

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

**ШКРИЛЬ В'ЯЧЕСЛАВ МИХАЙЛОВИЧ**



В.М. Шкриль

УДК 577.352:546.41

**РІАНОДИН РЕЦЕПТОР ОПОСЕРЕДКОВАНА КАЛЬЦІЄВА СИГНАЛІЗАЦІЯ  
В М'ЯЗОВИХ І НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ**

03.00.02 – біофізика

Реферат

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

**Київ – 2024**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

**Науковий  
консультант:**

доктор біологічних наук, професор  
**Лук'янець Олена Олександрівна**  
заст. директора з наукової роботи, завідувач відділу  
біофізики іонних каналів Інституту фізіології  
ім. О.О. Богомольця НАН України  
Київ, Україна

**Офіційні опоненти:**

академік НАН України, доктор біол. наук, професор  
**Костерін Сергій Олексійович**  
заст. директора з наукової роботи, завідувач відділу біохімії  
м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  
Київ, Україна

доктор біологічних наук, професор  
**Жолос Олександр Вікторович**  
завідувач кафедри біофізики та нейробиології ННЦ «Інститут  
біології та медицини» Київського національного  
університету ім. Тараса Шевченка  
Київ, Україна

доктор біологічних наук, професор  
**Фафула Роман Володимирович**  
завідувач кафедри біофізики Львівського національного  
медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України  
Львів, Україна

Захист відбудеться 18 червня 2024 року о 12:00 годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за  
адресою: 01024, м. Київ, вулиця Богомольця,4

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту фізіології  
ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вулиця Богомольця,4

Реферат дисертації розміщений на сайті Інституту 9 травня 2024 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Літовка І. Г.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Ріанодинові рецептори (RyRs) є важливими компонентами кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах. Вони є одними з основних структур, які контролюють вивільнення кальцію з сарко(ендо)плазматичного ретикулума в цитоплазму. Ці рецептори унікальні тим, що їх активність може бути регульована як підвищенням, так і зниженням концентрації внутрішньоклітинного кальцію (Woll and Van Petegem, 2022).

Іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) є поширеним вторинним посередником, який в збудливих клітинах контролює багато фізіологічних шляхів, таких як збудження, м'язове скорочення, вивільнення медіаторів, синаптичної пластичності, секреція, запліднення, транскрипція генів та апоптозу тощо (Pozzan et al., 1994, Berridge et al., 2000, Eisner et al., 2023). Процес вивільнення кальцію з депо має велике значення для функціонування м'язів і нервової системи.

На субклітинному рівні активність RyRs реєструється як кальцієві спалахи, які розглядаються як локальні зміни концентрації кальцію під час його вивільнення з саркоплазматичного ретикулума (CP) внаслідок одночасного відкриття декількох RyRs. Динаміка  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів є важливою для кальцієвої сигналізації. Численні експериментальні, комп'ютерні та біофізичні дослідження були спрямовані на вивчення механізмів ініціації, припинення та регуляції кальцієвих спалахів (Hoang-Trong et al., 2015). Розуміння ролі як спалахів, так і роботи залучених RyRs на рівні регуляції та динаміки кальцієвого сигналу у нормі та патології слугує основою для з'ясування функціональних змін  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу на клітинному або субклітинному рівнях.

Актуальність досліджень ріанодинових рецепторів в кальцієвій сигналізації полягає в тому, що вони є потенційними мішенями для створення нових медичних препаратів для лікування різних захворювань, пов'язаних з порушенням кальцієвої концентрації в клітинах. Наприклад, деякі хвороби м'язів, такі як дистрофія м'язових волокон, аритмії серця, а також нейродегенеративні захворювання, можуть бути пов'язані зі зміною функціональності RyRs.

Внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  регулюється за допомогою різних молекулярних механізмів. Це включає іонні канали, кальцій-зв'язувальні білки, канали вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо, а також участь обмінників або pomp, які забезпечують виведення кальцію з цитозолу клітини. У збудливих клітинах, таких як нейрони або м'язові клітини, зумовлений деполяризацією вхід кальцію може додатково призводити до збільшення концентрації цього іону завдяки вивільненню з кальцієвих депо, що здійснює регуляційний вплив на відповідні клітинні функції (Augustine et al., 2003, Endo, 2009, Dewenter et al., 2017).

Внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  змінюється від 50 nM у стані спокою до близько 10 мкM на піках фізіологічних сигналів (Berridge et al., 2000). Вхід  $\text{Ca}^{2+}$  із позаклітинного середовища здійснюється під час активації потенціал-керованих кальцієвих каналів (VGCC), іонотропних рецепторів глутамату (NMDA) та ацетилхолінових рецепторів, а також каналів транзйентного рецепторного потенціалу (TRPV-каналів) плазматичної мембрани. Основною внутрішньоклітинною структурою, яка сприймає та обробляє кальцієві сигнали, що надходять від

кальцієвих каналів плазматичної мембрани, є ендоплазматичний ретикулум (ER); відповідна структура в м'язових волокнах визначена як саркоплазматичний ретикулум (SR).

Ріанодинові рецептори (RyRs) — це клас кальцієвих каналів, розташованих на мембрані ендоплазматичного ретикулуму (або саркоплазматичного ретикулуму в м'язових клітинах). Коли ріанодиновий рецептор активується, він відкривається, дозволяючи  $\text{Ca}^{2+}$  витікати з ендоплазматичного ретикулуму або саркоплазматичного ретикулуму в цитозоль. В серцевих і скелетних м'язах ріанодинові рецептори беруть участь в процесі збудження-скорочення, в якому деполяризація мембрани клітини викликає вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму (Bers, 2002).

У ссавців було ідентифіковано три ізоформи RyRs (RyR1, RyR2 і RyR3), які кодуються трьома різними генами на різних хромосомах. RyR1 і RyR2 знайдені переважно в скелетних і серцевих м'язах відповідно, де вони відіграють центральну роль у зв'язку збудження-скорочення (Fill and Copello, 2002). RyR3 був виявлений у пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу, що призводять до специфічних змін у синаптичній пластичності гіпокампу (Balschun et al., 1999).

Активність ріанодинових рецепторів може бути регульована різними факторами, включаючи зміни в концентрації кальцію, фосфорилуванням, а також взаємодію з іншими білками. Ріанодинові рецептори чутливі до внутрішньоклітинного кальцію, тому коли концентрація кальцію в цитозолі зростає, це може стимулювати вивільнення кальцію через ці рецептори, процес відомий як кальцій-індуковане вивільнення кальцію (CICR).

Одним із зручних об'єктів для вивчення зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію, опосередкованої ріанодиновими рецепторами є кардіоміоцити. У цих клітинах, за фізіологічних умов, реалізовано механізм кальцій-індукованого вивільнення кальцію, коли збільшення концентрації кальцію біля RyR2 спроможне відкрити сам канал (Liang, 2008, Dewenter et al., 2017).

Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з SR складається із дискретних подій вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , які мають стереотипний вигляд, та може бути візуалізовано за допомогою конфокальної флуоресцентної мікроскопії та флуоресцентних  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих барвників і отримали назву  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks; (Cheng et al., 1993, Nelson et al., 1995, Tsugorka et al., 1995)). Це сукупне явище, створене групою RyRs каналів, визначених як кластер каналів вивільнення або одиниці вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (CRU; (Franzini-Armstrong and Jorgensen, 1994)).

Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з SR є обов'язковим кроком в процесі спряження збудження-скорочення (ЕСС) скелетного м'яза. Так під час деполяризації поперечної трубочастої мембрани та активація DHPRs та RyRs відбувається вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з SR (Nakai et al., 1996, Ríos et al., 1993, Schneider and Chandler, 1973). Взаємодія DHPR та RyRs в скелетному м'язі алостерична, за допомогою датчику напруги та активації RyR не вимагає  $\text{Ca}^{2+}$  завдяки CICR (Rios and Pizarro, 1988, Shirokova et al., 1996). За фізіологічних умов  $\text{Ca}^{2+}$ -спалахи майже не зафіксовано в інтактних скелетних м'язових волокнах дорослих ссавців (Conklin et al., 1999). Кілька маніпуляцій можуть усунути фізіологічне гальмування CICR у м'язових клітинах ссавців. Такі втручання як пермеабілізація мембрани (Kirsch et al., 2001, Lamb, 2002), порушення функції мітохондрій (Isaeva and Shirokova, 2003) та осмотичний шок викликають появу  $\text{Ca}^{2+}$

спалахів в інтактних м'язових волокнах (Wang et al., 2005). Враховуючи той факт, що механізми виявлення CICR (та і  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів) у м'язах ссавців досі залишається неясним, розуміння таких складних біофізичних процесів є важливою задачею.

Мітохондрії виконують не лише функцію фабрики по виробництву АТФ, але також грають ключову роль у інших клітинних процесах. Збільшення концентрації кальцію в мітохондрії посилює виробництво нікотинамідаденіндинуклеотиду (NADH), транспорт електронів, змінює вміст протонів, та сприяє виробництву активних форм кисню (ROS; (Duchen, 2000, Hajnóczky et al., 1999, Rizzuto et al., 2004)). Тому важливо з'ясувати вплив цих речовин на зміну концентрації кальцію та їх взаємозв'язок з вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з СР.

ROS беруть участь у регуляції різних сигнальних подій у скелетних м'язах, таких як гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  та скорочення м'язів (Andrade et al., 1998, Pattwell and Jackson, 2004, Posterino et al., 2003). Вважається, що окислення або нітрозативна модифікація RyRs через збільшену концентрацію реактивних окислювальних речовин може, принаймні частково, відповідати за появу  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів (або CICR). Важливо перевірити, чи ROS-залежні механізми відповідальні за розвиток  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у скелетних м'язах.

У кардіоміоцитах поява  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів відбувається за рахунок CICR не тільки для ініціації даної події, але й для поширення активації в кластері (Cheng et al., 1993, Endo et al., 1970, Fabiato and Fabiato, 1978).  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи виникають у міоцитах шлуночків (Niggli and Shirokova, 2007) та передсердь серця (Blatter et al., 1997, Kockskamper et al., 2001, Sheehan et al., 2006). Спонтанність спалахів  $\text{Ca}^{2+}$  та невизначеність місця їх вивільнення ускладнюють точне визначення параметрів спалахів  $\text{Ca}^{2+}$  та потребують поліпшення методів дослідження цих явищ. Додатково, сучасні можливості швидкої конфокальної мікроскопії надають змогу детальніше досліджувати зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію у міоцитах міокарду як на локальному, так і на рівні транзйентних змін від цілої клітини.

Інша картина  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації спостерігається у нейронах головного мозку. Так RyRs у периферичних і центральних нейронах можуть підсилювати і подовжувати вхідні  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали за рахунок CICR (Holliday et al., 1991, Kano et al., 1995, Llano et al., 1994). Деякі дослідження показали, що виснаження або блокування ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$  депо суттєво не змінює амплітуду і форму  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенту індукованого деполаризацію та не вносять суттєвого внеску у  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенти, викликаних низькочастотною активністю (Garaschuk et al., 1997). Однак, було встановлено, що у сомі пірамідальних нейронів є ретикулярна мережа ER, яка поширюється на дендрити та на всю довжину аксона, включаючи пресинаптичні бутони (de Juan-Sanz et al., 2017). Крім того, повідомлялося, що повторна тетанічна синаптична стимуляція пірамідальних клітин CA1 зони на зрізах гіпокампу індукують вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з дендритних або пресинаптичних ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$  депо (Alford et al., 1993, Tran and Stricker, 2021). Таким чином, роль ріанодинових рецепторів у регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію в нейронах потребує подальших досліджень.

Дисфункція RyRs може привести до порушень у вивільненні кальцію з саркоплазматичного ретикулуму, що, в свою чергу, спричиняє м'язову слабкість та дегенерацію. Неправильне функціонування RyRs у серцевих клітинах може спричинити порушення у циклічних змінах концентрації кальцію, які необхідні для

нормального скорочення серцевого м'яза, та призвести до аритмій. Ці порушення також можуть бути пов'язані із різними захворюваннями, включаючи м'язову дистрофію Дюшена, серцеві аритмії, та центральні нервові розлади, які спостерігаються, наприклад, при хворобі Альцгеймера.

Таким чином, представлене дослідження мало на меті встановити, яким чином відбувається зміна кальцієвої сигналізації при активації ріанодинових рецепторів 1, 2 та 3 типів та встановлення кальцій-індукованого вивільнення кальцію як в нормі так патології, опираючись на біофізичні підходи дослідження кальцієвих сигналів з використанням швидкої конфокальної мікроскопії. Ця проблема розглянута на прикладі кардіоміоцитів, скелетних м'язових волокон та пірамідальних нейронів гіпокампу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідної тематики відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та інших програм, що виконуються відділом (номер державної реєстрації 0118U007344, 0116U004470 та 0120U001281). Частина роботи була виконана в рамках програм міжнародного співробітництва “Клітинні системи в нормі на патології” в Університеті Медицини та Стоматології Нью-Джерсі, США та Медичному Центрі Університету Раш, Чикаго, США.

**Мета дослідження:** полягала у з'ясуванні ролі ріанодинових рецепторів у формуванні та модуляції концентрації іонів кальцію у м'язових і нервових клітинах на рівні клітини, чи окремої її ділянки.

**Завдання дослідження.** Згідно з цією метою були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити просторово-часові властивості змін концентрації іонів кальцію на рівні елементарних та глобальних кальцієвих сигналів за участі ріанодинових рецепторів в міоцитах передсердь та шлуночків.
2. Дослідити активність ріанодинових рецепторів як поодиноких подій вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулу — спалахи  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою багатомірної конфокальної мікроскопії.
3. В міоцитах передсердь дослідити альтернації кальцію при постійній частоті стимуляції міоцита. З'ясувати роль потенціал-керованих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів плазматичної мембрани та кінцевого, діастолічного рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в СР під час  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій в міоцитах передсердь. Проаналізувати вплив рефрактерності до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР, за рахунок RyRs, як можливого чинника виникнення  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій.
4. Дослідити можливість мітохондрій секвеструвати кальцій який вивільнюється з СР за рахунок RyRs в скелетних м'язових волокнах. Вивчити функціональне розташування мітохондрій та СР.
5. Встановити вплив мітохондріального окислювально-відновлювального стану на регуляцію вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР за участі RyRs та появу  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у пермеабілізованих скелетних м'язових волокнах ссавців.
6. Виявити взаємозв'язок між балансом активних форм кисню та аномальним сплеском  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у скелетних м'язових волокнах лінії миші mdx після механічного стресу у вигляді осмотичного шоку та порівняти з нормальними

тваринами. Встановити, чи можуть поглиначі ROS інгібувати стрес-індуковані  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи. Визначити задіяні джерела ROS у скелетних м'язових волокнах mdx, при осмотичному стресі.

7. Визначити, чи призводить штучне локалізоване підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в скелетних м'язових волокнах миші та жаби до вивільнення цього іона з CP при активації RyRs. Чи відповідають отримані реакції характеристикам "класичного" кальцій-індукованого вивільнення кальцію? З'ясувати відмінності у величині потоку вивільнення кальцію з CP та поріг активації RyRs кальцієм між м'язовими волокнами жаби та миші.
8. Дослідити просторово-часові властивості кальцієвого сигналу в пірамідальних нейронах гіпокампу щурів. Виявити роль RyRs в модуляції  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу під час короткочасної або тривалої стимуляції в різних частинах нейрона.

**Об'єкт дослідження:** регуляція концентрації іонів кальцію ріанодиновими рецепторами у м'язових і нервових клітинах.

**Предмет дослідження:** зміни та формування внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в кардіоміоцитах, скелетних м'язових волокнах та пірамідних нейронах гіпокампу за рахунок зміни активності ріанодинових рецепторів.

**Методи досліджень:** включають біофізичні підходи, такі як епіфлюоресцентна та конфокальна мікроскопія, з використанням кальцій-чутливих флуоресцентних барвників, для визначення змін концентрації кальцію; метод петч-клемп реєстрації трансмембранних  $\text{Ca}^{2+}$  струмів; локальне вивільнення зв'язаного кальцію за допомогою флешфотолізу; комп'ютерне моделювання та обробка кальцієвого сигналу для розрахунків потоків кальцію; статистична обробка числових результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Використання надшвидкісної конфокальної візуалізації динаміки  $\text{Ca}^{2+}$  в серцевих міоцитах дозволило виявити ступінчасту кінетику зростаючої фази  $\text{Ca}^{2+}$  спалаху. Показано, що динаміку збільшення  $\text{Ca}^{2+}$ , який входить у клітину та кальцій-індукованого вивільнення кальцію можливо достовірно розділити на рівні окремих центрів вивільнення кальцію як у клітинах передсердя, так і у шлуночків міокарда, як у часі, так і просторі.

Вперше було вивчено властивості  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів, що зареєстровані у місці вивільнення кальцію від групи каналів RyRs. Вони мали більшу амплітуду та модальний розподіл амплітуди з одною модою. Струм вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , який лежав в основі таких спалахів, становив 11 пА. Для досягнення цього струму потрібно активувати від 20 до 30 відкритих каналів RyRs.

Прямо показано, що в міоцитах передсердь зміна кінетики реституції вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму від стимулу до стимулу є ключовим причинним механізмом виникнення  $\text{Ca}^{2+}$ -альтернацій, як важливий механізм утворення серцевої аритмії.

Було ідентифіковано субклітинні мікродомени, в яких  $\text{Ca}^{2+}$  має переважний доступ до мітохондрій у функціональній та структурній близькості до CP у скелетних м'язах. Було виявлено наявність двох груп мітохондрій, одна з них розміщена безпосередньо біля CP, де  $\text{Ca}^{2+}$  поглинається мітохондріями завдяки відкриттю каналів RyRs.

Розкриті нові аспекти регуляції мітохондріального окислювального-відновлювального стану щодо регуляції вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із саркоплазматичного кальцієвого депо на прикладі активності групи RyRs в скелетних м'язах. ROS спричиняють аномальну активність RyRs в інтактних скелетних волокнах (появу кальцієвих спалахів) при осмотичному стресі. В дистрофічних волокнах скелетних м'язів під впливом осмотичного стресу, розбалансованість ROS сигналів призводить до того, що  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи з'являлися не тільки на периферії клітини, а також поширювалися в центр клітини, а інгібітори NAD(P)H-оксидази ефективно пригнічували стрес-індуковану активність ріанодинових рецепторів. Збільшення мітохондріального кальцію та посилення утворення мітохондріального ROS в mdx волокнах підсилює аномальні  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали.

Показано суперечливу роль  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з CP за рахунок відкриття каналів RyRs в скелетних м'язах. За фізіологічних умов у скелетних м'язових клітинах жаби були зареєстровані CICR-відповіді. Проте, у скелетних м'язових волокнах миші, RyRs не реагують на стимул кальцію до 8 мкМ, та мають значно нижчий потік вивільнення, що разом із значно вищим порогом активації рецепторів пояснює незначну відповідь при відсутності препаратів, що відкривають канали, та вказує на відсутність CICR у процесі збудження-скорочення у скелетних м'язах ссавців в нормі.

Отримані нові дані про роль RyRs у кальцієвій сигналізації в пірамідальних нейронах гіпокампу щурів. Зростання концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  є асинхронним і затримується в центральній ділянці порівняно з примембранними ділянками або ділянками дендритного дерева, де спостерігається швидший розвиток  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу. Короткочасна електрична стимуляція недостатня для того, щоб викликати вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулулу через кальцій-індуковане вивільнення кальцію. Натомість, для активації RyRs та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  необхідна тривала стимуляція.

