітинну відповідь. У стані інактивації – навпаки, переважає вихідний потік і система повертається до стану спокою. Чинниками, які забезпечують за рахунок прямого позитивного чи зворотного негативного зв'язку перехід кальційфункціональних одиниць між різними

станами,  $\epsilon$   $\text{Ca}^{2+}$ , рівень мембранного потенціалу тощо. Ендоплазматична кальційфункціональна одиниця досліджуваних секреторних клітин об'єднує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу ендоплазматичного ретикулума,  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі та ріанодинчутливі кальцієві канали. Як наслідок, 1) ріанодин (у інгібуючій концентрації) чи 2-АРВ спричиняє збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз; 2) блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи спричиняє зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз; 3) фізіологічна активація  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів потенціює активацію ріанодинчутливих кальцієвих каналів і навпаки; 4) субмаксимальна активація  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів запобігає одночасній активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів чи навпаки. У секреторних клітинах слинних залоз постулюється також наявність кальційфункціональної одиниці плазматичної мембрани (формується потенціалкерованими кальцієвими каналами,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою плазматичної мембрани) та ендоплазматично-мітохондріальної кальційфункціональної одиниці (складається з каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  ендоплазматичного ретикулума і  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій). Наявність такого рівня організації кальцієвої сигналізації у клітинах слід обов'язково враховувати під час аналізу процесів внутрішньоклітинної трансдукції сигналу при активації різноманітних рецепторів.

### **ЛИПОПОЛИСАХАРИДЗАВИСИМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МАКРОФАГОВ: РОЛЬ СУРФАКТАНТНОГО БЕЛКА D**

**В.А. Назаров, С.В. Круглов, И.Ю. Малышев**

Институт общей патологии и патофизиологии, Москва

Сурфактантный белок D (SP-D) вырабатывается в легких и регулирует местную продукцию NO и цитокинов альвеолярными макрофагами. SP-D был обнаружен и в других органах и тканях, однако, его функции за пределами легких до сих пор оставались неизученными. В связи с этим в данной работе была изучена возможность влияния SP-D на морфологию перитонеальных макрофагов и регуляцию синтеза NO и цитокинов перитонеальными макрофагами. Была проанализирована зависимость эффектов SP-D от фенотипа секреторной активности макрофагов, а также его влияние на продукцию перитонеальными макрофагами NO и цитокинов при действии высоких доз липополисахарида (ЛПС). Результаты работы показали, что отсутствие гена *sp-d* у мышей не приводит к изменению морфологии нативных перитонеальных макрофагов. При удалении этого гена подавляется базальная секреция провоспалительного цитокина интерферона  $\gamma$  и противовоспалительного цитокина интерлейкина-13 нативными перитонеальными макрофагами. Отсутствие гена *sp-d* в организме мышей приводит к снижению продукции исследованных про- и противовоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами при действии репрограммирующих концентраций ЛПС. Отсутствие гена *sp-d* у мышей не влияет на базальную экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS) перитонеальными макрофагами, при этом ЛПС-индуцированная активация экспрессии гена iNOS во всех фенотипах перитонеальных макрофагов снижается. Однако у макрофагов противовоспалительного фенотипа снижение экспрессии iNOS было выражено сильнее, чем у макрофагов нативного и провоспалительного фенотипов.

### **АНТИОКСИДАНТИ ПОПЕРЕДЖАЮТЬ РОЗВИТОК ПІЗНАВАЛЬНОГО ДЕФІЦИТУ І ПОРУШЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ НЕРВОВОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДІАБЕТУ**

**В.С. Недзвецький, П.О. Неруш<sup>1</sup>, С.В. Кириченко, А.О. Тихомиров**

Дніпропетровський національний університет;

<sup>1</sup>Дніпропетровська державна медична академія

Пов'язані з віком погіршення пізнавальної функції корелюють з окисними молекулярними ушкодженнями в мозку. Оскільки нервові клітки надзвичайно чутливі до окисного стресу, це може бути однією з