Результати дослідження є внеском у комплексне розуміння ріанодин рецептор-опосередкованої кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах у нормі та патології.

**Теоретичне та практичне значення роботи.** Представлена робота є важливою в галузі біофізики, оскільки розширює сучасні уявлення щодо функції ріанодинових рецепторів у модуляції клітинної концентрації кальцію в збудливих клітинах, як з теоретичної, так і з практичної точки зору. У роботі детально розглянуті біофізичні властивості кальцієвої сигналізації м'язової і нервової клітин, як на рівні окремих органел: саркоплазматичного ретикулулу та мітохондрії, так і мікроклітинних доменів та центрів вивільнення кальцію, шляхом регуляції окислювально-відновлювального стану клітини, мітохондріального NADH сигналу або за участі трансмембранних  $\text{Ca}^{2+}$  каналів L-типу та активності ріанодинових рецепторів за рахунок кальцій-індукованого вивільнення кальцію.

Результати цього дослідження є значним кроком вперед у нашому розумінні механізмів, що лежать в основі альтернуючого серцебиття, та надає можливостей розробки нових стратегій лікування аритмій.



Порушення регуляції RyRs призводить до різних захворювань. Тому розуміння процесів, які регулюють активність RyRs, має вирішальне значення для розробки терапевтичних стратегій. Результати цього дослідження не тільки поглиблюють наше розуміння фундаментальних принципів внутрішньоклітинної  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації, але надають уявлення про молекулярну основу різних захворювань, пов'язаних з дисфункцією RyRs.

Вперше запропоновано методичні підходи дослідження  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у місці вивільнення з CP, ґрунтовані на тривимірному конфокальному скануванні флуоресценції, що має бути використаним для дослідження RyRs, визначати потік вивільнення кальцію, та надає можливість використати її для фармакологічних досліджень ріанодинових рецепторів.

Запропоновано методичні підходи для вивчення біофізичних процесів збудливих клітин, базуючись на швидкісній конфокальній візуалізації для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів з часовою роздільною здатністю, подібною до методу петч-клемп, але у менш інвазивний метод, з можливістю розділення по всій клітині.

Був запропонований новий метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах. Така методика дозволяє локально активувати окремі сайти вивільнення кальцію або групу RyRs каналів у живих клітинах, що може бути використано для вивчення їхніх структурних і функціональних деталей з високою точністю.

Також була адаптована та модифікована формула Грінкевича для визначення вмісту вільного кальцію в клітині при двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника при використанні ПЗЗ камери. Адаптація включає в себе корекцію фотознебарвлення та виправлення помилки віднімання фону. Ця модифікація необхідна для визначення концентрації кальцію двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника и повинна використовуватися в подальших дослідженнях.

Представлені результати мають загальне біологічне значення і поглиблюють наше розуміння кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах. З практичної точки зору, отримані дані є основою для подальшого вивчення молекулярних механізмів процесу перетворення збудження в скорочення як у кардіоміоцитах, так і в скелетних м'язових волокнах, а також розкривають розуміння ролі кальцій-залежних функцій у нервових клітинах.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є особистою працею здобувача. Мету, завдання роботи, методи досліджень, аналіз літературних та отриманих матеріалів проведено, опубліковано та викладено в представленій дисертаційній роботі особисто. Автором проведено науковий пошук та детальний аналіз наявних даних літератури щодо регуляції внутрішньоклітинного кальцію за рахунок ріанодинових рецепторів. При проведенні досліджень здобувачем особисто виконано основну частину експериментальної роботи, аналіз отриманих результатів, їх наукову інтерпретацію та узагальнення, формулювання висновків та написання статей. Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт. Автор щиро вдячний проф. Н. Широкова Школи Медицини Нью-Джерсі Університету Медицини та Стоматології Нью-Джерсі (Ньюарк, США), проф. Л.

Блатеру та проф. Е. Ріусу Медичного центру Університету РАШ (Чикаго, США) за плідну співпрацю. Частина експериментів була проведена у співпраці з д.б.н. Оленою Ісаєвою, PhD Figueroa L., PhD Maxwell J.T., PhD Domeier T.L., PhD Martins A.S., к.б.н. Наталією Розумною та к.б.н. Вітою Ганжою. Вони є співавторами відповідних статей. Автор щиро висловлює подяку науковому консультанту, професору О. О. Лук'янець, за невимовну підтримку та цінні поради під час написання дисертаційної роботи, та висловлює щирі подяки співробітникам відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця за підтримку у написанні дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на семінарах Інституту ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наступних міжнародних симпозіумах і з'їздах: Американського Біофізичного Товариства (Лонг Біч, 2005, Солт Лейк Сіті, 2006, Балтімор 2007, Лонг Біч 2008, Бостон, 2009, Сан Франциско, 2010, Балтімор 2011, Сан Дієго, 2012); Всеукраїнської конференції Товариства Нейронаук (Київ, 2017, 2022 Україна); Українського Фізіологічного Товариства (Київ, 2019, 2021, Україна) та XI з'їзд Українського біофізичного товариства (Київ, 2023 Україна).

**Публікації.** Результати дисертації викладено у 12 статтях (опублікованих у виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів; Q1 і Q2) та 5 статтях віднесених до третього і четвертого кuartилів (Q3 і Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, одним розділом у нейрофізіологічному нарисі, патентом на корисну модель та 27 тезах міжнародних конференцій та з'їздів.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи дослідження

**Приготування клітин.** Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до етичних принципів визначених Європейською Конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (86/609/ЄЕС; Європейська конвенція, Страсбург, 1986). Ці процедури були схвалені місцевим Комітетом з питань етики тварин при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, Україна) та Інституційним комітетом з питань догляду за тваринами та їх використання при Медичному центрі Університету РАШ в Чикаго (Дозвіл № 09-055). Крім того, всі процедури відповідають вимогам нормативних актів США та Великої Британії щодо проведення дослідів на тваринах (Drummond, 2009, #167). Ми доклали всіх можливих зусиль, для мінімізації кількості тварин та ступеня їх страждань, використовуваних у дослідженнях.

Міоцити шлуночків та передсердь були виділені від новозеландських білих кролів (2,5 кг; Myrtle's Rabbitry, Томпсонс, штат Теннессі, США) (Domeier et al., 2009, Kockskämper and Blatter, 2002).

Поодинокі волокна з довгого м'яза-розгинача пальців щурів (EDL) або підшовного м'яза (solius) розділяли вручну, як описано в роботах (Garcia and Schneider, 1993, Shirokova et al., 1996). Поодинокі волокна з м'яза-згинача великого пальця миші (FDB) роз'єднували за допомогою процедури, описаної в роботі (Wang et al., 1999). Волокна жаби виділялися, як описано раніше (Zhou et al., 2004).

Первинну культуру нейронів гіпокампу, отримували від новонароджених щурів лінії Вістар, як описано раніше (Shkryl et al., 1999). Дослідження проводили протягом 10-14 днів культивування.

**Вимірювання концентрації кальцію та конфокальна мікроскопія.** Зміни  $[Ca^{2+}]$  вимірювали за допомогою флуоресцентної лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Інтактні міоцити передсердь та шлуночків навантажували флуоресцентним  $Ca^{2+}$  індикатором Fluo-4/AM (Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія, США). Fluo-4 збуджували на 488 нм і вимірювали випромінювану флуоресценцію при довжині хвилі  $>515$  нм. Конфокальну візуалізацію з високою часовою роздільною здатністю здійснювали за допомогою щілинного скануючого конфокального мікроскопа (LSM 5 LIVE; Carl Zeiss, Оберкочен, Німеччина), оснащеного водоімерсійним об'єктивом  $63\times, 1.20$  N.A. (C-Apochromat; Carl Zeiss).

Для безпосереднього моніторингу  $[Ca^{2+}]$  у CP останній завантажували низькоафінним індикатором  $Ca^{2+}$  Fluo-5N (Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія, США) шляхом інкубації міоцитів шлуночків з 10 мкМ Fluo-5N/AM разом з 0,25% Pluronic F-127 в номінально вільному від  $Ca^{2+}$  зовнішньоклітинному розчині протягом 2,5 годин з додатковим 30-хвилинним відмиванням при  $37^{\circ}C$ .

Для моніторингу локальних змін автофлуоресценції мітохондріального NADH використовували двофотонний конфокальний сканер Radiance 2001 MP (Bio-Rad, Hercules, Каліфорнія, США), приєднаний до мікроскопа Nikon Eclipse TE 2000, обладнаного водоімерсійним об'єктивом  $\times 60, 1.2$  N.A. (Nikon, Токіо, Японія).

Для вимірювання епіфлуоресценції  $Ca^{2+}$  ми використовували CCD-камеру (Olympus XM10), встановлену на інвертованому мікроскопі Olympus IX71, оснащеному об'єктивом Olympus LUCPlanFFN  $20\times/0.45$  та системою освітлення MT10. Для подальшого аналізу даних розраховували співвідношення інтенсивності флуоресценції 340-380 нм (відношення; F340/F380) за протоколом (Shkryl, 2020).

**Електрофізіологія.** Експерименти з одночасного вимірювання  $[Ca^{2+}]$  та мембранного струму  $Ca^{2+}$  проводили на міоцитах шлуночків кролів за допомогою методу петч-клемп в конфігурації ціла клітина з використанням підсилювача Axopatch 200A, інтерфейсу Axon Digidata 1440A та програмного забезпечення pCLAMP 10.2 (Molecular Devices, Саннівейл, Каліфорнія, США). Розчин петч-піпетки містив (в мМ): 120 L-аспартат; 120 CsOH; 20 TEA-Cl; 20 HEPES; 1 L-глутатіон (відновлений); 1 DM-nitrophen; 4 ATP-Na, 0.25  $CaCl_2$  і 0,1 пентакалієвої солі Fluo-4; pH 7.2, відрегульований CsOH).

**Хімічні речовини, розчини та умови експерименту.** Покривне скло з культурою клітин нейронів гіпокампу поміщали в позаклітинний розчин, що містить в мМ: NaCl-140.0; KCl-2.0;  $CaCl_2$ -2.0;  $MgCl_2$ -2.0; HEPES-10.0; pH = 7.4. Всі хімічні речовини були отримані від Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, штат Мічиган, США). Стимуляцію електричним полем (EFS) здійснювали за стандартним протоколом, занурюючи в камеру два платинові електроди на відстані  $20\div 25$  мм один від одного та подаючи між ними імпульси струму (Jacobs and Meyer, 1997, Shkryl et al., 2012).  $Ca^{2+}$  -транзїєнти також індукували хімічно, застосовуючи деполаризуючий розчин, який містив 50,0 мМ KCl, що заміщував відповідну кількість NaCl в позаклітинний розчин.

Свіжовиділені кардіоміоцити поміщали на скляні покривні скельця в нормальний розчин Тирода (склад в мМ: 135 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-глюкози і 10 HEPES, pH 7.4 за допомогою NaOH).

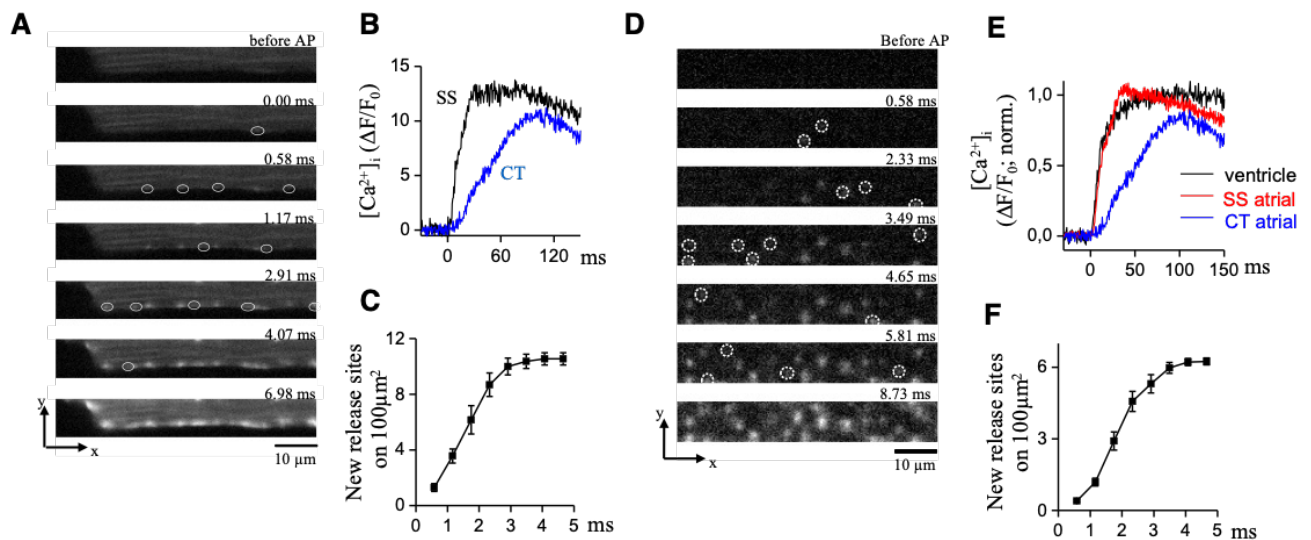
Ізотонічний розчин Рінгера містив (мм): 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 глюкози. Осмоляльність розчину становила ~300 мосмоль кг<sup>-1</sup>, та pH 7.0. Гіпотонічний розчин Рінгера містив (мм): 70 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 глюкози. Осмоляльність становила ~170 мосмоль кг<sup>-1</sup>, а pH 7.0. Усі експерименти проводили за кімнатної температури (22-25°C).

Експериментальні дані представлені як середнє арифметичне ± стандартна помилка (n - кількість вимірів). Статистичні порівняння виконувались за допомогою t-тесту Стьюдента, рівень P<0.05 приймався як достовірний. Аналіз даних проводився за допомогою середовища програмування IDL (ITT Visual Information Solutions).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 1. Реєстрація процесів вивільнення Ca<sup>2+</sup> в кардіоміоцитах міокарду.

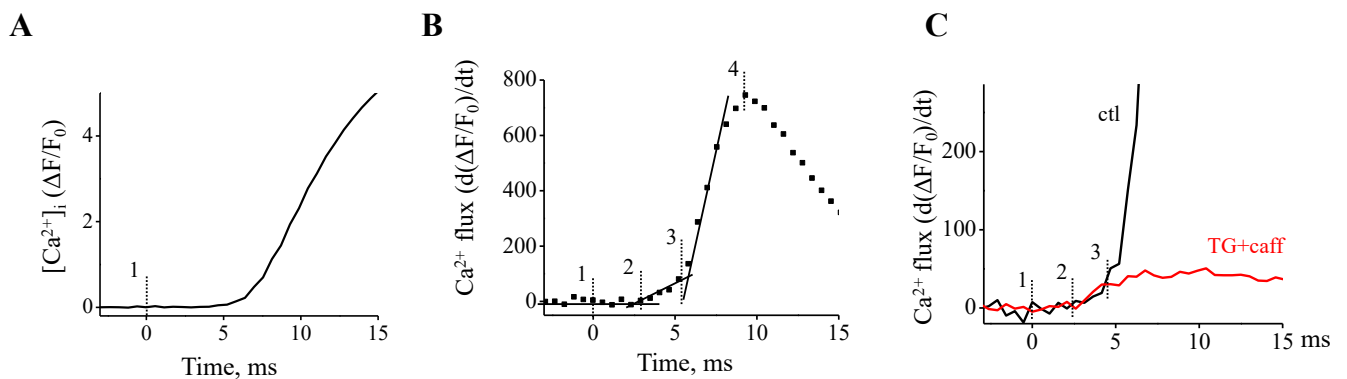
**Реєстрація вивільнення Ca<sup>2+</sup> в кардіоміоцитах за допомогою високошвидкісної конфокальної мікроскопії.** В кардіоміоцитах за фізіологічних умов реалізовано механізм кальцій-індукованого вивільнення кальцію, коли збільшення концентрації кальцію біля ріанодинового рецептору спроможне відкрити сам канал. Просторова і часова сумація дискретних подій, з окремих одиниць вивільнення Ca<sup>2+</sup> (CRU), які реєструються як спалахи кальцію, призводить до виникнення загальноклітинного Ca<sup>2+</sup>-транзйенту (Cheng et al., 1994). Ми використали швидку конфокальну мікроскопію для дослідження індукованих ПД транзйентів Ca<sup>2+</sup> в міоцитах передсердь і шлуночків.



**Рисунок 1.1.** ПД-індуковані Ca<sup>2+</sup>-транзйенти в інтактних міоцитах передсердь та шлуночків. Серія конфокальних x-y зображень ранньої фази Ca<sup>2+</sup> транзйенту в міоциті передсердь (A) та шлуночка (D), викликаного стимуляцією електричним полем. (B) Порівняння транзйентів Ca<sup>2+</sup> в субсарколеммальній області (SS) та в центральній області (CT). Кумулятивне залучення окремих областей вивільнення Ca<sup>2+</sup> міоцита передсердь (C) та шлуночка (F). Білі овали та кружечки позначають місця першого виявлення Ca<sup>2+</sup> вивільнення з CRU. (E) Нормалізовані транзйенти Ca<sup>2+</sup>, зареєстровані з різних областей.

На рис. 1.1A та D представлена послідовність двовимірних зображень  $[Ca^{2+}]$  ранньої фази електрично викликаного  $Ca^{2+}$  транзйенту, відповідно. Так в міоцитах передсердь вивільнення  $Ca^{2+}$  було просторово неоднорідним та з'являлося у дискретних ділянках периферії протягом  $3.0 \pm 0.1$  мс ( $n = 7$ ) для активації усіх периферійних сайтів вивільнення (рис. 1.1C). Після цього кальцій починав розповсюджуватися до центру клітини. В центральній, субклітинній ділянці  $Ca^{2+}$  зростає із певною затримкою (рис. 1.1B).

У міоцитах шлуночків локальні сигнали вивільнення  $Ca^{2+}$  з'являлись випадковим чином по всій клітині без чіткої субклітинної локалізації та не синхронно. Кількість активних CRU зростала постійно протягом  $3.9 \pm 0.1$  мс ( $n = 9$ ; рис. 1.1F). Зростання  $Ca^{2+}$  сигналів на периферії міоцита передсердь та по всій області міоцита шлуночка є майже однаковим, у той час як у центрі міоцита передсердь значно повільніше (рис. 1.1E).



**Рисунок 1.2. Субклітинні потоки  $Ca^{2+}$  під час ЕСС, ідентифіковані за допомогою швидкої реєстрації  $Ca^{2+}$ .** (А) Глобальний  $Ca^{2+}$ -транзйент. (В) Перша похідна  $\Delta F/F_0$  (с-1) сигналу з панелі А, яка відображає потік  $Ca^{2+}$ . (С) Просторово усереднений потік  $Ca^{2+}$  у контрольних умовах (Ctl) та під час інгібування функції СР за допомогою тапсигаргіну (TG; 1 мМ) і кофеїну (caff; 10 мМ).

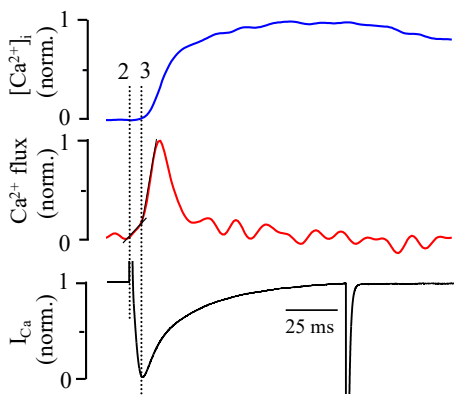
На рис. 1.2А зображено ранню фазу росту загальноклітинного глобального транзйенту  $Ca^{2+}$  у міоциті шлуночка. Для розділення на потоки було отримано першу похідну від цього сигналу, що зображено на рис. 1.2В. Аналіз потоків  $Ca^{2+}$  виявив декілька фаз змін сигналу. Перша фаза, між маркерами "1-2", відбувалася між часом прикладання електричного імпульсу для ініціації потенціалу дії та моментом початку зростання  $Ca^{2+}$  потоку. Це латентний період для кальцієвого сигналу, який склав  $2.5 \pm 0.3$  мс ( $n = 9$ ). Наступна фаза: між маркерами 2 та 3 відображає вхід кальцію у клітину через DHPR, де  $Ca^{2+}$  потік збільшується повільно. Третя фаза з часом  $t = 5.5 \pm 0.2$  мс, маркер "3" відповідає початку вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР за рахунок RyRs, де  $Ca^{2+}$  потік почав стрімко зростати, досягаючи пікового значення у маркеру "4" через  $9.9 \pm 0.7$  мс після початку стимулу.

Усунення вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР призвело до зупинки значного зростання потоку  $Ca^{2+}$ , яке зазвичай спостерігається після маркера "3". Однак латентний період ( $2.1 \pm 0.1$  мс;  $n = 11$ ) та подальше повільне зростання залишалися незмінними (рис. 1.2С). Пікове значення сигналу  $d(\Delta F/F_0)/dt$  досягало  $50 \pm 5$   $s^{-1}$  через  $7.7 \pm 0.7$  мс після електричного стимулу.

У міоцитах шлуночків зміна потоків  $Ca^{2+}$  в примембранному регіоні міоцита передсердь була подібною як у контролі, так і пригніченою функцією вивільнення

кальцію з СР. Проте в центральній ділянці міоцита передсердь зміна потоку кальцію починала з'являтися тільки після маркера "3", що стає більш явним при блокуванні функції вивільнення СР, тобто тільки після початку вивільнення кальцію в примембранній, сарколемній ділянці клітини. За відсутності системи Т-трубочок в міоцитах передсердь при деполяризації клітини  $\text{Ca}^{2+}$  входить тільки біля сарколеми та активує вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  в цих СР та поступово дифундує і активуючи віддалені ділянки міоцита з поступовим вивільненням кальцію та його дифузією до центру завдяки CICR.

Додатково оптично виміряні сигнали входу та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , було підтверджено, проводячи одночасне вимірювання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та мембранних  $\text{Ca}^{2+}$ -струмів ( $I_{\text{Ca}}$ ) методом петч-клемп (рис. 1.3). Міоцит був підтримуваний на потенціалі  $-40$  мВ і періодично деполяризовувався до  $+20$  мВ протягом  $100$  мс для активації максимального струму через L тип  $\text{Ca}^{2+}$  каналів. Сигнал потоку  $\text{Ca}^{2+}$  показував поступове зростання майже одразу після початку деполяризаційного імпульсу (маркер "2"), яке різко переходило в швидке підвищення (маркер "3"). Кальцієметрія з одночасною реєстрацією трансмембранного  $\text{Ca}^{2+}$  струму показала, що вивільнення кальцію відбувалося в час маркера "3", при максимальному струмі.

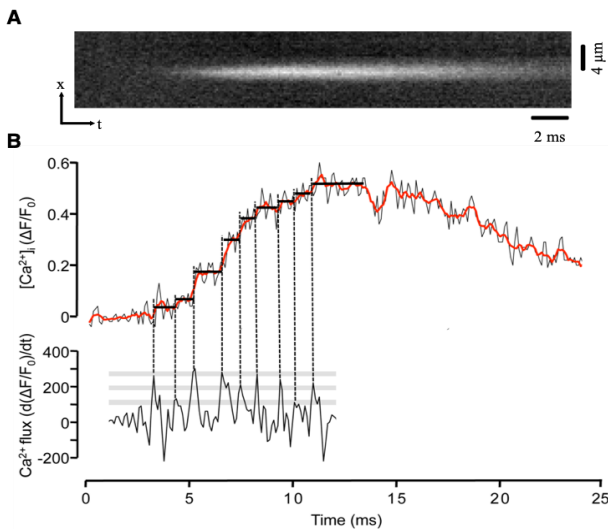


**Рисунок 1.3. Вимірювання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  і  $I_{\text{Ca}}$ .**

Подані криві відображають середні значення 15 послідовних деполяризаційних імпульсів, прикладених до однієї й тієї ж клітини, нормалізованих до відповідної максимальної амплітуди. Маркер "2" позначає початок деполяризаційного імпульсу; маркер "3" вказує на зміну в швидкості потоку, яка, ймовірно, корелює з активацією CICR.

Двовимірною реєстрацією транз'єнтів  $\text{Ca}^{2+}$  демонструє асинхронну активацію сайтів вивільнення. Це дозволяє послідовно фіксувати вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціал-керовані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали поверхневої мембрани, а також подальшу активацію  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ . Такий детальний розподіл потоків кальцію є важливим для розуміння змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію в міоцитах міокарду.

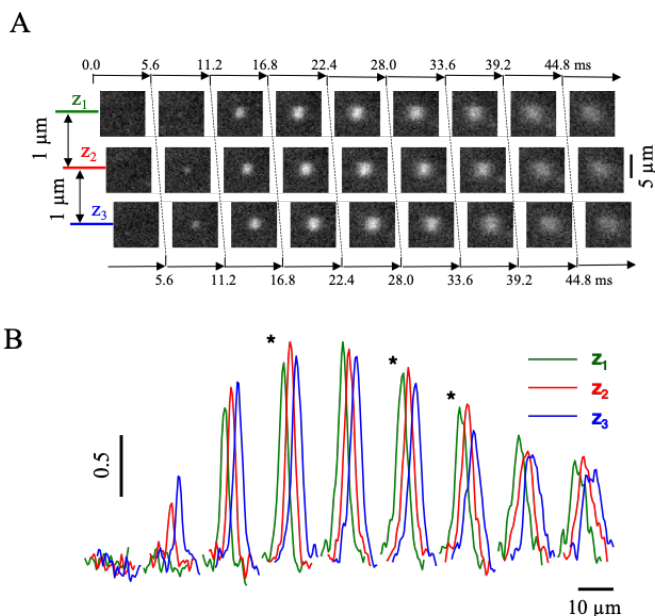
Загально прийнято, що спалахи  $\text{Ca}^{2+}$  виникають через координоване відкриття обмеженої кількості RyRs каналів, які відповідають за вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , та організовані в кластери на мембрані СР. Однак, питання про те, скільки окремих каналів вивільнення бере участь у формуванні сигналу спалаху, досі залишається предметом активних дискусій.



**Рисунок 1.4. Ультрашвидкий запис  $\text{Ca}^{2+}$  спалаху.** (А) Ультрашвидкий запис  $\text{Ca}^{2+}$  спалаху. (В) Вгорі: профіль  $\Delta F/F_0$  шириною в один піксель ( $0,3 \mu\text{м}$ ) з центру спалаху. Червона лінія відображає 5-точкове рухоме середнє. Внизу представлена перша похідна від сигналу  $\Delta F/F_0$  фази зростання спалаху, позначена як  $d(\Delta F/F_0)/dt$  (с-1). Вертикальними пунктирними лініями виділені максимуми  $d(\Delta F/F_0)/dt$ , які вказують на пікові значення потоку вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ .

У режимі лінійного сканування у часі з частотою 40 кГц (LSM 5 LIVE), як це представлено на рис. 1.4А, було досліджено спалахи  $\text{Ca}^{2+}$ . У поданому прикладі (подібні спостереження проводилися на 7 міоцитах) за допомогою цього методу було виявлено 9 дискретних складових змін у  $\text{Ca}^{2+}$  потоках, що свідчить про участь принаймні 9 RyRs каналів при спалаху. Отже, зростаюча фаза  $\text{Ca}^{2+}$  спалаху проявляє ступінчасту кінетику, що свідчить про участь групи RyRs каналів при вивільненні кальцію під час спалаху, надаючи потенційно цінну інформації про механізми відкриття каналів всередині CRU.

**Активності ріанодинових рецепторів як поодиноких подій вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР — спалахи  $\text{Ca}^{2+}$ , виявлених за допомогою конфокальної мікроскопії.** Точне виявлення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР через відкриття групи RyRs, які реєструються у вигляді кальцієвих спалахів, включає в собі складності через спонтанну природу таких явищ. Використання конфокального сканування у лінії або у площі в часі призводить до невизначеності точного виявлення місця вивільнення кальцію. Отримані дані таких подій характеризуються визначеними параметрами із певними похибками (Rios et al., 1999).

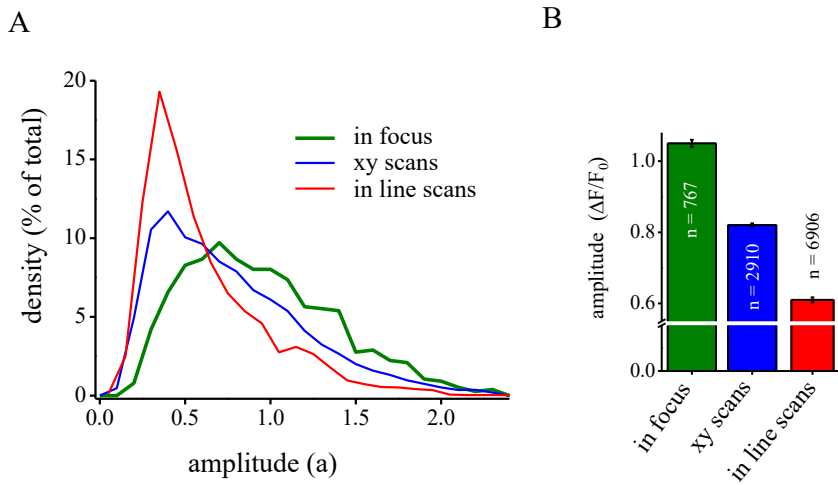


**Рисунок 1.5. Спалах  $\text{Ca}^{2+}$  зареєстрований у місці вивільнення.**

(А) Фрагменти послідовних x-y зображень флуоресценції кардіоміоцита передсердя. Вертикальні положення відповідають розташуванню трьох площ сканування ( $z_1 = -1 \mu\text{м}$ ,  $z_2 = 0 \mu\text{м}$  і  $z_3 = +1 \mu\text{м}$ ).

(В) Профілі  $\Delta F(x)/F_0(x)$  у центральній частині зображень з підпункту А, кольорово кодовані відповідно до значень  $z$ . Зірочками позначено трійки профілів, де амплітуда виявилася найвищою при  $z_2$ .

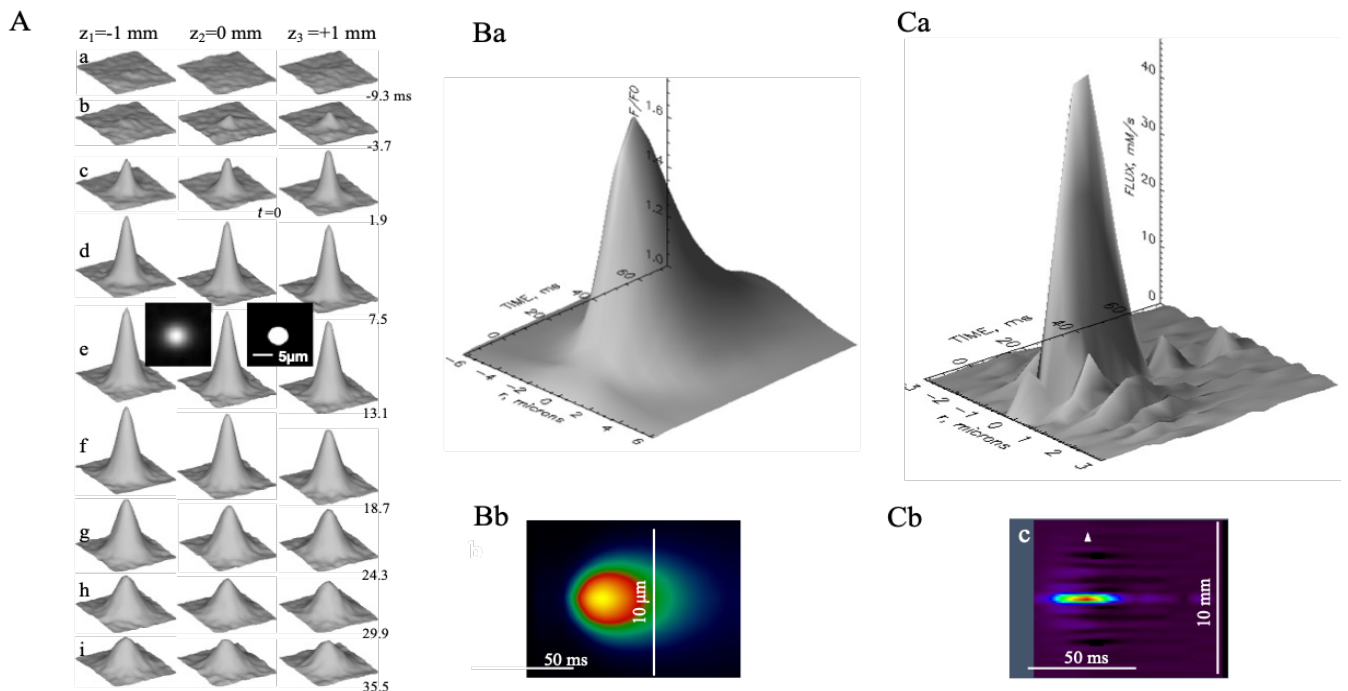
Для реєстрації спалахів було використано щільний конфокальний сканер LSM 5 LIVE (Carl Zeiss) та техніку швидкого переміщення фокусу в аксіальній площині (z) для отримання зображень в трьох вимірах та часі (x-y-z-t). Це дозволяє реєструвати спалахи у місці вивільнення з більшою точністю.



**Рисунок 1.6.** Амплітуда спалахів  $\text{Ca}^{2+}$ .

(А) Гістограми розподілу амплітуд, для всіх спалахів, виявлених на x-y скануваннях (синя лінія), спалахів у фокусі (зелена лінія) та спалахів, виявлених на реконструйованих лінійних скануваннях (червона лінія). (В) Максимальне значення амплітуд спалахів кальцію.

$\text{Ca}^{2+}$  спалах, який був зареєстрований у фокусі представлено як фрагменти послідовних двовимірних зображень флуоресценції кардіоміоцита передсердя (рис. 1.5А). Внизу, на частині В, показано графіки інтенсивності флуоресценції. Цей кальцієвий спалах відповідає критерію фокусування, коли у середній площі спалах має максимальну амплітуду.



**Рисунок 1.7.** Розрахунок потоку кальцію при спалаху. (А) Приклад спалаху у фокусі. Усереднені зображення 150 спалахів у фокусі з часом наростання спалаху  $T = 11.2$  мс, отримані в різний час і при різних розташуваннях z. (Ва) Нормована флуоресценція  $F/F_0(r, t)$ , отримана шляхом усереднення за полярним кутом  $\varphi$  спалаху з А. (Вb)  $F/F_0(r, t)$  представлено в псевдокольорі. (С,a) Потік вивільнення, розрахований з  $F/F_0(r, t)$ , представлений у вигляді поверхні або як псевдокольорове зображення (рис. С,b).

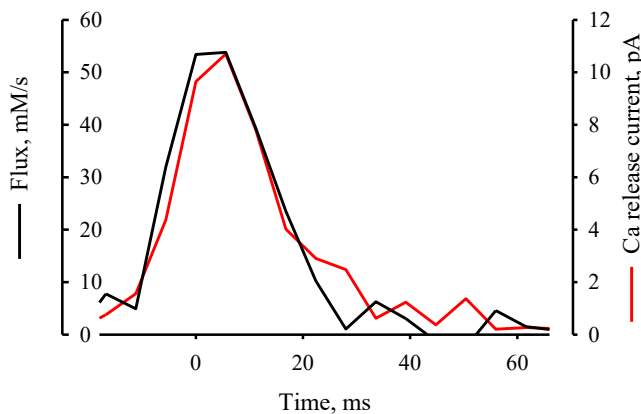
Алгоритм автоматичного детектування, розроблений для x-y зображень (Wim et al., 2000), був застосований до 34 000 x-y-z сканувань (тобто тріо x-y зображень для



трьох значень  $z$ ), отриманих з 34 клітин (по 1000  $x$ - $y$ - $z$  або 3000  $x$ - $y$  сканувань на кожну клітину). З них 6906 спалахів було виявлено, і 767 з них визнано зосередженими у фокусі. Як видно з розподілу амплітуди для спалахів у фокусі є модальний пік біля 0.7 від нормованої амплітуди, що відрізняється від несфокусованих спалахів виявлених при скануванні площини ці лінії. На рис. 1.7А представлено усереднене значення 150 спалахів, виявлених у фокусі, які мають спільний параметр  $T = 11.2$  мс, як час наростання спалаху. Основна перевага визначення того, що спалах знаходиться у фокусі, полягає в тому, що потік вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  може бути визначений з більшою достовірністю. Ми розрахували потік вивільнення, застосувавши "зворотний" метод (Rios et al., 1999) до середніх значень спалахів у фокусі з однаковим часом наростання (як показано на рис. 1.7А,  $T = 11.2$  мс). Розрахунок, припускає радіальну симетрію події, що добре виконується і в нашому випадку, підтверджено вставкою в рядку  $e$  на рис. 1.7А, де показано середнє значення на піку спалаху в градаціях сірого (ліворуч) та його маску (праворуч).

Цей усереднений за радіальною симетрією спалах представлено на рис. 1.7В. Розрахований потік вивільнення кальцію проілюстровано на рис. 1.7С,а. Просторовий розмір джерела, оцінений на рис. 1.7С,б, зосереджено у ділянці діаметром близько 0.5 мкм.

На рис 1.8 наведені часові залежності потоку вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  для зазначеного середнього значення спалаху. Піковий потік вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  було розраховано на рівні 53 мМ/с. На графіку представлено струм вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , розрахований шляхом інтегрування потоку за об'ємом джерела. Час виникнення струму приблизно співпадає з часом потоку, і його пік досягає приблизно 11 пА. Цей показник пікового струму відповідає верхнім межах діапазону, визначеного для клітин серця (Blatter et al., 1997, Santiago et al., 2010, Izu et al., 2001, Cheng and Wang, 2002, Wang et al., 2004).