причин пізнавального дефіциту. Гіперглікемія індукує в нервових клітинах окисний стрес і структурні зміни у синаптичних ділянках. Навчання і пам'ять щільно пов'язані з процесами динамічної синаптичної пластичності. Нервовоспецифічні білки регулюють формування і реорганізацію синапсів. Метою нашої роботи було вивчення впливу антиоксидантів – мелатоніну і  $\alpha$ -токоферолу на експресію молекули клітинної адгезії нейронів (NCAM) і гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у мозку щурів з стрептозотоциніндукованим діабетом і процеси пам'яті і навчання. Діабетичний стан викликали введенням стрептозотоцину (СТЗ; 15 мг/кг). Досліджували вплив щоденного введення мелатоніну (10 мг/кг) і  $\alpha$ -токоферолу (10 мг/кг) на процес навчання в групі щурів з діабетом і вміст NCAM і ГФКБ у відділах головного мозку щурів. Розвиток окисного стресу визначали через зміну вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Процес навчання досліджували у водному тесті Моріса, вміст і поліпептидний склад білків – методом імуноблотингу. У групі щурів з діабетом виявлене достовірне збільшення ( $P < 0,01$ ) часу рішення задач тесту в порівнянні з контрольною групою і групами щурів з діабетом, що одержували (28 діб) ін'єкції антиоксидантів. У групі щурів з діабетом виявлено достовірне ( $P < 0,01$ ) зниження експресії NCAM180, але не в групах тварин, які одержували ін'єкції мелатоніну та  $\alpha$ -токоферолу. В мозку щурів цієї групи виявлено також підвищення експресії цитоскелетного білка ГФКБ у 1,5 раза, що вказує на розвиток астрогліозу. Результати тесту Моріса показали значний дефіцит у групі щурів з діабетом і незначні відмінності показників у групі тварин з діабетом, які отримували ін'єкції антиоксидантів відносно контрольної групи. Все це разом вказує на участь цих білків у патогенезі діабетичної енцефалопатії. Водночас результати демонструють ефективність мелатоніну і  $\alpha$ -токоферолу в попередженні розвитку окисного стресу і пізнавального дефіциту у щурів з гіперглікемією, а також, на потенційну можливість використання антиоксидантів при вікових нейродегенеративних патологіях для зниження оксидативного стресу і пізнавального дефіциту.

## **ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА И СТРЕПТОКИНАЗЫ НА ЗВЕНЬЯ УГЛЕВОДНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6**

**В.Н. Никандров, В.С. Лукашевич, Р.И. Гронская**

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск  
nikandrov@fizio.bas-net.by

В 1999–2007 г. в нашей лаборатории получена совокупность пионерских данных о наличии у плазминогена (Pg) и его сильнейшего активатора по непротеиназному пути – стрептокиназы (SK) трофических свойств в отношении ряда типов клеток нервной ткани. Эти белки ускоряли созревание культур нервной ткани, улучшали адгезию клеток, обеспечивали их высокую выживаемость, увеличение количества, длины отростков и их арборизацию. Добавление SK к органотипическим культурам спинальных ганглиев крысы вызывало рост активности лактатдегидрогеназы в клетках. Это продиктовало дальнейшее изучение воздействия Pg и SK на активность энзимов углеводно-энергетического обмена. В настоящем сообщении изложены результаты, полученные на перевиваемой линии клеток крысиной глиомы С6. Клетки глиомы С6 культивировали по стандартному протоколу. Для проведения эксперимента монослойную культуру переводили на среду DMEM, содержащую 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), и в последующие сутки вносили DMEM, содержащую 0,5 % ЭТС или 50 нмоль/л Pg или 2000 ME SK. Через 24 ч отделяли клетки, гомогенизировали и определяли спектрофотометрически активность лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27; ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49; Г-6-ФДГ) и колориметрически – активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1; СДГ). Активность выражали в Е (или в мг формазана) на мг общего белка. Установлено, что добавление Pg в концентрации 50 нмоль/л достоверно подавляло активность ЛДГ в клетках глиомы С6 на 20%, не изменяя активность Г-6-ФДГ и вызвало тенденцию к угнетению активности СДГ на 47,6%. Добавление SK достоверно увеличивало активность ЛДГ на 33%, а активность Г-6-ФДГ – на 41,8%, что сопровождалось



угнетением активности СДГ на 35,4%. Складывается впечатление, что вызываемое при добавлении P<sub>g</sub> подавление мобилизации резервов лактата, по-видимому, сказывается на состоянии реакций цикла трикарбоновых кислот, что отражает угнетение окисления сукцината. Стрептокиназа же способствует окислению лактата. На этом фоне снижение активности СДГ может свидетельствовать о переключении использования пирувата, например, в синтезе аминокислот или иных интермедиатов. Выяснение этого аспекта – задача наших дальнейших исследований.