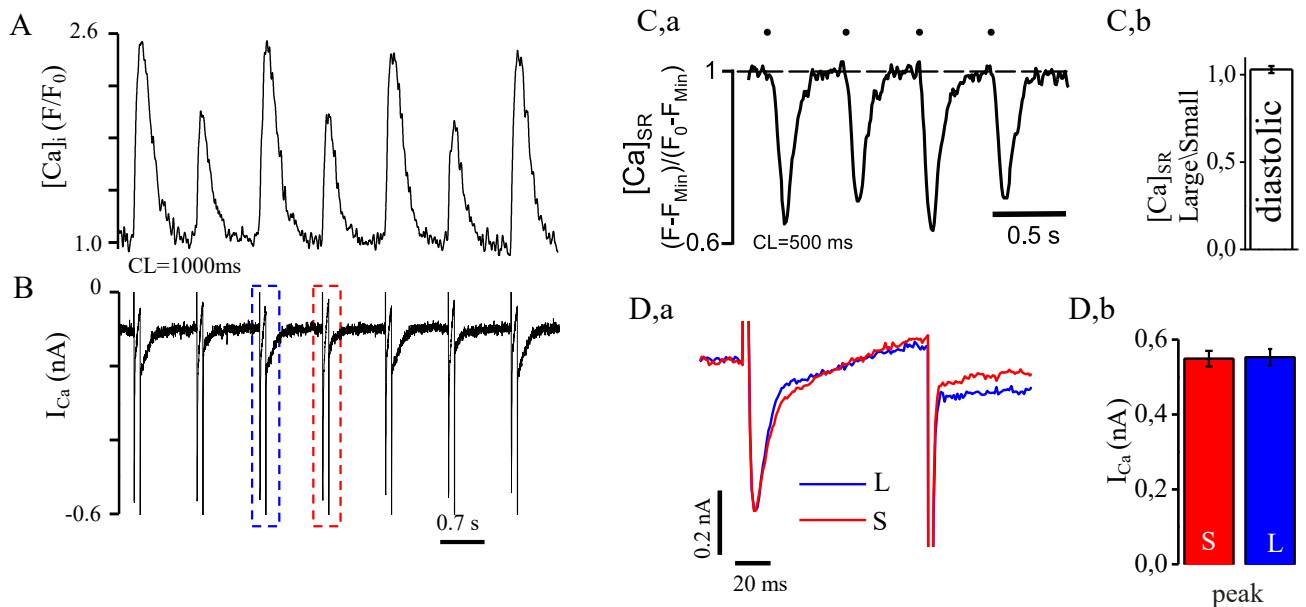
**Рис. 1.8** Сигнали змін потоку та струму при спалаху  $\text{Ca}^{2+}$ .

Часовий профіль потоку вивільнення кальцію (чорна лінія) і струму вивільнення (червона лінія), виміряних для усереднених зображеннях спалахів з  $T = 11.2$  мс.

Такий рівень струму вимагає активності від 20 до 30 каналів, що водночас генерують струми розміром від 0.3 до 0.5 пА (Kettlun et al., 2003). Зазначена тут кількість каналів значно перевищує ту, яка визначалася на основі спостережень квантового потоку в спалахах від периферійних куплонів, де  $N < 6$ ; (Wang et al., 2004). Згідно з дослідженням Каннелла і Конга (Cannell and Kong, 2011), складне багатокуплонне джерело могло б пояснити спостереження квантованих спалахів у відповідності з більш високими оцінками числа каналів, зробленими в інших дослідженнях та підтвердженими у даній роботі.

**Рефрактерні властивості вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму як детермінанта  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій у міоцитах передсердь.** Порушення механізму вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР або затримка відновлення RyRs може вплинути на періодичні зміни концентрації кальцію збудливої клітини. На клітинному рівні, в кардіоміоцитах були виявлені флуктуації амплітуд цитозольних транзєнтів  $\text{Ca}^{2+}$  при регулярній частоті стимуляції, які отримала назву альтернації  $\text{Ca}^{2+}$ . Такі альтернації є результатом взаємодії численних факторів, проте вони тісно пов'язані з порушеннями внутрішньоклітинної регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ .

У міоцитах передсердь ми вивчали роль потенціалзалежного  $\text{Ca}^{2+}$ -струму, завантаження  $\text{Ca}^{2+}$  у СР та реституційних властивостей вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР у формуванні стимуляція-залежних  $\text{Ca}^{2+}$ -альтернацій. Відновлення RyRs-залежного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  може відбуватися в часовому масштабі, який співпадає з частотами стимуляції, на якій виникають альтернації. Залежне від часу відновлення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР може виявитися критичним фактором для появи  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій (Hüser et al., 2000).



**Рисунок 1.9.** Аналіз  $\text{Ca}^{2+}$  струму ( $I_{\text{Ca}}$ ) та концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у саркоплазматичному ретикулумі (СР) ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ ) під час стимуляції, що індукує  $\text{Ca}^{2+}$  альтернації. Одночасне вимірювання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (А) та  $I_{\text{Ca}}$  (В) у міоцитах передсердь кроля, за умов фіксації потенціалу. (D,a) Накладення даних  $I_{\text{Ca}}$ , зареєстрованих під час великоамплітудного (L; синій графік) та малоамплітудного (S; червоний графік) транзєнтів  $\text{Ca}^{2+}$ . (D,b) Середні амплітуди  $\text{Ca}^{2+}$ -струмів після малого транзєнту (S) та великого транзєнту (L). (C,a) Вимірювання  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  під час  $\text{Ca}^{2+}$  альтернації, з використанням низькоафінного  $\text{Ca}^{2+}$  індикатора Fluo-5N, завантаженого в СР. (C,b) Діастолічний  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  як відношення значень перед малим (S) та великим (L) транзєнтами.

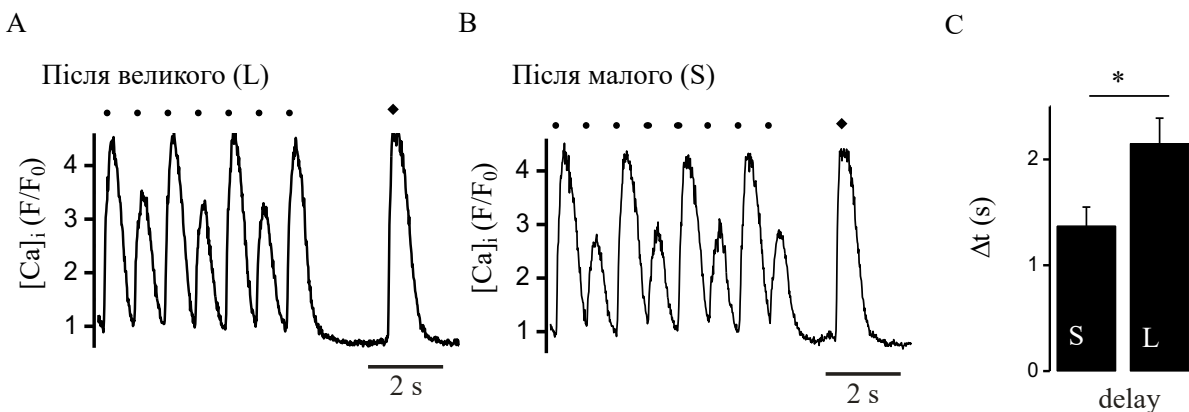
У першій серії експериментів ми перевірили гіпотезу стосовно можливої флуктуації  $I_{\text{Ca}}$ , що може привести до ініціації цитозольних  $\text{Ca}^{2+}$ -альтернацій у міоцитах передсердь. На рис. 1.9 представлені одночасні записи транзєнтів  $\text{Ca}^{2+}$  (А) та  $\text{Ca}^{2+}$  струму ( $I_{\text{Ca}}$ ; В) зареєстрованих у міоциті передсердя, за умов фіксації потенціалу. Середнє значення відношення амплітуди  $I_{\text{Ca}}$  під час великого транзєнту до малого транзєнту складало  $1.008 \pm 0.011$  ( $n = 8$ ; рис. 1.9D), тобто варіація між стимулами становила менше ніж 1%. При докладнішому аналізі було виявлено, що

інактивація  $I_{Ca}$  дещо швидша під час великого транзйенту  $Ca^{2+}$  (синій запис на рис. 1.9D), що відповідає більш вираженій  $Ca^{2+}$ -залежній інактивації струму. Крім того, струм, що виникає після реполяризації, був більшим після великоамплітудного транзйенту  $Ca^{2+}$ , що вказує на більший вивід  $Ca^{2+}$  через поверхневу мембрану за допомогою натрій-кальцієвого обміннику.

Додатково було безпосередньо вимірювали рівень  $[Ca^{2+}]_{SR}$ . Як можна бачити на рис. 1.9C, а кінцевий діастолічний рівень  $[Ca^{2+}]_{SR}$  перед значним виснаженням СР при великому транзйенті збігався із рівнем  $[Ca^{2+}]_{SR}$ , зареєстрованим безпосередньо перед транзйентом меншої амплітуди. Співвідношення діастолічного  $[Ca^{2+}]_{SR}$  перед великим і малим транзйентами виснаження СР  $Ca^{2+}$  дорівнювало  $1.003 \pm 0.002$  ( $n = 9$ ), що свідчить про можливість виникнення  $Ca^{2+}$ -альтернацій при стабільному рівні діастолічного  $[Ca^{2+}]_{SR}$ .

Отже, отримані дані вказують на те, за умов нашого експерименту, можна виключити, що зміни амплітуд  $I_{Ca}$  та вміст кальцію в СР є основними детермінантами цитозольних альтернацій  $Ca^{2+}$  за наших експериментальних умов. Це узгоджується з попередніми результатами досліджень міоцитів передсердь і шлуночків (Hüser et al., 2000, Picht et al., 2006). Тому в наступних експериментах ми зосередилися на вивченні рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР під час  $Ca^{2+}$  альтернацій.

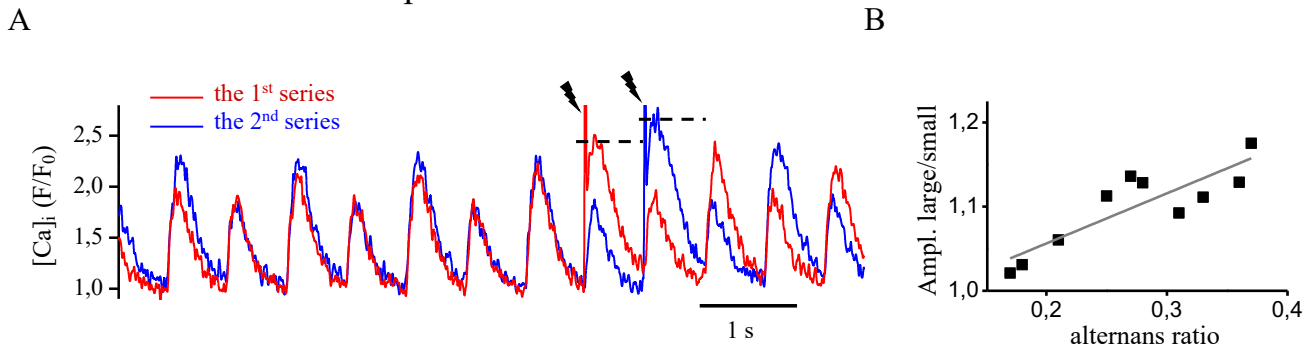
Щоб оцінити доступність або рефрактерність механізму вивільнення  $Ca^{2+}$  після  $Ca^{2+}$ -транзйенту в умовах альтернації, ми вимірювали час до появи (латентність) спонтанного глобального вивільнення  $Ca^{2+}$  протягом періоду спокою після стимуляції. Середня латентність спонтанного глобального вивільнення  $Ca^{2+}$  (див. рис. 1.10C) була  $1.41 \pm 0.24$  с після малого транзйенту і  $2.12 \pm 0.42$  с після великого транзйенту ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ). Значно коротша латентність після малого  $Ca^{2+}$ -транзйенту порівняно відповідним часом після великого транзйенту свідчить про те, що рефрактерність механізму вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР змінюється: вона значно зменшується після малого транзйенту або збільшується після великого транзйенту.



**Рисунок 1.10. Спонтанне вивільнення  $Ca^{2+}$  під час паузи після стимуляції, яка викликає  $Ca^{2+}$ -альтернації.** Спонтанні глобальні події вивільнення  $Ca^{2+}$  (відзначені суцільними ромбами) після великого (A) та малого (B) альтернуючого  $Ca^{2+}$ -транзйенту. (C) Середній час затримки спонтанного глобального вивільнення  $Ca^{2+}$  після великого та малого транзйенту під час альтернацій.

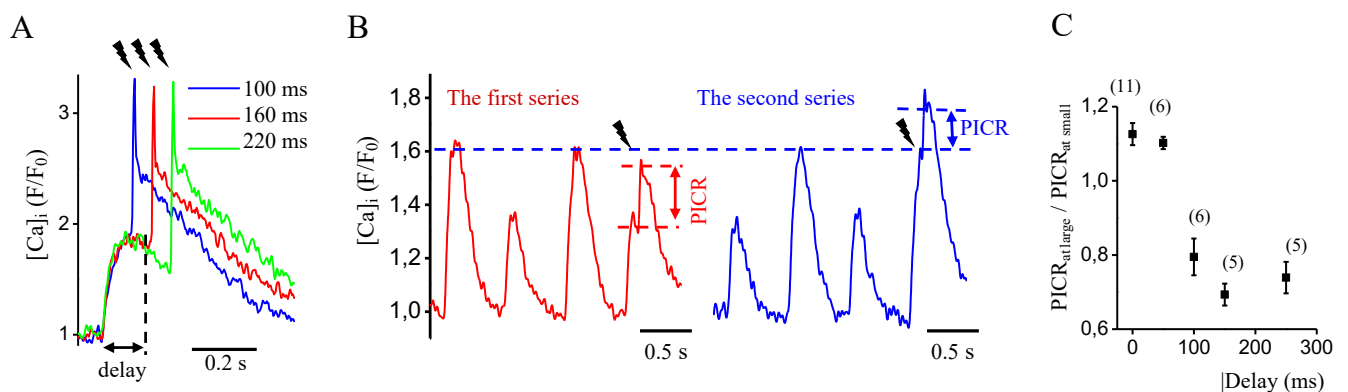
Відновлення вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР після його інактивації під час альтернації було додатково вивчено за допомогою методики, де збільшення  $[Ca^{2+}]$  під час альтернації викликалося за рахунок фотолітичного вивільнення  $Ca^{2+}$  з його зв'язаного стану у кейджу (DM-nitrophen (Kaplan and Ellis-Davies, 1988)). Міоцити передсердь

досліджували методом фіксації потенціалу методом петч-клемп, на частотах, що викликали стабільні альтернанти  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Рисунок 1.11. Рефрактерність вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР під час  $\text{Ca}^{2+}$  альтернації, досліджена за допомогою вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , індуковане фотолізом – PICR.** (А) Дві серії  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій, викликані 100-мс імпульсами деполяризації до +20 мВ з початкового потенціалу в -40 мВ. 355 нм лазерні імпульси (позначено блискавкою) були застосовані для фотолітичного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  одночасно з початком деполяризаційного імпульсу при очікуваному малоамплітудному (червоний; перша серія) та великоамплітудному (синій; друга серія)  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйєнтах. Коефіцієнт альтернації (AR) визначалось як відношення амплітуди малого до великого альтернуючих транзйєнтів. (В) Кореляція між AR і сигналом  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , викликаним комбінацією деполяризації та PICR.

В обох серіях амплітуда транзйєнту, викликаного комбінованим впливом деполяризаційного імпульсу та УФ-флеш спалаху, перевищувала амплітуду, спричинену лише деполяризацією мембрани (рис. 1.11А). Це безпосередньо свідчить про те, що фізіологічний тригер  $\text{I}_{\text{Ca}}$  для  $\text{CICR}$ , не вивільняє весь доступний  $\text{Ca}^{2+}$  з СР і що під час альтернації, коли відбувається невеликий транзйєнт, у СР залишається достатня кількість  $\text{Ca}^{2+}$ . При цьому, при наявності достатньо сильного тригера, можливе подолання рефрактерності механізму вивільнення. Клітини з найвиразнішою AR для транзйєнтів  $\text{Ca}^{2+}$ , викликаних деполяризацією мембрани, також демонстрували найбільшу розбіжність між амплітудами транзйєнтів  $\text{Ca}^{2+}$ , викликаних комбінованою деполяризацією та УФ-флеш імпульсом (рис. 1.11В). Чим більший коефіцієнт альтернації тим більше розбіжність між малим і великими транзйєнтами викликаними комбінацією деполяризації та флеш-фотолізу, що свідчить про зміну рефрактерності при альтернаціях кальцію.



**Рисунок 1.12. Кінетика відновлення RyR2 під час альтернацій.** (А) Три приклади PICR, застосовані із затримками 100, 160 та 220 мс від деполяризації при  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйєнтах однакової амплітуди. (В) Фотовивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  під час транзйєнтів  $\text{Ca}^{2+}$ . (С) Середнє співвідношення PICR під час великих і малих транзйєнтів  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PICR}_L/\text{PICR}_S$ ) як функція затримки між деполяризаційним імпульсом та УФ-флеш спалахом. Кількість досліджуваних клітин вказана у дужках.

На рис. 1.12В наведено приклад, у якому УФ-флеш спалах був застосований через 150 мс після початку деполяризаційного імпульсу під час малого транзйенту  $\text{Ca}^{2+}$  (червона лінія) і великого транзйенту  $\text{Ca}^{2+}$  (синя лінія). Додаткове вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  через фотоліз DM-nitrophen (PICR) був більшим під час малого  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенту. Для УФ-флеш спалахів, поданих у момент часу 0 (без затримки) та із затримкою 50 мс, відношення  $\text{PICR}_L/\text{PICR}_S$  перевищувало 1, свідчить про те, що під час великого транзйенту на початку деполяризації канали вивільнення RyRs були повністю доступні і могли активуватися максимально під впливом комбінації деполяризаційного імпульсу та УФ-флеш спалаху. Протягом інтервалу від піку  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенту до його спаду (100-250 мс) відношення  $\text{PICR}_L/\text{PICR}_S$  зменшувалося, досягаючи мінімуму приблизно через 150 мс.

Ці результати свідчать про те, що під час альтернації частка RyRs, яка залучена до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , коливається з кожним новим стимулом. Під час великого транзйенту більша частина RyRs залучена до вивільнення, і, отже, більша частина каналів переходить у рефрактерний стан, стаючи тимчасово недоступними для подальшої активації. Протилежна ситуація спостерігається під час малого транзйенту.

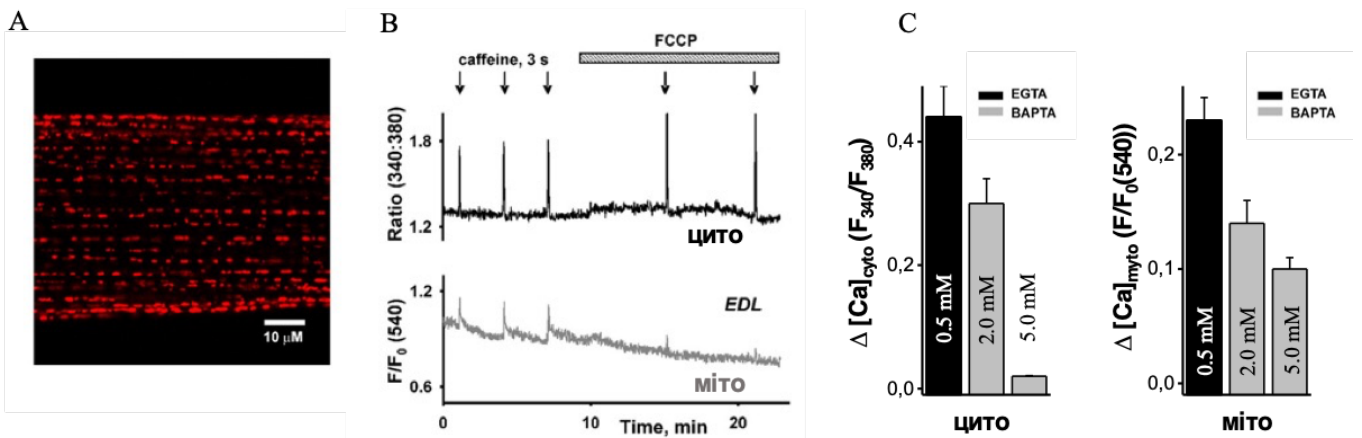
Проведені експерименти підтвердили, що під час альтернацій кінетика рефрактерності вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР збільшується після велико амплітудного транзйенту. Ми дійшли до висновку, що залежність від часу відновлення рефрактерності та реституція вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР є ключовими факторами для генерації  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій. Аналогічні висновки про важливість рефрактерності вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР для виникнення альтернантів були отримані на основі досліджень ролі люмінального  $\text{Ca}^{2+}$  у вивільненні в інтактних клітинах серця миші (Kornyeuev et al., 2010). У цих дослідженнях рефрактерність центрів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  після  $\text{Ca}^{2+}$  спалаху була визначена як вирішальний фактор, що визначає появу серцевих альтернацій (Rovetti et al., 2010). Отже, ключовим механізмом, що лежить в основі серцевих альтернацій, є залежні від часу властивості реституції та кінетика відновлення механізму вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР.

## 2. Транзйенті зміни внутрішньоклітинного кальцію у скелетному м'язі.

**Тунелювання  $\text{Ca}^{2+}$  від СР до мітохондрій.** Мітохондрія є однією з основних субклітинних структур у скелетних м'язах ссавців. Ключова роль яких полягає у виробництві АТФ (Gillis, 1997, Madsen et al., 1996, Sembrowich et al., 1985). Вважається, що константа дисоціації для мітохондріального поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  є надто низькою, та мітохондрії не можуть обробити швидкі зміни рівню кальцію (Brini, 2003). Проте, дослідження показали, що ця органела може швидко реагувати на зміни вмісту кальцію під час не тільки тетанічних, а і поодиноких скорочень м'язів (Rudolf et al., 2004). Таким чином, існує тісний зв'язок між мітохондрією і СР, який забезпечує швидке поглинання кальцію.

Ми провели аналіз функціональної взаємодії між сайтами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР та місцями поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями у скелетних м'язах щурів, які характеризуються швидким і повільним скороченнями. Для цього ми порівнювали кофеїн-індуковані цитозольні та мітохондріальні транзйенти  $\text{Ca}^{2+}$  у присутності повільного (EGTA) та швидкого (BAPTA)  $\text{Ca}^{2+}$  буферів.

На рис. 2.1В представлені цитозольні та мітохондріальні транзйенти  $[Ca^{2+}]$ , зафіксовані в 0.5 мМ розчині EGТА. Пермеабілізовані волокна постійно перфузувались внутрішнім розчином, що містив EGТА, і кофеїн (20 мМ) додавався короткочасно з інтервалом в 3 хвилини.



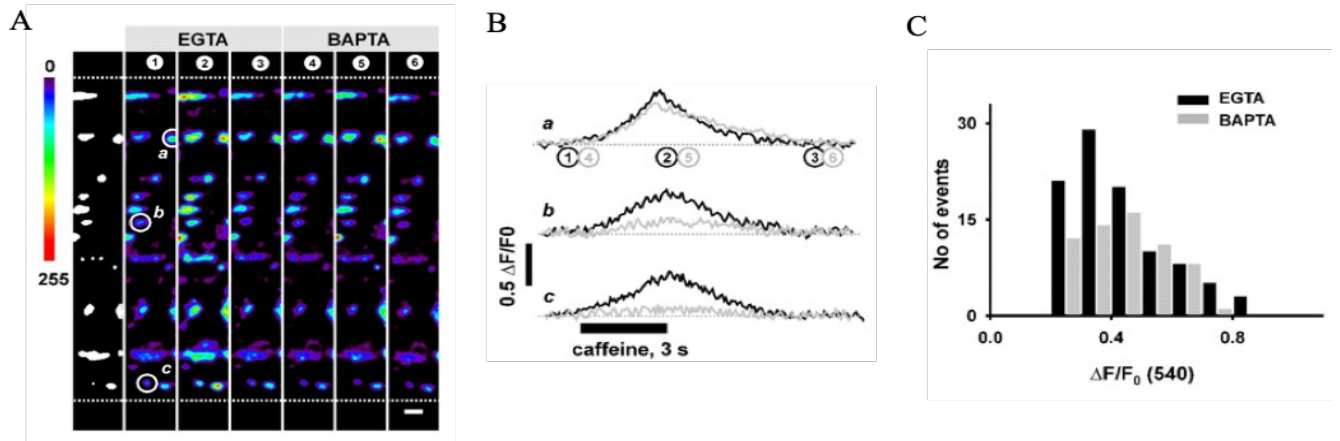
**Рисунок 2.1. Цитозольні та мітохондріальні транзйенти  $[Ca^{2+}]$ .** (А) Зображення м'язового волокна EDL, завантаженого Mag-rhod-2. (В) Цитозольні (верхні панелі) та мітохондріальні (нижні панелі)  $Ca^{2+}$  транзйенти в EDL, індуковані кофеїном. Амплітуди цитозольних (С) та мітохондріальних (D)  $Ca^{2+}$ -транзйентів, виміряна як  $\Delta(F_{340}/F_{380})$  та  $\Delta F_{540}/F_0(540)$  відповідно, у середовищах EGТА та ВАРТА.

У цьому та 11 інших волокнах EDL амплітуда цитозольних  $Ca^{2+}$ -транзйентів, виміряна як  $\Delta(F_{340}/F_{380})$ , дорівнювала  $0.44 \pm 0.05$ . А усереднена амплітуда мітохондріальних  $Ca^{2+}$ -транзйентів у величинах  $\Delta F_{540}/F_0(540)$  становила  $0.23 \pm 0.02$ . Для підтвердження того, що сигнал, виміряний за допомогою Mag-rhod-2 відповідає сигналу з мітохондрій, ми використали FCCP для блокування мітохондріального потенціалу та здатності захоплення кальцію. Як і очікувалося, застосування 2.5 мкМ FCCP істотно знижувало флуоресценцію Mag-rhod-2 і майже повністю усував кофеїн-індуковані мітохондріальні  $Ca^{2+}$ -транзйенти в семи аналізованих клітинах. При цьому FCCP суттєво підвищував амплітуду цитозольних  $Ca^{2+}$  сигналів ( $\Delta(F_{340}/F_{380})$  дорівнювала  $0.40 \pm 0.06$  до застосування та  $0.48 \pm 0.07$  після додавання препарату.

Якщо просторове розташування між цими органелами є значним, зумовлюючи необхідність дифузії  $Ca^{2+}$  з СР для його поглинання мітохондріями, ВАРТА має значно зменшити або навіть усунути як цитозольні, так і мітохондріальні  $Ca^{2+}$ -відповіді на кофеїн. В 11 клітинах EDL, інкубованих у 2 мМ ВАРТА, середня амплітуда цитозольних транзйентів  $Ca^{2+}$  в  $\Delta(F_{340}/F_{380})$  дорівнювала  $0.30 \pm 0.04$ , або 68.2% значення в EGТА. У шести клітинах EDL 5 мМ ВАРТА майже повністю пригнічувала цитозольні транзйенти  $Ca^{2+}$  (лише 4.5% від значення в EGТА), але мітохондріальні відповіді на  $Ca^{2+}$  залишалися 43.5% від контрольної амплітуди. Частина мітохондрій має бути розміщена на дуже близькій відстані від СР, де може відбуватися тунелювання  $Ca^{2+}$ , що вивільнюється з СР.

Щоб визначити, чи всі мітохондрії утворюють мікродомени з СР, ми використали конфокальну мікроскопію. На рис. 2.1А представлено скелетне м'язове волокно EDL, яке було навантажено Mag-rhod-2, пермеабілізоване та поміщене в розчині EGТА. У цьому та 21 інших волокнах EDL, що були досліджені в EGТА, кофеїн індукував підвищення рівня в майже всіх мітохондріях (454 з 461), які були

ідентифіковані на зображеннях. У експериментах, де використовувались внутрішні розчини з 5 мМ ВАРТА, прикладання кофеїну спричиняло зростання  $[Ca^{2+}]_m$  у приблизно 70% визначених мітохондрій (192 з 272) у 15 досліджених клітинах.



**Рисунок 2.2. Чи всі мітохондрії утворюють мікродомени з СР?** (А) Псевдокольорові зображення змін мітохондріального кальцію у середовищах EGTA та ВАРТА. (В) Транзйєнти  $Ca^{2+}$  у середовищах EGTA (чорна лїнія) і ВАРТА (сїра лїнія) в мїтохондрїях, позначених кружечками. Цифри демонструють моменти часу, вказанї на графіку та зображеннїях. Масштабна лїнійка = 2 мкм. (С) Амплїтудний розподїл  $\Delta[Ca^{2+}]_m$  в EGTA та ВАРТА.

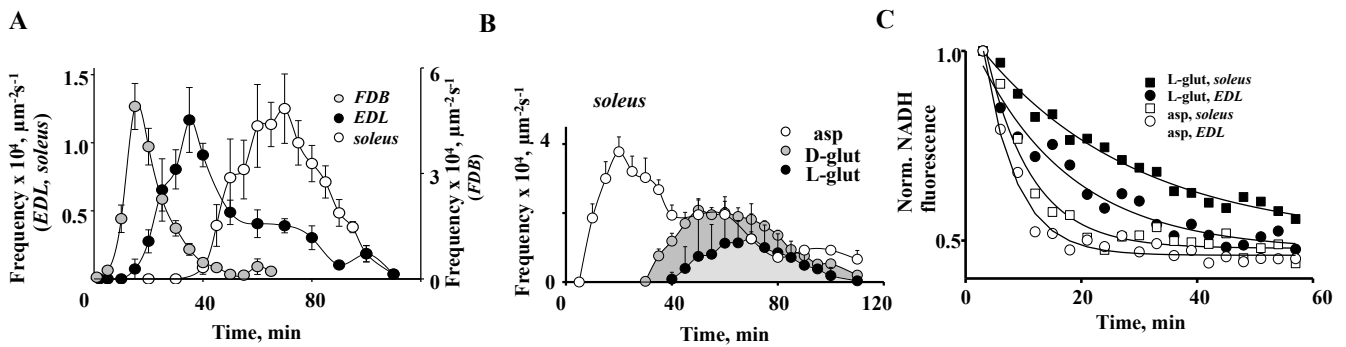
На рис. 2.2В представлено зображення флуоресценції Mag-rhod-2 з волокна, отримані спочатку в EGTA (лїва панель) та потїм в ВАРТА (права панель), пїд час застосування 20 мМ кофеїну. В EGTA кофеїн викликав виразні транзйєнти  $Ca^{2+}$  у всїх 18 ідентифікованих мїтохондрїях. Пїсля змїни середовища на ВАРТА, лише 10 мїтохондрїй продовжували секвеструвати  $Ca^{2+}$ . На рис. 2.2С представлено розподїл амплїтуд мїтохондрїальних транзйєнтів  $Ca^{2+}$ , отриманих в EGTA та ВАРТА для однїєї тїєї ж групи мїтохондрїй.

Було бїофїзично пїдтверджено існування двох рїзних типів структурно-функціональних взаємозв'язкїв мїж мїтохондрїями та СР у м'язових волокнах. Деяка частина мїтохондрїальної популяцїї розташована на певнїй вїдстанї вїд мїсць вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР, але значна кїлькїсть мїтохондрїй мають прямиий функціональний (ї, їмовїрно, структурний) контакт їз СР.

**Окисно-вїдновний стан мїтохондрїй та  $Ca^{2+}$ -спалахи в пермеабїлізованому скелетному м'язї ссавцїв.** Розумїння складних бїофїзичних процесїв, пов'язаних зї змїнами концентрацїї кальцїю в скелетних м'язах та виявлення причин гальмування кальцїй їндукованого вивільнення кальцїю у м'язових клїтинах ссавцїв за фїзіологїчних умов є важливою задачею. Процес пермеабїлізацїї, коли мембрана стає проникливою, може порушити певнї механїзми, якї зазвичай стримують кальцїй їндуковане вивільнення кальцїю у непошкоджених клїтинах.

Пїсля пермеабїлізацїї клїтини помїщалися у внутрїшньоклїтинний розчин, що мїстив L-глутамат, ї вивчалася поява  $Ca^{2+}$  спалахїв. На рис. 2.3А представлена часова залежнїсть появи  $Ca^{2+}$  спалахїв у 17 м'язових волокнах EDL, 17 м'язових волокнах soleus та 36 м'язових волокнах FDB волокон мишї досліджених за однаковими умовами експерименту.  $Ca^{2+}$  спалахи у волокнах soleus розвивалися значно пїзніше, нїж у EDL: час до першого зафїксованого спалаху складав  $47 \pm 2.3$  хв порївняно з  $21 \pm 1.1$  хв у клїтинах soleus та EDL вїдповїдно. Крїм того, час, необхїдний для

досягнення максимальної частоти спалахів, був істотно довшим у волокнах soleus —  $67 \pm 2.2$  хв, порівняно з  $35 \pm 1.4$  хв у EDL волокнах.



**Рисунок 2.3.** Вплив мітохондріальних субстратів на появу  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів. (А) Часова залежність частоти  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів різних волокон. (В) Вплив мітохондріальних субстратів на часовий перебіг появи  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у soleus м'язів. (С) Затухання сигналів NADH в EDL і soleus м'язах інкубованих в розчинах аспартату і L-глутамату.

Повільний м'яз soleus щура має велику кількість мітохондрій порівняно з швидкими м'язом EDL який має меншу кількість мітохондрій (Ariano et al., 1973). Окислювальна ємність зростає в такому порядку: більша в волокнах FDB, EDL та менша в soleus. Загалом дані, отримані з різних типів м'язових волокон, вказують на те, що час появи  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у пермеабілізованих волокнах тісно корелює з кількістю мітохондрій у цих волокнах.

Скелетні м'язи генерують активні форми кисню за допомогою низки цитозольних та мембрано-зв'язуючи ферментів, включаючи ксантиноксидазу, NAD(P)H оксидази (NOXs), мітохондріальний дихальний ланцюг, синтазу оксиду азоту тощо (Reid, 2001b, Stamler and Meissner, 2001).

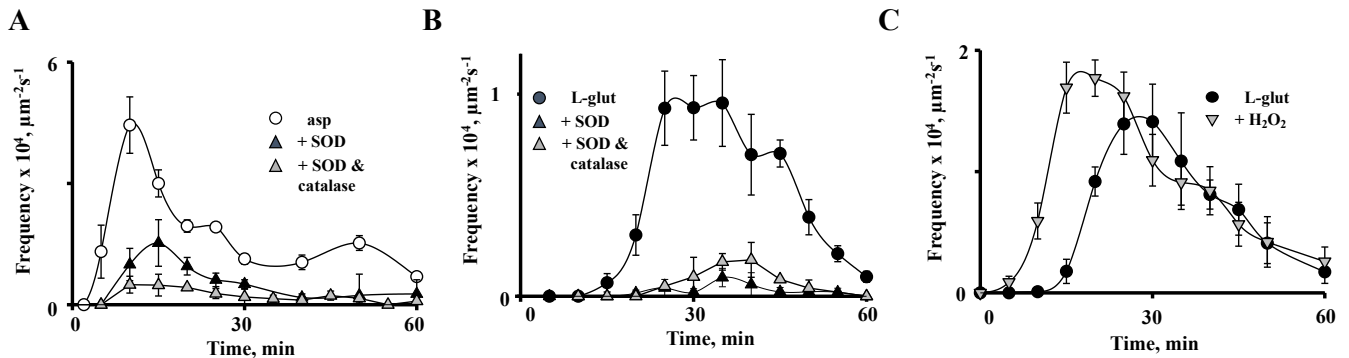
У наступній серії експериментів була досліджена роль мітохондрій у розвитку спонтанної  $\text{Ca}^{2+}$ -активності. Ми поміщали скелетні м'язові волокна різної метаболічної активності (FDB, EDL та soleus) у внутрішні розчини на основі L-глутамату, D-глутамату чи аспартату. Варто відзначити, хоча L-глутамат є субстратом циклу Кребса, D-глутамат не виконує цієї ролі. Якщо додавання субстратів до внутрішнього розчину має активізувати мітохондріальний метаболізм, то їх відсутність може призвести до його зниження. Передбачається, що аспартат, як продукт циклу Кребса, інгібує окислювальний метаболізм сильніше, ніж D-глутамат.

У всіх трьох досліджуваних типах волокон найбільший час виникнення  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів після пермеабілізації спостерігався в розчині, збагаченому L-глутаматом. Для 17 клітин EDL, які були поміщені в розчин L-глутамату, пікова частота  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів досягалася через  $35 \pm 1.4$  хв після пермеабілізації волокон. У випадку коли клітини знаходилися у розчині D-глутамату, пік частоти спалахів реєструвався раніше — через  $20 \pm 1.4$  хв ( $n=11$ ). Спалахи з'являлися ще швидше у волокнах, що були піддані дії розчину з аспартатом —  $11 \pm 0.7$  хв ( $n=9$ ). Подібні часові залежності розвитку спалахів від субстратів спостерігалися також в м'язових волокнах soleus (див. рис. 2.3В). Поява спалахів  $\text{Ca}^{2+}$  залежить від активності мітохондріального метаболізму, чим він більший (L-глутамат) тим поява спалахів відстрочена.

Додатково цей факт був підтверджений за рахунок флуоресценції мітохондріальних NADH сигналів. Автофлуоресценція молекул NADH з мітохондрій



була значно швидшою у аспартаті порівняно з L-глутаматом (рис. 2.3С). Загалом, час виникнення  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у цих волокнах корелював зі швидкістю зміни мітохондріального окислювально-відновного потенціалу відповідного волокна.



**Рисунок 2.4.** Вплив ROS та їх поглиначів на  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи в м'язових волокнах EDL. (A) Поява  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів в розчині аспартату (A) чи L-глутамату (B) з додаванням SOD або комбінації SOD та каталази. (C) Спалахи у контрольних умовах (L-глутамат) порівняно з присутністю 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Можливий механізм впливу мітохондрій на цитоплазматичні сигнали  $\text{Ca}^{2+}$  пов'язаний з утворенням активних форм кисню (ROS). Під час аеробного дихання, для синтезу АТФ у мітохондріях, відбувається витік електронів, що регулярно спричиняє формуванню мітохондріальних супероксидних аніонів, які подальше перетворюються на  $\text{H}_2\text{O}_2$  за допомогою марганцевої супероксиддисмутази.  $\text{H}_2\text{O}_2$  виступає як одна з ключових молекул-месенджерів в окислювально-відновлювальних сигнальних шляхах (див. огляди (Brookes et al., 2004, Reid, 2001a)). Оскільки СР розташований дуже близько до мітохондрій, його функції можуть бути модифіковані ROS, які виділяються з цих органел.