### **ELECTRODIFFUSION OF GLUTAMATE INFLUENCES TRANSMISSION AT MOSSY FIBER – CEREBELLAR GRANULE CELL SYNAPSES**

**S. Sylantyev, L. Savtchenko, D. Rusakov**

Institute of Neurology, University College London, London, UK

The waveform of rapid synaptic responses determines signal transmission and integration properties in the brain. It has long been predicted that intra-cleft diffusion of electrically charged neurotransmitter molecules such as glutamate should be sensitive to the local electric fields exerted by receptor currents. We have recently shown that this phenomenon may affect the time course of EPSCs at Schaffer collateral - CA1 pyramidal cell synapses in the hippocampus. However, how common this phenomenon is amongst central synapses and to what extent it affects integration of synaptic inputs remains poorly understood. To address these issues in more favourable voltage-clamp conditions, we carried out experiments in cerebellar granule cells. Cerebellar granule cells are the smallest neurons in CNS with a compact spherical soma having from three to five short and weakly branching dendrites with glutamatergic synapses located at their endings. Such morphology makes this type of neurons electrically compact and, therefore, a proper object for the voltage-clamp experiments with a negligible influence of a space-clamp error at EPSPs which are recorded in a whole-cell mode. Firstly, we applied rapid (1 ms) pulses of glutamate to semi-intact granule cells pulled out of the acute cerebellar slice in whole-cell mode and found that the kinetics of the cell AMPA receptors were voltage-independent. In contrast, AMPA receptor mediated EPSCs evoked in these cells in situ by stimulation of mossy fibres were decelerated at positive compared to negative holding voltages, consistent with glutamate electrodiffusion in the cleft. This was also in line with the observation that the fast-dissociating AMPA receptor antagonist  $\gamma$ -DGG suppressed AMPA receptor mediated EPSCs to a greater extent at negative compared to positive voltages. Next, we investigated summation of synaptic inputs in granule cells evoked by bursts of repetitive stimuli applied to mossy fibres. We found that the time course of summation was affected by the local AMPA receptor current density, in the opposite direction at positive versus negative holding voltages. Our data suggest therefore that the influence of electric fields on the glutamate dwell time due to synaptic currents inside the synaptic cleft may affect integration properties of synaptic circuits in different areas of the brain.

### **ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КОЛАГЕНУ ТИПУ I, СИНТЕЗОВАНОГО В ШКІРІ ЗА УМОВ ІНГІБУВАННЯ ОКИСНОГО ДЕЗАМІНУВАННЯ ДІЄЮ МЕХАНІЧНОГО НАПРУЖЕННЯ**

**К.В. Фальченко, Т.В. Костіна, Н.А. Нікітіна, Н.І. Буланкіна**

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна  
kate.falchenko@inbox.ru

In vitro досліджено вплив інгібування окисного дезамінування  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп лізину та гідроксилізу в колагені I типу, і, як наслідок, зменшення в ньому спроможності для утворення внутрі- і міжмолекулярних ковалентних зшивок типу альдолей і шиффових основ, на формування і морфологію його фібрил. Інгібування окисного дезамінування в колагені, який синтезувався в шкірі 3-місячних щурів, здійсню-

вали за допомогою розтягуючої механічної напруги  $0,18 \text{ MN/m}^2$ . Штучні фібрили отримували самозбиранням їх в розчині  $1 \text{ M NaCl}$  при  $20^\circ \text{C}$  з колагену типу I, який синтезувався в шкірі у відсутності напруги та при її наявності. Утворення та динаміку визрівання фібрил досліджували протягом 22 діб. Їх морфологічні параметри контролювали мікрофотографічно за допомогою поляризаційної мікроскопії. Структурну стабільність фібрил оцінювали калориметрично за температурою і ентальпією денатурації. Виявлено, що в обох випадках, з часом, фібрили, що визрівають, групуються за довжинами, близькими до середніх значень, які відповідають 1–2, 4–5 і 8–9 довжинам молекул, а за діаметрами – близько 10–15 і 25–30 від значень їх товщини. Температура і ентальпія денатурації фібрил мають кожна по три значення, які відповідають трьом середнім довжинам агрегатів, причому обидва термодинамічних параметри, а, таким чином, і структурна стабільність цих агрегатів, зростають прямо пропорційно збільшенню їх розміру. Як питома частка фібрилярних агрегатів з малими розмірами, так і час утворення агрегатів з великими розмірами із колагену, в якому було заінгібовано окисне дезамінування і розвиток внутрі- і міжмолекулярних ковалентних зшивок, значно більші, ніж з колагену, в якому ці процеси не були пригнічені. Отримані результати вказують на особливості фібрилогенезу – важливого початкового етапу морфогенезу сполучної тканини при змінах у ній механічних напруг, які спостерігаються *in vivo* у великій кількості процесів – ембріональному розвитку, загоєнні ран, періодичній перебудові органів тощо.

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ІНОЗИТОЛТРИФОСФАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ ВНУТРІШНЬОЇ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ ПІРАМІДАЛЬНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА**

**О.А. Федоренко, С.М. Марченко**

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

Наша робота присвячена дослідженню інозитолтрифосфатних рецепторів ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), які експресуються на внутрішньоклітинних мембранах. Використовуючи метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patches, у режимі фіксації потенціалу були досліджені іонні канали на внутрішній мембрані ізольованих ядер пірамідальних нейронів CA1 ділянки гіпокампа щурів. Встановлено, що вірогідність відкритого стану каналів  $\text{IP}_3\text{Rs}$  на позитивних потенціалах є значно вищою, ніж на негативних. Це відбувається внаслідок того, що на негативних потенціалах час відкритого стану та частота спрацьовувань каналу істотно знижується. Кластеризація  $\text{IP}_3\text{Rs}$  у клітинних мембранах має велике значення у їх функціонуванні. Так, зокрема, вірогідність відкритого стану поодинокого каналу в кластері залежить від кількості каналів, які знаходяться поруч. Крім того, наші результати говорять про алостеричні взаємодії між  $\text{IP}_3\text{Rs}$  у кластері. Отримані нами результати дають змогу запропонувати новий механізм регуляції тривалості кальцієвого сигналу в ядрі центральних нейронів. Ми припускаємо, що потенціалзалежне інгібування  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , яке спостерігається при негативних потенціалах, є однією з причин припинення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  з перинуклеарного простору всередину ядра, і таким чином призводить до термінації кальцієвого сигналу.

## **СПЕЦИФІЧНІ ЗМІНИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ, ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ КАЛЬЦІЄВИМИ КАНАЛАМИ Т-ТИПУ ТА КАНАЛАМИ TRPV1, В ПЕРВИННИХ НОЦИЦЕПТОРАХ ГІПЕР- ТА ГІПОАЛГЕЗОВАНИХ ТВАРИН З ДІАБЕТОМ**

**Є. В. Хомула<sup>1</sup>, В. Ю. Вятченко-Карпінський<sup>2</sup>, П. В. Білан<sup>2</sup>, Н. В. Войтенко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ;

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

Периферична діабетична нейропатія (ПДН) – одне з найчастіших ранніх ускладнень цукрового діабету. ПДН часто (40 – 50 % випадків) супроводжується різними порушеннями больової чутливості: термічна