Для перевірки припущення про те, що ROS можуть спричинити появу  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у пермеабілізованих м'язових клітинах ссавців, ми спробували модулювати активність  $\text{RyRs}$  за рахунок ROS через застосування екзогенних поглиначів. На рис. 2.4А представлено результати експериментів, де м'язові волокна EDL інкубувалися у розчині на основі аспартату, а також у розчині аспартату із додаванням 600 ОД/мл супероксиддисмутази (SOD) чи комбінованим додаванням 600 ОД/мл SOD і 500 ОД/мл каталази. Порівнюючи волокна під різними умовами, було виявлено, що час до першого зареєстрованого спалаху і час до досягнення максимальної частоти спалахів становили  $7.9 \pm 1.01$  хв і  $11.4 \pm 1.80$  хв ( $n=7$ ) відповідно. Вплив лише SOD суттєво затримав розвиток  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів ( $11.0 \pm 1.00$  хв до першого спалаху та  $18.0 \pm 1.22$  хв до піку частоти,  $n=5$ ). Застосування двох поглиначів разом ще більше інгібувало розвиток спалахів, затримуючи їхню появу порівняно з контрольною групою ( $11.3 \pm 1.25$  хв до першого спалаху і  $18.3 \pm 1.17$  хв до піку частоти,  $n=4$ ).

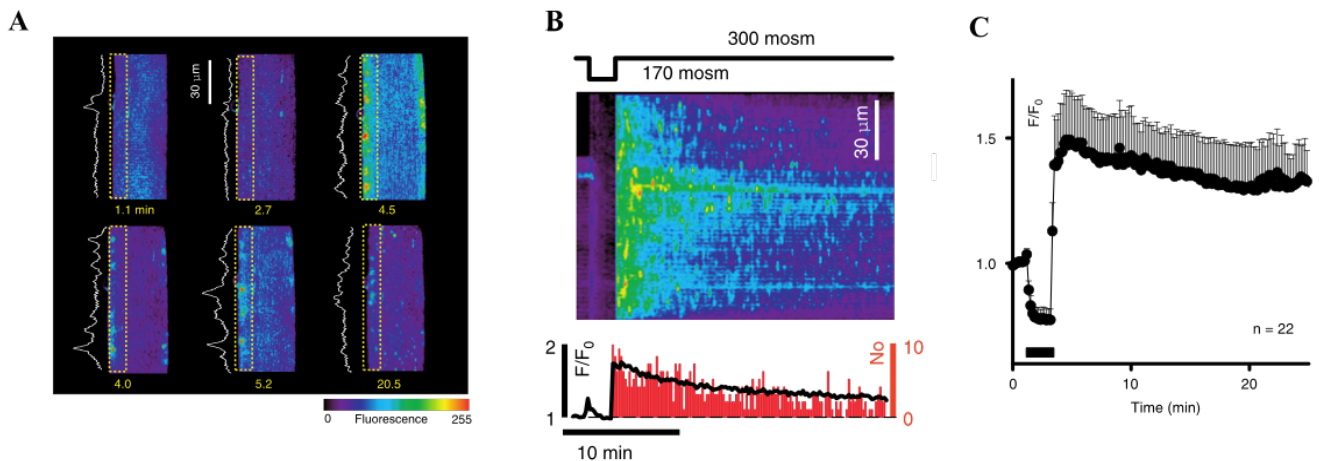
Рисунок 2.4В ілюструє результати експериментів із застосуванням поглиначів ROS, SOD і каталази, у м'язових волокнах EDL у внутрішньому розчині на основі L-глутамату. Час до першого виявленого спалаху та його максимальна частота склали  $28.8 \pm 1.25$  хв та  $36.3 \pm 2.39$  хв ( $n=4$ ) для SOD,  $37.7 \pm 5.05$  хв та  $46.7 \pm 2.89$  хв ( $n=3$ ) для комбінації SOD і каталази, тоді як контрольні значення склали  $18.8 \pm 1.25$  хв та  $30.0 \pm 1.64$  хв ( $n=8$ ). При додаванні 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  до розчинів на основі L-глутамату незначно підвищувало максимальну частоту спалахів, але пришвидшувало їхній часовий початок (див. рис. 2.4С).

Ці дані свідчать про залежність появи  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у пермеабілізованих м'язових волокнах від окислювальної активності. Дисбаланс між продукцією мітохондріальних ROS та антиоксидантною здатністю волокон, ймовірно, викликає активацією RyRs за рахунок ROS, що призводить до появи  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у пермеабілізованих препаратах, скелетних м'язів ссавців.

**Вплив активних форм кисню на  $\text{Ca}^{2+}$  - сигнали, спричинені осмотичним шоком у інтактних скелетних м'язових волокнах миші.** Як було показано вище, дисбаланс між продукцією та поглинанням ROS у пермеабілізованих клітинах скелетних м'язів ссавців відіграє ключову роль у появі  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів. У цьому розділі роботи ми перевіряли гіпотезу, згідно з якою подібний механізм може спричинити виникнення  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів в інтактних волокнах після осмотичного стресу.

Wang та співавтори (Wang et al., 2005) виявили, що осмотичний шок, прикладений до інтактних м'язових волокон ссавців, індукує транзиторну активність внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів, які схожі на спалахи.

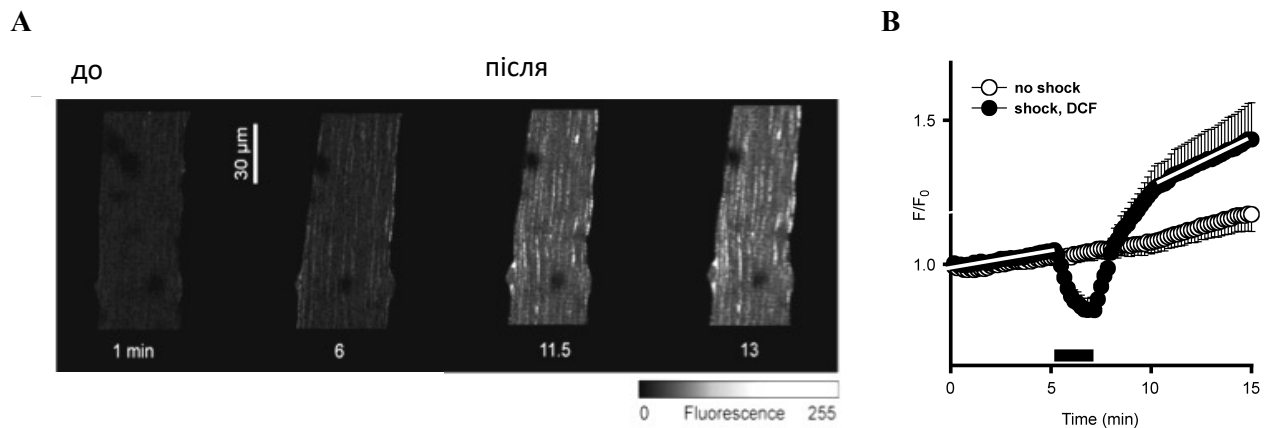
Рисунок 2.5 демонструє результати аналогічних експериментів, проведених в рамках нашого дослідження. Після 2-хвилинного впливу низькоосмотичного розчину і подальшого повернення до ізотонічного стану у 81% волокон (18 з 22) спостерігалися дискретні внутрішньоклітинні  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали. Типова відповідь представлена на рис. 2.5А. У 16 досліджених клітинах стрес-індуковані  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи локалізувалися в області приблизно 10 мкм від плазматичної мембрани. Ці події відбувалися протягом усього періоду запису (25 хв), проте їхня частота зменшувалася із часом (див. гістограму на рис. 2.5С).



**Рисунок 2.5. Внутрішньоклітинні  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали, викликані осмотичним шоком.** (А) Зображення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної Fluo-4 флуоресценції в клітині після осмотичного шоку. (В)  $\text{Ca}^{2+}$  сигнал при осмотичному шоці. Для 150 зображень серії обчислювалася середня інтенсивність флуоресценції під сарколемою, а отримані дані подавалися у вигляді двовимірного зображення "лінійного сканування". Лінійний графік у нижній частині В демонструє просторово усереднену інтенсивність флуоресценції, нормалізовану до значення, зареєстрованого на початку експерименту ( $F/F_0$ ). (С) Об'єднані дані згідно з цим протоколом для 22 волокон. Відмітка внизу ілюструє час застосування гіпотонічного розчину.

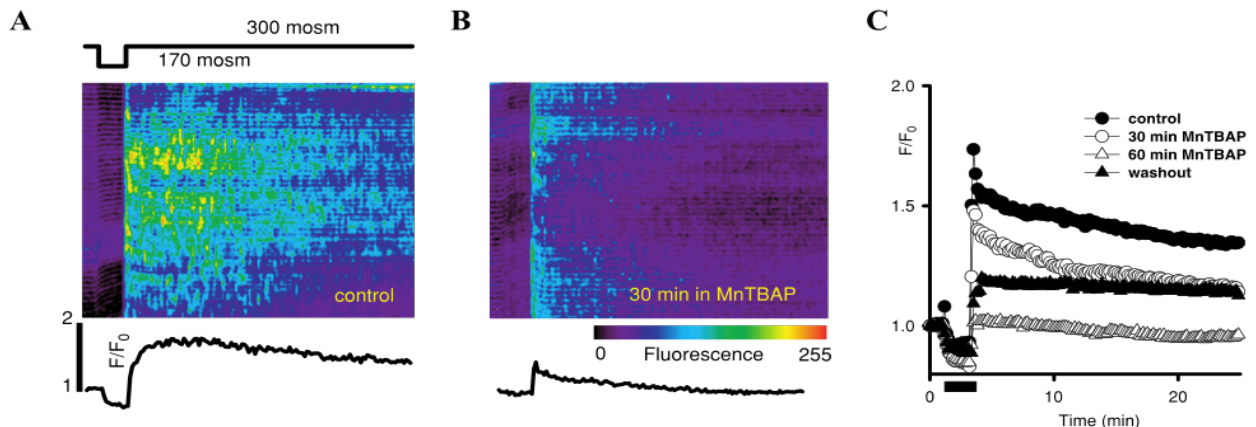
Для реєстрації змін ROS використовувався флуоресцентний барвник CM-H2DCFDA (DCF). Як видно з рисунку 2.6 осмотичний шок істотно підвищував продукцію ROS, що відображається на збільшенні нахилу кривої після шоку (див. зафарбовані кружечки). У контрольних клітинах сигнал, асоційований з ROS,

монотонно зростає, ймовірно, через ендогенне формування ROS, яке призводить до окиснення індикатора.



**Рисунок 2.6.** Зміни у внутрішньоклітинному виробництві ROS під впливом стресу. (А) Зображення флуоресценції CM-H2DCFDA (DCF), що корелює з ROS, в волокні під час осмотичного шоку. (В) Усереднені зміни в нормалізованих сигналах DCF в клітинах під час осмотичного шоку (зафарбовані кружечки) порівняно із змінами в нормалізованих сигналах DCF у контрольних клітинах, де шок не застосовувався (незафарбовані кружечки).

У середньому, після шоку спостерігалось значне підвищення крутизни кривої: з  $0.01 \pm 0.003$  до  $0.05 \pm 0.01$  (у одиницях  $d(F/F_0)/d(xв)$ ;  $P < 0.01$ ,  $n = 11$ ). Оскільки нахил кривої для DCF-сигналу відображає швидкість генерації ROS, отримані дані свідчать про збільшення виробництва ROS після осмотичного шоку.



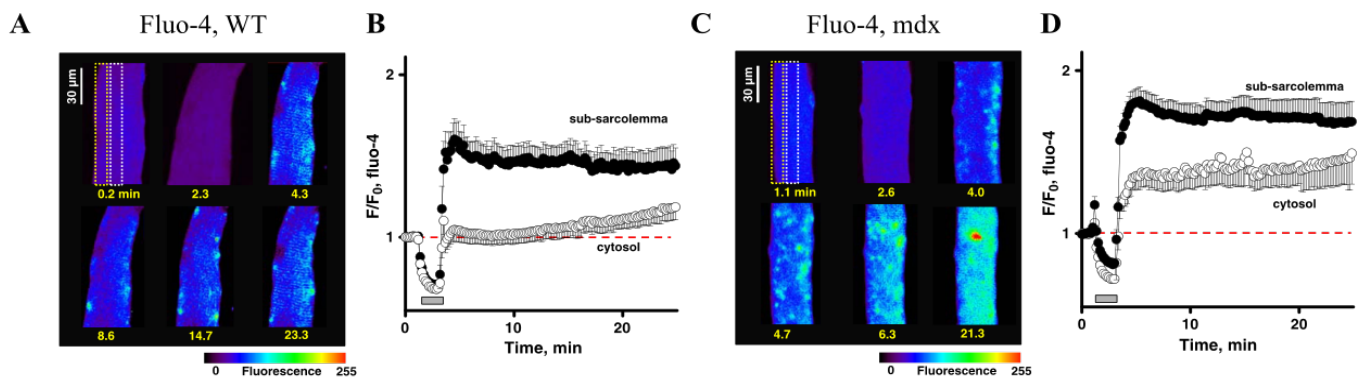
**Рисунок 2.7.** Пригнічення стрес-індукованих Ca<sup>2+</sup> спалахів за допомогою MnTBAP. Лінійне сканування в часі від серій зображень, отриманих в клітинах після осмотичного шоку, у контрольних умовах (без додавання поглинача, див. частину А) та після 30 хв інкубації з 50 мкМ MnTBAP (див. частину В). Лінії відображають відносні зміни усередненої субсарколемної флуоресценції. (С) Середні значення нормалізованої флуоресценції протягом 6 хв після осмотичного шоку в присутності та за відсутності MnTBAP.

Якщо механізми, що залежать від ROS, сприяють генерації спалахів у непошкоджених волокнах під час осмотичного шоку, тоді поглиначі ROS можуть запобігти їхній появі. Мембранопроникливий поглинач ROS MnTBAP (діє як імітатор SOD) практично повністю усуває ініційований осмотичним шоком аномальний кальцієвий сигнал (рис. 2.7). Середні значення флуоресценції суттєво знизилася з  $1.51 \pm 0.08$  ( $n = 4$ ) у контрольній групі (без поглинача) до  $1.34 \pm 0.06$  ( $n = 4$ ) та  $1.01 \pm 0.01$  ( $n = 5$ ) після 30 та 60 хв інкубації з MnTBAP відповідно. Mn-срх3 (4 мкМ) та TIRON

(10 mM; переважно поглинає супероксидний аніон) також істотно зменшували стрес-індукований  $\text{Ca}^{2+}$  сигнал, 74% та 80% відповідно.

Отримані результати свідчать про те, що ROS сприяють аномальній активності  $\text{Ca}^{2+}$  у скелетних м'язах ссавців під час осмотичного стресу.  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи, залежні від ROS, є ключовим компонентом адаптивних та неадаптивних реакцій м'язів у різноманітних патологічних станах, зокрема при ексцентричному розтягненні, осмотичних змінах під час ішемії та реперфузії, а також у випадку деяких м'язових захворювань.

**Взаємне посилення сигналів ROS та  $\text{Ca}^{2+}$  під час стресу в дистрофічних м'язових волокнах скелетних м'язів.** М'язова дистрофія Душена відносяться до найбільш серйозних спадкових захворювань м'язової тканини. Причиною її виникнення є мутація гена дистрофіну — цитоскелетного білка, який забезпечує захист м'язових клітин від механічного пошкодження. Wang та співавтори (Wang et al., 2005) зазначили, що як гіпо-, так і гіперосмотичний шок викликають тривале зростання  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів у скелетних м'язових волокнах миші лінії mdx, порівняно із контрольними клітинами (мишей так званого дикого типу, WT). При осмотичному шоці, в клітинах WT  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи переважно локалізувалися в області приблизно 10 мкм від сарколеми, то у волокнах миші лінії mdx такий  $\text{Ca}^{2+}$  сигнал розповсюджувалася по всьому цитозолю.

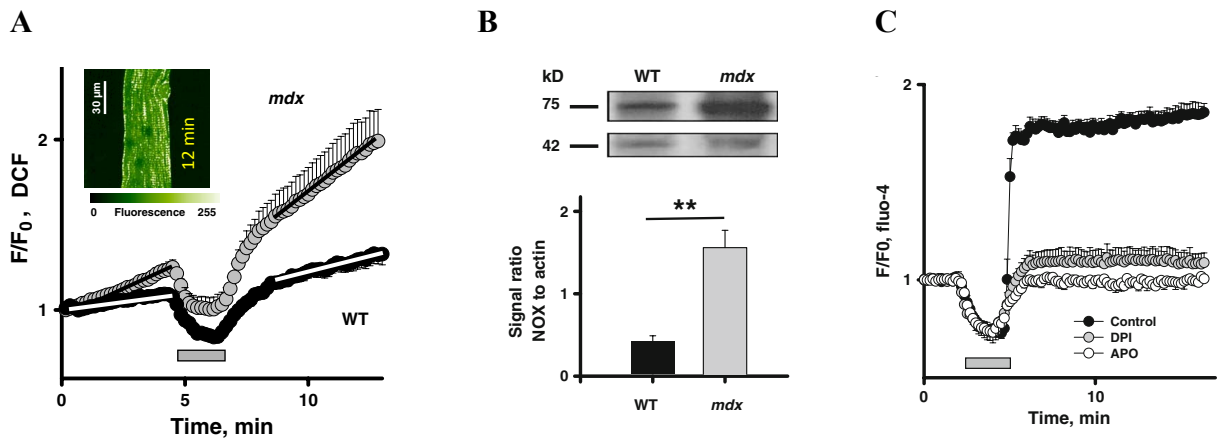


**Рисунок 2.8.** Цитозольні  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали, індуковані гіпоосмотичним шоком у м'язових волокнах mdx порівняно з нормальними (WT). Вибрані зображення флуоресценції Fluo-4 у волокнах WT (A) та mdx (C). Вставки показують ділянки, в яких була визначена середня флуоресценція. (B) та (D) показують усереднені субсарколемальні (чорні кружечки) та цитозольні (білі кружечки)  $\text{Ca}^{2+}$  відповіді у WT та mdx-клітинах на гіпоосмотичний шок.

У 97% м'язових волокон mdx (33 з 34 волокон з  $N=11$  особин) осмотичний шок ініціював  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи. У дев'яти з цих клітин (або 38% реагуючих клітин)  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи швидко розповсюджувалися вглиб волокна, досягаючи його центру в середньому за  $34.4 \pm 8.5$  с (як це ілюстровано рис. 2.8C та D). Це суттєво відрізняється від відповідей у клітинах WT, де  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи переважно були обмежені субсарколемальною зоною (рис. 2.8A та B).

На рисунок 2.9A показані усереднені нормалізовані зміни DCF-сигналів під час осмотичного шоку (сірі кружечки). В середньому крутизна сигналу перед осмотичним шоком була достовірно вищою ( $P < 0.01$ ) у клітинах mdx порівняно з клітинах WT:  $0.06 \pm 0.01$  проти  $0.02 \pm 0.003$  відповідно. Після осмотичного шоку крутизна сигналу значно зросла, досягаючи значень  $0.13 \pm 0.02$  для клітин mdx і

0.04±0.01 для клітин WT. Враховуючи, що нахил сигналу DCF корелює зі швидкістю генерації ROS, ці дані свідчать про те, що: збільшено базову генерацію вільних радикалів у волокнах mdx; та інтенсифікацію генерації ROS під впливом осмотичного шоку у волокнах mdx порівняно з клітинами лінії миші WT.