та механічна гіпералгезія й тактильна алодинія (характерні на ранніх стадіях), що прогресує в термічну та механічну гіпоалгезію й навіть втрату больової чутливості з розвитком ПДН. Детальні молекулярні механізми цих змін невідомі, та їх дослідження важливе й актуальне як з фундаментальної, так і з терапевтичної точки зору. В цьому дослідженні ми акцентували увагу на виявленні та вивченні можливих змін у функціонуванні низькопорогових потенціалкерованих кальцієвих каналів (Т-типу, ПККТТ) та ванілоїдних рецепторів (каналів TRPV1). Відомо, що ПККТТ і TRPV1 – важливі учасники внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації. А за результатами нещодавніх досліджень ці іонні канали активно задіяні в процесі сприйняття болю (ноцицепції). Зміни їх функціонування за умов нейропатії відіграють істотну роль у модуляції збудливості больових нейронів (ноцицепторів), що може бути молекулярною основою гіпер- та гіпоалгезії. У молодих самців щурів віком 9–10 тиж зі стрептозототиніндукованим (на 3-му тижні життя) діабетом (модель діабету 1 типу) зазвичай однаково часто зустрічаються як термічна гіпер-, так і гіпоалгезія. На цій моделі ми дослідили кореляцію між наявністю та характером змін термічної ноцицепції та величинами струмів і відповідних транзєнтів цитозольної концентрації іонів кальцію (надалі транзєнти), викликаних активацією ПККТТ та TRPV1, у тварин з діабетом у порівнянні з контролем. Щури з діабетом були розділені на 3 групи за результатами тесту Харгрейвса термічної больової чутливості: гіпералгезовані, гіпоалгезовані та нормалгезовані. Експерименти проводилися на первинних ноцицепторах (ПН), що іннервують задні лапи щурів. ПН ідентифікувалися як малі ізолектин-Б4 позитивні капсаїцинчутливі ДКГ-нейрони, що відповідають спінальним сегментам L4–L6. Струми реєструвалися в гостроізолюваних нейронах методом patch-clamp у конфігурації «ціла клітина». Транзєнти реєструвалися за допомогою Фура-2, що завантажувалася в клітину через піпетку під час patch-clamp. TRPV1 активувалися прикладанням капсаїцину (2 мкмоль/л) в кінці реєстрації. При аналізі функціонування ПККТТ було виявлено, що пікова щільність струму (ПЩС) швидких ПККТТ та амплітуди транзєнтів значно зростає лише при гіпералгезії. Водночас лише при гіпо- та нормоалгезії зменшується ПЩС повільних ПККТТ. У всіх тварин з діабетом спостерігався істотний зсув стаціонарної інактивації в бік деполяризації. Кінетика інактивації та активаційні показники не зазнали істотних змін. ПЩС та амплітуди транзєнтів, викликаних активацією TRPV1, були істотно більшими в ПН гіпералгезованих тварин та меншими в ПН гіпо- та нормоалгезованих тварин. Таким чином, для різних типів порушень термоноцицепції нами було виявлено специфічні зміни кальцієвої сигналізації, опосередкованої активністю ПККТТ і TRPV1. Ми припускаємо, що ці зміни можуть робити істотний внесок у розвиток симптомів периферичної діабетичної нейропатії.

## **ВПЛИВ ПОЛІПЕПТИДНИХ ФАКТОРІВ РОСТУ НА КАЛЬЦІЙТРАНСПОРТНІ МЕХАНІЗМИ У НОРМАЛЬНИХ І ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ**

**О.Я. Чупашко, З.Д. Воробець**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Відомо, що всі інтегральні механізми в організмі, пов'язані, зокрема з морфогенетичними процесами, зазнають впливу специфічних гормоноподібних регуляторів локальної дії, так званих поліпептидних факторів росту (ПФР). Враховуючи важливість проблеми розуміння сигнальних механізмів активування злоякісної трансформації клітин та суті регулювання процесів клітинної проліферації, проведено комплексне дослідження впливу ПФР (трансформуючого фактора росту типу  $\beta$  (ТФР- $\beta$ ) та епідермального фактора росту (ЕФР)) на механізми транспорту кальцію та стан системи вільнорадикального гомеостазу у нормальних фібробластах білих мишей і карциномних клітинах людини. Оцінювали одинарний і поєднаний ефекти впливу ПФР на досліджувані процеси. Нами встановлено, що ТФР- $\beta$  та його поєднання з ЕФР підвищують швидкість транспорту кальцію в нормальні фібробласти мишей і клітини аденокарциноми легенів людини. Відзначено, що одинарний вплив ТФР- $\beta$  призводить до активації механізмів екструзії внутрішньоклітинного кальцію. Разом з тим виявлено, що зазначені ефекти впливу ПФР тісно

спряжені з активацією  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази нормальних клітин. Такий характер молекулярної взаємодії підтримується адекватною індукцією антиоксидантних ензимів та ефективною утилізацією вільнорадикальних сполук. Напротивагу, встановлено, що низька інтенсивність екструзії кальцію в карциномних клітинах під дією комплексного впливу ПФР корелює з низькою активністю  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази на фоні супресії каталазної активності та високого рівня процесів ліпопероксидації. Неоднозначність одинарного та поєднаного впливу локальних сигнальних молекул на кальційтранспортні системи та неоднотипна скерованість асоційованих з ними процесів у нормальних і пухлинних клітинах потребує подальших досліджень за цим напрямком.

## **ФАРМАКОЛОГІЧНІ ТА КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИКЛИКАНИХ ПОСТСИНАПТИЧНИХ СТРУМІВ У СУМІСНІЙ КУЛЬТУРІ НЕЙРОНІВ ДОРСАЛЬНИХ РОГІВ СПИННОГО МОЗКУ ТА СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ ЩУРА**

**М. С. Шипшина, М. С. Веселовський**

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

Вивчення характеру трансмісії між нейронами спінальних гангліїв (СГ) і клітинами дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) дають змогу більш повноцінно розкрити механізми, що лежать в основі формування різних видів чутливості на спінальному рівні. За допомогою аналізу викликаних постсинаптичних струмів (ВПСС) нами були ідентифіковані деякі типи нейромедіаторів, що беруть участь у передачі сигналу від СГ до нейронів ДРСМ. Реєстрація ВПСС між парами «нейрон СГ – нейрон ДРСМ» відбувалася за допомогою методу фіксації потенціалів у конфігураціях «ціла клітина». Аналізувалися ВПСС на мембрані клітин ДРСМ, викликаних внутрішньоклітинною стимуляцією нейронів СГ у кожній парі. Серед зареєстрованих струмів збуджувальні та гальмівні ВПСС були представлені приблизно в рівних відсоткових співвідношеннях. При цьому тип ВПСС мало залежав від розмірів клітин. Збуджувальні ВПСС визначили неоднозначність у кінетиці спаду. Їх спад  $70\% \pm 10\%$  апроксимувався однією експонентою ( $\tau = 4,5 \text{ мс} \pm 0,4 \text{ мс}$ ), а спад інших  $30\% \pm 10\%$  – двома експонентами ( $\tau_1 = 3,0 \pm 0,6$ ,  $\tau_2 = 39,8 \text{ мс} \pm 0,60 \text{ мс}$ ). Вольт-амперна характеристика збуджувальних ВПСС мала лінійний вигляд (потенціал реверсії  $0 \text{ мВ} \pm 10 \text{ мВ}$ ). Аплікація антагоніста АМПА-рецепторів DNQX в концентрації  $10 \text{ мкмоль/л}$  призводила до повного блокування збуджувальних ВПСС у більшості випадків при підтримуваному потенціалі  $-30 \text{ мВ}$ . У  $17\%$  випадків прикладання  $10 \text{ мкмоль/л}$  DNQX за тих самих умов викликало стабільне зниження амплітуди, до того ж аплікація  $20 \text{ мкмоль/л}$  D-APV, антагоніста НМДА-рецепторів, повністю блокувала залишковий струм. Амплітуди гальмівних ВПСС лінійно залежали від підтримуваного потенціалу на клітинній мембрані. Їх потенціал реверсії відповідав рівноважному потенціалу для СГ, розрахованому за рівнянням Нернста для використовуваних розчинів. Спад гальмівних ВПСС апроксимувався однією експонентою ( $\tau = 15,2 \text{ мс} \pm 0,6 \text{ мс}$ ). Прикладання бікукуліну, блокактора рецепторів ГАМК-А в концентрації  $10 \text{ мкмоль/л}$  не викликало суттєвого зниження амплітуд гальмівних ВПСС, тоді як подальша аплікація  $1 \text{ мкмоль/л}$  стрихніну, антагоніста гліцинових рецепторів, повністю блокувала реєстровані гальмівні ВПСС. Таким чином, в умовах сумісної культури передача збуджувального сигналу від нейронів СГ клітинам ДРСМ відбувається, в основному, за посередництвом АМПА-рецепторів, тоді як внесок НМДА-рецепторів у реалізацію збуджувальних ВПСС є незначним. У реалізації гальмівного сигналу між парами «нейрон СГ – нейрон ДРСМ» брали участь гліцинові рецептори.