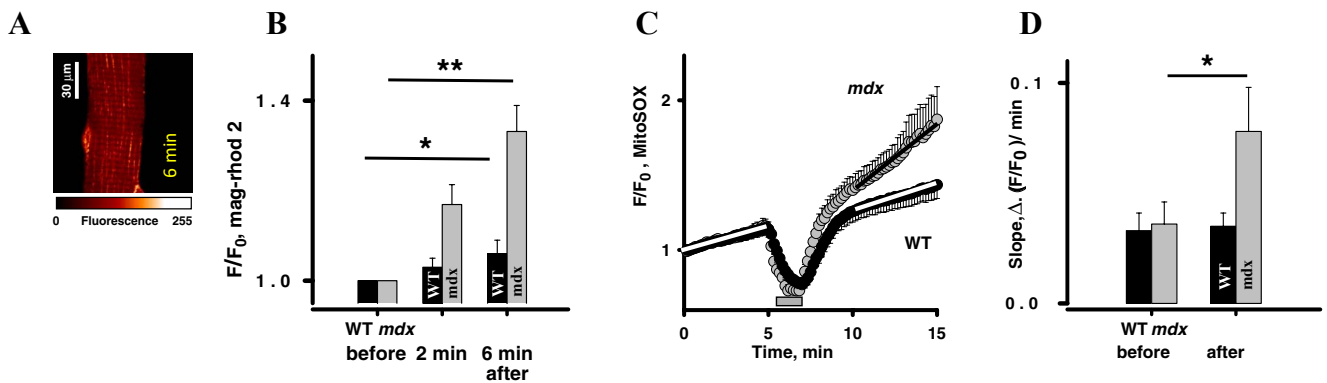
**Рисунок 2.9. Продукція ROS у мішечних волокнах миші лінії mdx.** (А) Усереднена флуоресценція DCF для 7 клітин mdx (сірі кружечки) порівняно з 8 волокнами м'язів з миші лінії WT (чорні кружечки). (В) Верхня частина зображення показує вестерн-блот, рівні білків NOX та актину для м'язових волокон mdx та WT. Нижній блок: співвідношення сигналів gp91<sup>phox</sup> до актину для м'язових волокон mdx (сірий стовпець) та дикого типу (чорний стовпець). (С) Усереднені Ca<sup>2+</sup> сигнали на осмотичний шок у волокнах mdx за контрольних умов (чорні кружечки) та після інкубації з інгібіторами NOX: апоциніном (0.5 мМ, білі кружечки) та DPI (10 мкМ, сірі кружечки).

Збільшена продукція ROS у м'язових волокнах mdx може бути обумовлена (1) підвищеною активністю або експресією NAD(P)H-оксидази (NOX); або (2) активацією додаткових джерел ROS, які відіграють менш важливу роль у волокнах WT. Ми застосовували вестерн-блот для аналізу можливої зміни рівня експресії NAD(P)H-оксидази в скелетних м'язах mdx. Як ілюструється на рис. 2.9В, рівень експресії gp91<sup>phox</sup> у скелетних м'язах mdx (N = 7) зріс більше ніж утричі порівняно з контролем (N = 3, P < 0.01).

У скелетних м'язах NAD(P)H-оксидаза розташована в сарколемі та мембрані Т-трубочок. Її може бути активовано як за допомогою Ca<sup>2+</sup>-залежного, так і Ca<sup>2+</sup>-незалежного механізму (Hidalgo et al., 2006). Додатково було перевірено вплив блокаторів NOX: апоциніну (0.5 мМ) та DPI (10 мкМ) на зміну Ca<sup>2+</sup> сигналу під час осмотичного шоку. Згідно з даними на рис. 2.9С, кожен з препаратів суттєво знижував цитозольні Ca<sup>2+</sup>-відповіді на осмотичний шок. Середнє значення флуоресценції після повернення до ізотонічного розчину знизилося з 1.8±0.04 в контрольній групі (n=8, N=6) до 1.25±0.06 (n=4, N=3) та 1.07±0.06 (n=5, N=3) при застосуванні DPI та апоциніну відповідно. Таким чином, NAD(P)H-оксидаза є фактором, що сприяє підвищенню активності ROS та посиленню Ca<sup>2+</sup>-відповідей на осмотичний шок у скелетних м'язових волокнах миші лінії mdx.

Мітохондрії служать додатковим потенційним джерелом ROS у скелетних м'язах. Посилене поглинання мітохондріального Ca<sup>2+</sup> може стимулювати продукцію мітохондріального АТФ та ROS (Brookes et al., 2004). Цитозольний Ca<sup>2+</sup>, який збільшується через стрес, може бути секвестрований мітохондріями та сприяти

збільшенню продукції ROS мітохондріями, що призводить до витoku ROS в цитозоль, і подальше посилення цитозольних  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів.



**Рисунок 2.10. Мітохондріальні сигнали після осмотичного шоку.** (A) Вибране зображення флуоресценції Mag-rhod-2 у клітині mdx через 6 хв після застосування осмотичного шоку. (B) Усереднені значення зростання мітохондріальної  $\text{Ca}^{2+}$ -пов'язаної флуоресценції після осмотичного шоку в різний час експерименту. (C) Усереднені значення флуоресценції MitoSOX за умов осмотичного шоку. (D) Усереднені значення нахилів сигналів MitoSOX до і після осмотичного шоку.

Рисунок 2.10А ілюструє розподіл мітохондріального Mag-rhod-2 у клітині mdx. У 7 з 10 волокон mdx ( $N = 5$ ) осмотичний шок індукував поступове та істотне підвищення флуоресценції Mag-rhod-2 на  $33 \pm 6\%$  (див. рис. 2.10В). На противагу цьому, в клітинах нормальних мишей істотне збільшення мітохондріального сигналу Mag-rhod-2 спостерігалось значно менше (лише у двох з 12 клітин,  $N = 4$ ). Цей сигнал був нижчим, ніж у клітинах mdx, і в основному зосереджувався у субсарколемальних межах. Середнє значення флуоресценції Mag-rhod-2 зросло з  $69.2 \pm 1.6$  на початку до  $73.6 \pm 2.1$  (в а.о.) або  $6 \pm 0.1\%$ .

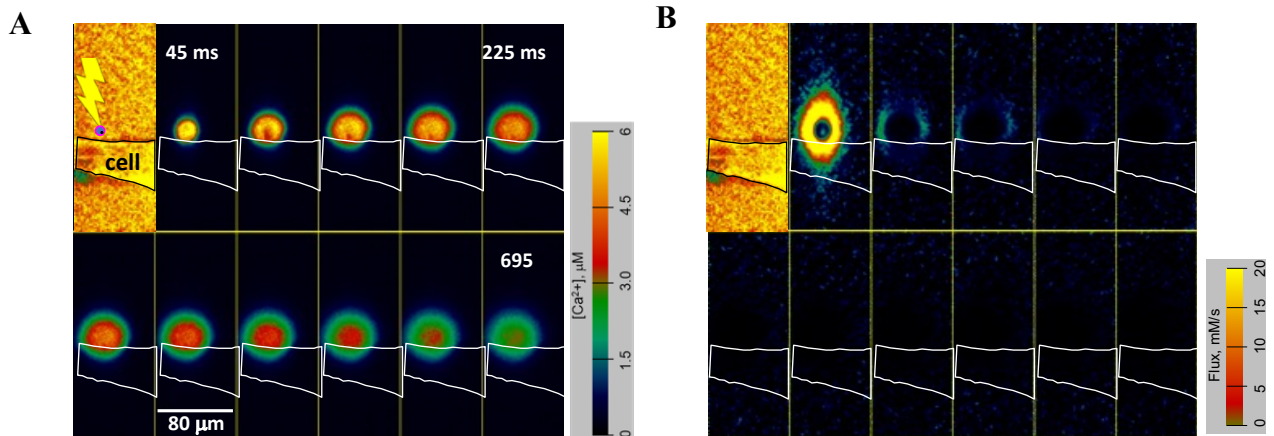
Використовуючи люмінесцентні екворини, що локалізувалися в мітохондрії та СР, Robert та співавтори (Robert et al., 2001) виявили збільшення мітохондріальних сигналів  $\text{Ca}^{2+}$  відповідно до цитозольних транзйентів  $\text{Ca}^{2+}$  у міотрубках від mdx, порівняно з WT. Це свідчить про посилене поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах mdx, що і було підтверджено нашими дослідженнями. Додатково, було вимірено продукцію мітохондріального ROS у клітинах mdx та дикого типу. Волокна навантажували мітохондріальним супероксидним флуоресцентним зондом MitoSOX red і візуалізували в умовах гіпоосмотичного шоку.

На рис. 2.10С зображено усереднену нормалізовану флуоресценцію MitoSOX для волокон mdx (сірі кружечки;  $n = 8$ ) та для клітин WT (чорні кружечки,  $n = 9$ ). Важливо зауважити, що базова продукція ROS мітохондріями, яка відображається початковим нахилом, була трохи вищою в клітинах mdx порівняно з WT. Осмотичний шок викликав аномальну та стійку активність  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів. Ці  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали призводили до накопичення мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  у волокнах mdx та додаткового збільшення клітинного та мітохондріального утворення ROS.

**Кальцій-індукована активація RyRs та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулума у скелетних м'язах.** Внесок  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у ініціацію м'язового скорочення залишається предметом дискусій. Кальцій-індуковане

вивільнення кальцію має бути здійснено тільки завдяки кальцію, без одночасно залучення інших процесів (Endo, 2009).

Для активації RyRs кальцієм у скелетних м'язах ссавців та амфібій ми використовували двофотонне фототривільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з нітродибензофурану NDBF-EGTA для отримання штучного локалізованого підвищення концентрації  $[\text{Ca}^{2+}]$  (SLICs). SLICs дозволяє швидко та зворотно збільшити цитозольний  $[\text{Ca}^{2+}]$  до 8 мкМ, до рівнів, подібних до тих, що досягаються під час фізіологічної активності.



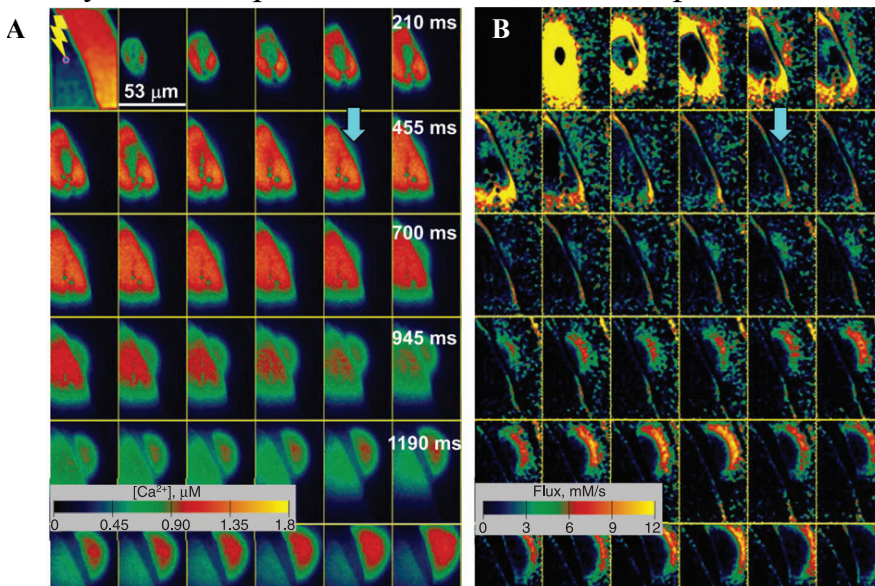
**Рисунок 2.11. Скелетний м'яз миші в нормі не здатні до CICR.** (А) Зображення  $[\text{Ca}^{2+}]$  (x,y,t) пермеабілізованого волокна миші, збалансованого розчином, що містить 3 мМ NDBF-EGTA і 0.3 мкМ вільного  $[\text{Ca}^{2+}]$ , у відповідь на SLICs на відстані 3 мкм від клітини. На першому кадрі зображено положення клітини, контури якої позначено білою лінією на двох верхніх зображеннях. (В) Потік  $\text{Ca}^{2+}$ , розрахований на основі відповідних кадрів  $[\text{Ca}^{2+}]$  (x,y,t) з частини С.

SLICs було застосовано до окремих скелетних волокон, які були ферментативно дисоційовані з FDB миші. Репрезентативний експеримент наведено на рис. 2.11А. На першому кадрі зображено клітину як  $F(x,y)$ ; контур клітини виділений на інших фреймах. Як видно, SLICs не ініціювали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах миші. Аналіз потоку (див. рис. 2.11В) свідчить про повну відсутність вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  в цих клітинах. Умови експерименту, при яких не спостерігалось жодної реакції, включали концентрації  $\text{Mg}^{2+}$  від 0.045 до 3 мМ, вільного  $[\text{Ca}^{2+}]$  в покої від 0.05 до 2 мкМ.

В наступному експерименті досліджувалась здатність до CICR, за рахунок каналів RyR1 при певних нефізіологічних умовах – низький вміст  $[\text{Mg}^{2+}]$  (лише 0.045 мМ). Ця умова була перевірена у 33 експериментах на 8 клітинах, при яких тригерний  $[\text{Ca}^{2+}]$  досягав 3.2 мкМ), проте не призводив до очікуваної реакції. Ми також використовували SLICs для клітин миші у присутності кофеїну і 4-СМС (Westerblad et al., 1998). Ці хімічні агенти сприяють відкриттю каналів RyRs та, принаймні у випадку кофеїну, підвищуючи чутливість каналів до  $\text{Ca}^{2+}$ . Зазначені речовини вводили в концентраціях, які самостійно не приводили до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ми реєстрували відповіді на SLICs, коли кофеїн та 4-СМС були присутні одночасно у концентраціях 1.8 мМ та 0.4 мМ відповідно. Приклад наведено на рис. 2.12, де периферійна хвиля утворювалась та поширювалась без затухання. Середні значення потоків кальцію, що вивільнюються з СР в м'язах ссавців за використання сенсibiliзуючих речовин ріанодинових рецепторів складали  $15.1 \pm 1.2$  мМ/с, з середньою швидкістю поширення хвилі  $46.6 \pm 7.7$  мкм/с (13 клітин). Скелетні м'язи

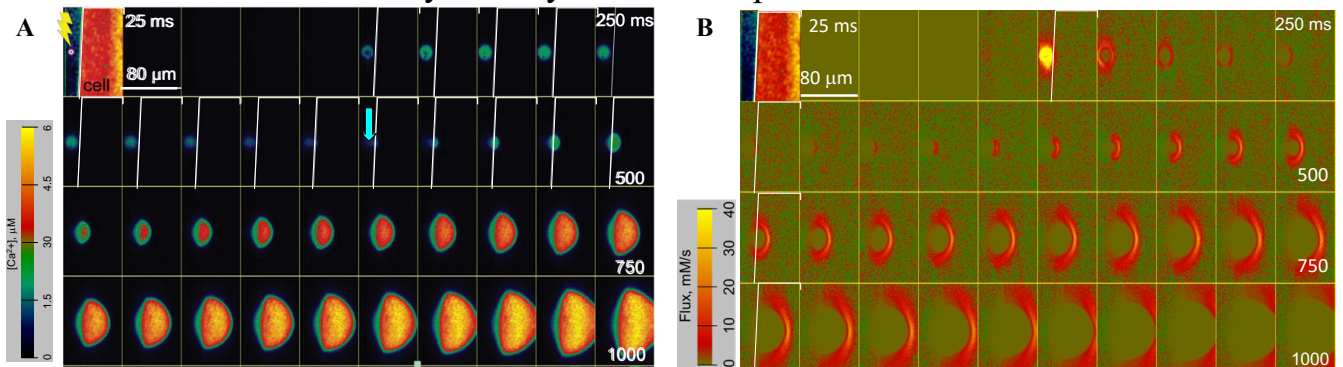
миші можуть демонструвати CICR, але це можливо лише за фармакологічної стимуляції відкриття каналів, тобто поза фізіологічними умовами.



**Рисунок 2.12. Сенсibiliзуючі речовини підсилюють розповсюдження вивільнення кальцію у м'язових волокнах миші.**

(А)  $[Ca^{2+}]$  ( $x,y,t$ ) з пермеабілізованого волокна FDB, яке було врівноважено внутрішнім розчином із 0.4 мМ 4-СМС та 1.8 мМ кофеїну. (В) Потік  $Ca^{2+}$  ( $x,y$ ), отриманий із зображень  $[Ca^{2+}]$  в частині А. Периферійна хвиля вивільнення стає відчутною на 400-500 мс (вказано стрілкою).

У м'язах жаби SLICs викликали реакції, що мали характеристики CICR (рис. 2.13). Поріг  $[Ca^{2+}]$  для ініціації відповіді вивільнення  $Ca^{2+}$  був приблизно 0.5 мкМ, що свідчить на користь участі CICR за фізіологічних умов у м'язах амфібій. Аналіз потоків (рис. 2.13В) виявив постійне вивільнення  $Ca^{2+}$  у клітині. Вивільнення потоків кальцію мало різні швидкості, від 9 до 55 мМ/с (середнє значення  $22.7 \pm 1.6$ ), та відрізнялося швидкістю поширення від 30 до 300 мкМ/с (середнє значення  $98.9 \pm 10.2$ ) у 16 вивчених клітинах. Реакція клітини на CICR зазвичай починалася з початкового підвищення амплітуди, досягала піку і залишалася стабільною під час поширення хвилі по клітині до моменту виходу за межі зображення.



**Рисунок 2.13. Розподілена відповідь на SLICs у м'язовій клітині жаби.** (А) Зображення  $Ca^{2+}$  у клітині жаби. Перший кадр демонструє флуоресценцію в режимі спокою та положення клітини. З 6-го кадру, межі клітини позначено білою лінією. Місце ІЧ-випромінювання, що було застосовано для створення SLICs, відзначено спалахом. (В) Потік  $Ca^{2+}$  ( $x,y,t$ ), виведений з послідовності  $[Ca^{2+}](x,y,t)$ , представлена в частині А.

Скелетні м'язи дорослих ссавців мають переважно ізоформу RyR1. М'язи жаби експресують майже однакову кількість двох ізоформ RyR, які називаються  $\alpha$ - та  $\beta$ -RyR (Murayama and Ogawa, 1992, Olivares et al., 1991). RyR1 у своїй первинній структурі є гомогенний до субодиницю  $\alpha$  RyR та опосередковує вивільнення  $Ca^{2+}$ , спричинене лише деполяризацією і датчиком напруги (Ottini et al., 1996). Чутливість до активації  $Ca^{2+}$  більше виражена у  $\beta$  субодиниці порівняно з субодиницею  $\alpha$  RyRs (Murayama et al. 2001), тобто  $\beta$ -RyR опосередковує кальцій-індуковане вивільнення

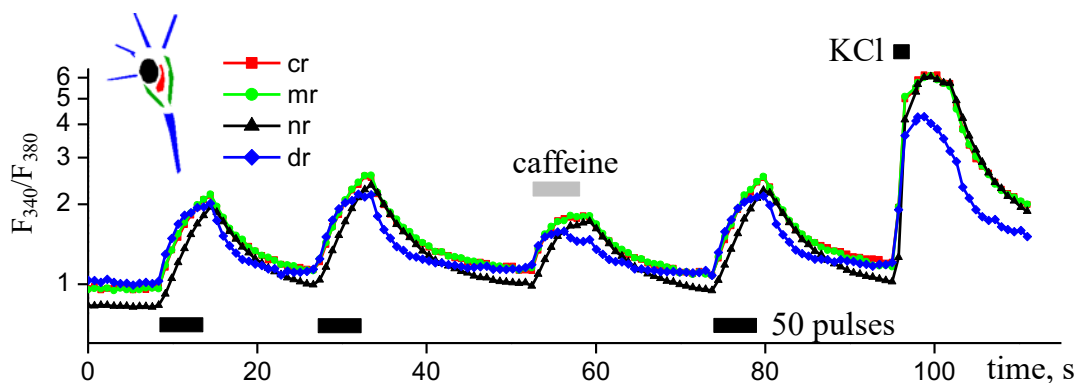


$\text{Ca}^{2+}$ . Важливо зауважити, що ізоформа RyR  $\beta$  є гомогенною до RyR типу 3, які розповсюджені у нервових клітинах (Ottini et al., 1996, Oyamada et al., 1994). Іншими словами, ріанодинові рецептори нервових клітин мають можливість активуватися за рахунок CICR.

### 3. Зміна кальцієвого сигналу у нейронах.

**Просторово-часові властивості кальцієвих транз'єнтів у пірамідних нейронах гіпокампу.** Інформація про участь RyRs у кальцієвій сигналізації в нейронах є суперечливою. Особливі питання стосуються локалізації місця вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума (ER) та його взаємодії з сигналами  $\text{Ca}^{2+}$  під час короткочасної та тривалої стимуляції. В даній роботі, просторово-часові характеристики кальцієвих сигналів були досліджені на культивованих пірамідних нейронах гіпокампу щурів за допомогою двовимірної флуоресцентної мікроскопії. Як зазначалась вище нейрони гіпокампу експресують RyR 3 типу.

На рисунку 3.1 наведені репрезентативні дані, які відображають зміну співвідношення Fura-2 ( $F_{340}/F_{380}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$  сигнали), спричинену двома серіями по 50 імпульсів EFS (використаних для завантаження  $\text{Ca}^{2+}$  до ER), а також подальшого застосуванням 10 мМ кофеїну протягом 5 с для вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ER за участю RyRs.

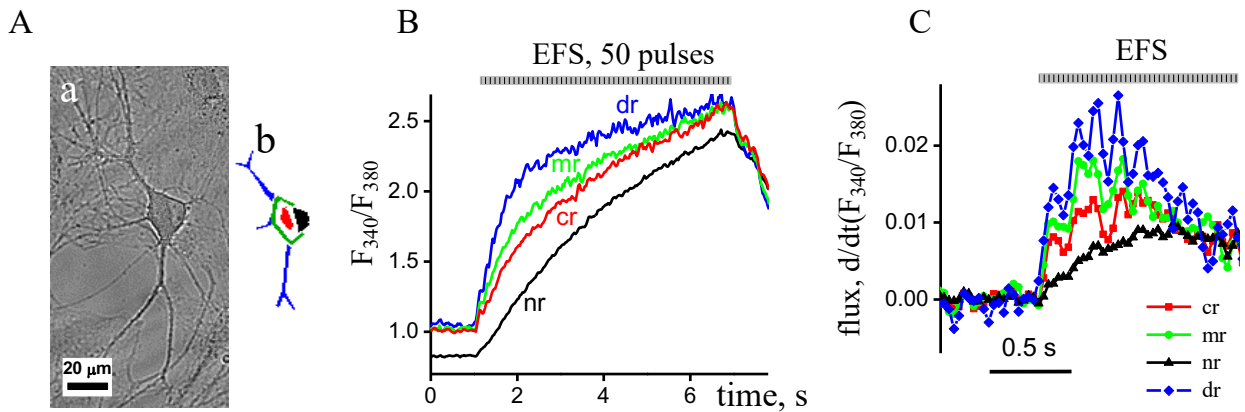


**Рисунок 3.1.  $\text{Ca}^{2+}$ -відповіді в різних ділянках інтересу пірамідних нейронів гіпокампа.**

Транз'єнти  $\text{Ca}^{2+}$  викликані двома серіями по 50 імпульсів стимуляції електричним полем (EFS; чорний прямокутник, 9 Гц), кофеїном (caffeine, світло-сірий прямокутник; 10 мМ і 5 с), серією з 50 імпульсів EFS і деполяризуючого розчину з 50 мМ KCL (KCl, чорний квадрат, 5 с). У лівому верхньому куті наведено схему аналізованих зон: cr – центр, mr – примембранному шарі, nr – ядрі та dr - дендритах.

Значення базального вільного  $\text{Ca}^{2+}$  було значно знижено в ядрі клітини нейрона, на 15% менше порівняно з центральною ділянкою (61 нМ проти 85 нМ,  $n = 30$ ;  $P < 0.001$ ). Амплітуда  $\text{Ca}^{2+}$ -транз'єнту в дендритному дереві пірамідоподібних нейронів у відповідь на EFS становила  $1.18 \pm 0.09$  (207 нМ,  $n = 19$ ), що було значно менше порівняно з субмембранною ділянкою —  $1.62 \pm 0.17$  (303 нМ,  $n = 19$ ;  $P < 0.05$ ), центральною ділянкою —  $1.73 \pm 0.18$  (329 нМ,  $n = 19$ ;  $P < 0.01$ ) та ядрі —  $1.66 \pm 0.17$  (300 нМ,  $n = 19$ ;  $P < 0.05$ ). У дендритному дереві амплітуда  $\text{Ca}^{2+}$ -транз'єнту, спричиненого деполяризацією розчином з високою концентрацією KCl, також значно знижувалася:  $3.43 \pm 0.41$  (0.87 мкМ,  $n = 24$ ) порівняно з субмембранною ділянкою —  $4.76 \pm 0.39$  (1.65 мкМ,  $n = 24$ ;  $P < 0.05$ ), центральною ділянкою —  $4.98 \pm 0.38$  (1.84 мкМ,  $n = 24$ ;  $P < 0.01$ ) та ядрі —  $5.06 \pm 0.39$  (1.81 мкМ,  $n = 24$ ;  $P < 0.01$ ). Клітинна відповідь на кофеїн свідчить про наявність та навантаження кальцієм ER депо, а вивільнення цього іону відбувається за рахунок RyRs.

Швидка двовимірна реєстрація транз'єнтів  $\text{Ca}^{2+}$  під час деполяризації виявила асинхронне зростання концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3.2В). EFS спричиняв збільшення  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів, які спочатку з'являлися в дендритах, потім у субмембранній, центральній і, нарешті, в ядерній ділянках клітини. Потік  $\text{Ca}^{2+}$  на електричну стимуляцію (50 імпульсів; частина С) був найбільшим в дендритах, трохи зменшеним в примембранній зоні та меншим в центрі клітини.

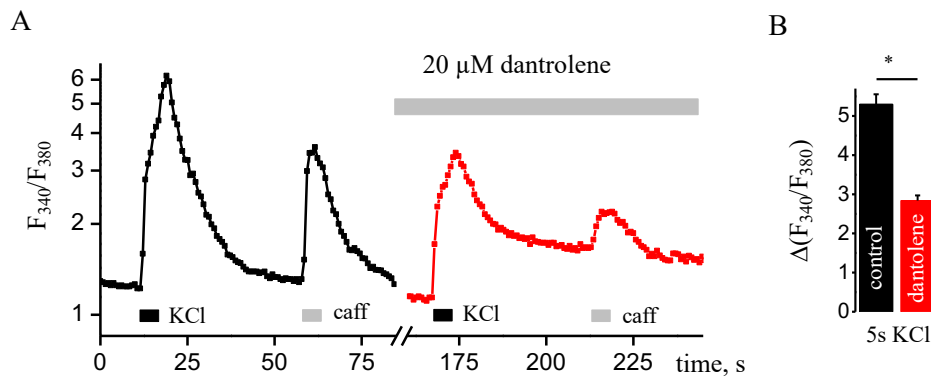


**Рисунок 3.2. Транз'єнтні зміни кальцієвого сигналу в різних ділянках клітини.** (A,a) Зображення клітини, отримане при прямому освітленні. (A,b) Різні ділянки інтересу нейрона позначені кольором. (B) Розподіл співвідношень  $F_{340}/F_{380}$  нейрона з 50 EFS, у вигляді часових профілів. (C)  $d(F_{340}/F_{380})/dt$  (с-1), перша похідна сигналу  $\text{Ca}^{2+}$ . Поточні дані були отримані з даних, представлених у частині (C).  $\text{Ca}^{2+}$ -відповіді реєстрували в центральній ділянці (cr; червона лінія), субмембрані (mr; зелена лінія), дендритному дереві (dr; синя лінія) та ядрі (nr; чорна лінія) культивованих нейронів гіпокампу, навантажених флуоресцентним  $\text{Ca}^{2+}$ -індикатором Fura-2.

Сигнал  $\text{Ca}^{2+}$  в цих пірамідальних нейронах спочатку з'являвся на периферії клітини в примембранній області та дендритах, а потім у центрі нейрона. Він мав подібні ознаки розповсюдження кальцієвого сигналу, яке спостерігається в міоцитах передсердь, де він спочатку виникає на периферії міоцита, а потім розповсюджується до центру клітини.

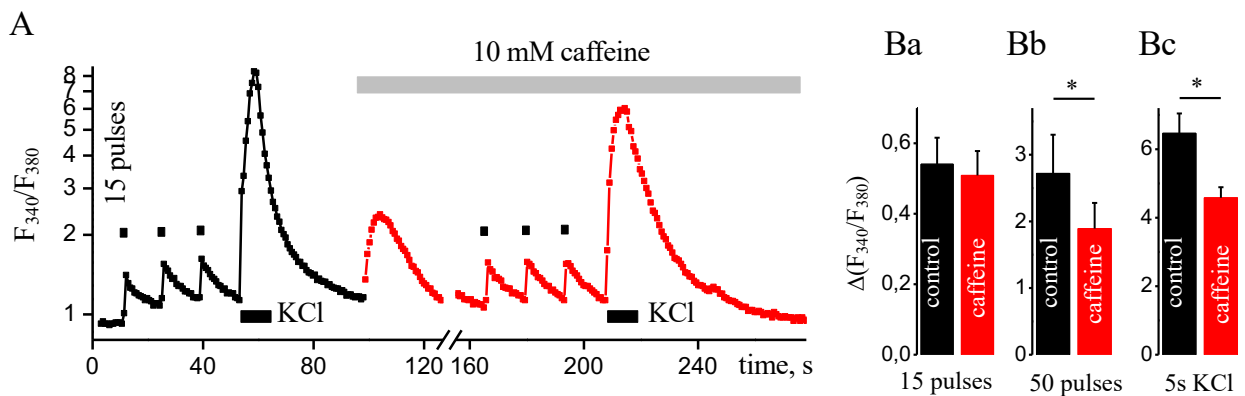
Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР відбувається при відкритті RyRs та IP<sub>3</sub>Rs (Rizzuto and Pozzan, 2006). Вивільнення кальцію через IP<sub>3</sub>Rs з дендритів зазвичай ініціюється дією нейромедіаторів, таких як глутамат (Niswender and Conn, 2010). У свою чергу, RyRs активуються при зростанні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі (Shkryl and Blatter, 2013, Blatter, 2017) через кальцій-опосередковану активацію RyRs відомою як CICR (Fabiato, 1983).

20 мкМ дантролену було використано для інгібування RyRs. На рисунку 3.3А представлений зміни сигналу  $\text{Ca}^{2+}$ , отримані з нейрона в контрольних умовах (лінія з чорними квадратами), та при додаванні 20 мкМ дантролену (лінія з червоними квадратами). У контрольному досліді базальний рівень вільного кальцію досягав  $1.23 \pm 0.03$ , тоді як у присутності дантролену цей показник склав  $1.10 \pm 0.03$ . Амплітуда  $\text{Ca}^{2+}$ -транз'єнтів, викликаних деполяризуючим розчином, при додаванні 20 мкМ дантролену зазнала істотного зниження і скоротилася з  $5.30 \pm 0.26$  до  $2.84 \pm 0.13$  (рис. 3.2E;  $n = 29$ ,  $P < 0.001$ ). Завантаженість ЕР у присутності дантролену також істотно знизилась: до  $0.682 \pm 0.06$  з  $1.72 \pm 0.14$  ( $n = 28$ ,  $P < 0.01$ ). Ці дані надають доказ участі RyRs у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації культивованих пірамідних нейронів гіпокампу.



**Рисунок 3.3. Транзйенти  $\text{Ca}^{2+}$  в умовах блокування RyRs.** (А) Транзйентне збйльшення  $[\text{Ca}^{2+}]$ , викликане деполяризуючим розчином (KCl, чорний прямокутник, 5 с) та кофеїну (caffeine, світло-сйрий прямокутник; 10 мМ і 5 с) у контрольних умовах (чорна лйня з квадратом) та при постййній присутності 20 мкМ дантролену (червона лйня з квадратом) для блокування вивйльнення кальцйю з ЕР. (В) Середнй значення амплітуди транзйентних коливань  $[\text{Ca}^{2+}]$ , викликаних деполяризуючим розчином. Результати представленй як середнй значення  $\pm$  S.E., \* $P < 0.05$ .

Для йндуkцйї вивйльнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР, ми застосували кофеїн — агоністу RyR, який ранйше виявляв здатнйсть пйдвищувати цитозольнй концентрацйї  $\text{Ca}^{2+}$ . На рисунку 3.2А представлена вибйркова реєстрацйя, де показано змйни сигналу  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроні: у контрольних умовах (чорний графйк) та при додаванні 10 мМ кофеїну (червоний графйк). В присутності кофеїну, коли RyRs були вимкнутй, амплітуда  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенту викликаного короткочасною стимуляцйєю (15 ймпульсйв, 9 Гц) не змйнювалась. Проте при тривалйї стимуляцйї (50 ймпульсйв, 9 Гц) та 5 с аплікацйї деполяризуючого розчину  $\text{Ca}^{2+}$  транзйент достовйрно зменшився на 30% (рис. 3.4В). Таким чиним, при тривалйї стимуляцйї спостерйгається вивйльнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР через RyRs внаслйдок дйї кофеїну.



**Рисунок 3.4. Виявлення RyRs опосередкованой компоненти  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу.** (А) Транзйентне збйльшення  $[\text{Ca}^{2+}]$ , викликане трьома серйями по 15 ймпульсйв EFS (чорний квадрат; 1 с) з наступним застосуванням деполяризуючого розчину (KCl, чорний прямокутник, 5 с) у контролй (лйня з чорними квадратами) та при повторних стимуляцйях у присутності 10 мМ кофеїну (caffeine; лйня з червоними квадратами), для блокування вивйльнення кальцйю з ЕР. (В) Середнй значення амплітуди другого транзйенту  $\text{Ca}^{2+}$ , викликаного 15 (а) або 50 (б) ймпульсами EFS, та транзйенту  $\text{Ca}^{2+}$  в умовах дйї розчину великим вмістом KCl (с), у контролй та при додаванні 10 мМ кофеїну. Результати представленй як середнй значення  $\pm$  S.E., \* $P < 0.05$ .

Ранйше було зазначено, що рйанодинчутливй депо  $\text{Ca}^{2+}$  в рйзних центральних нейронах щурйв (зокрема в нейронах CA1 гйпокампу) є порожнйми в станй спокою та накопичують  $\text{Ca}^{2+}$  лише пйсля його надходження через потенцйал-керованй  $\text{Ca}^{2+}$ -

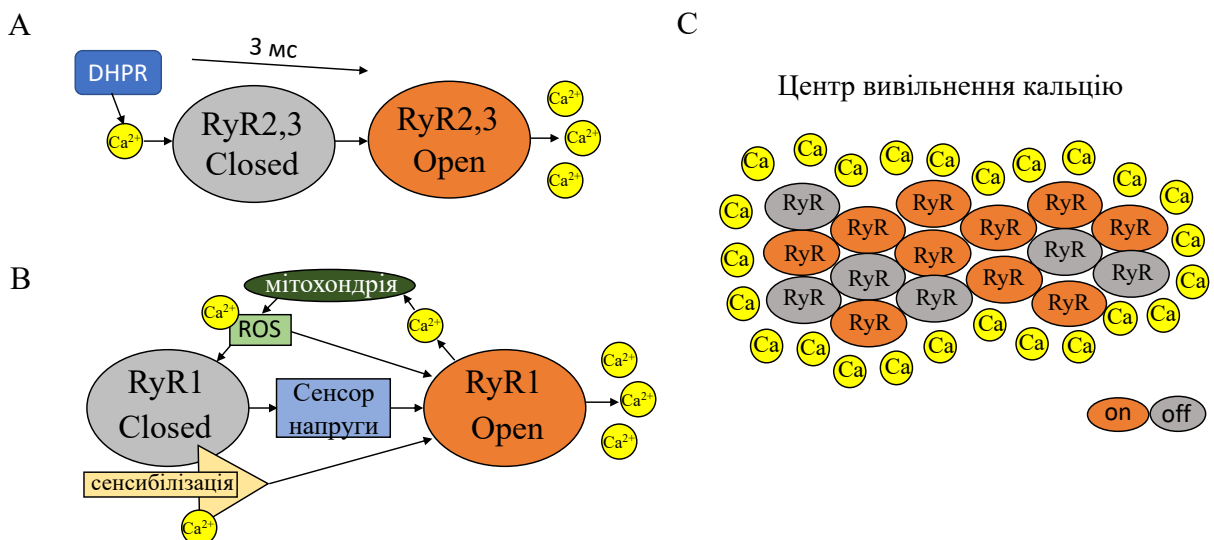
канали в плазмалемі (Brorson et al., 1991, Garaschuk et al., 1997, Shmigol et al., 1994). de Juan-Sanz та співавтори (de Juan-Sanz et al., 2017) виявили вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР у відповідь на поодинокій ПД або серію з 20 потенціалів дії з частотою 20 Гц.

Було нещодавно показано, що сома пірамідних нейронів утворює ретикулярну мережу ЕР і простягається через дендрити та всю довжину аксона, включаючи пресинаптичні бутони (de Juan-Sanz et al., 2017). Також було встановлено, що повторна тетанична синаптична стимуляція пірамідних клітин CA1 у препараті зрізу індукує вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з дендритних або пресинаптичних ріанодинчутливих рецепторів  $\text{Ca}^{2+}$  (Alford et al., 1993, Tran and Stricker, 2021). Як це показано в нашій роботі, виснаження кофеїн-чутливих запасів  $\text{Ca}^{2+}$  не впливає на амплітуду  $\text{Ca}^{2+}$ -транз'єнтів, викликаних деполяризацією при низькочастотній активності. Однак тривала стимуляція (5 с) з використанням високого рівня КСІ або довга послідовність EFS (50 імпульсів, 9 Гц) у пірамідних клітинах CA1 спричинює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  не лише в дендритних ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -сховищах, як це було вказано раніше (Alford et al., 1993, Garaschuk et al., 1997, Tran and Stricker, 2021), але й у субмембранних та центральних регіонах.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

Вивчення кальцієвої сигналізації збудливої клітини є важливою задачею для сучасної біофізики м'язової чи нервової клітини. Зміна концентрації кальцію впливає на безліч процесів, пов'язаних зі зміною рівня кальцію в клітині в широкому діапазоні від 50 нМ до 10 мкМ. Кальцій входить у клітину через трансмембранні кальцієві канали і потребує подальшого вивільнення до цитозолу зі внутрішньоклітинних депо.

Встановлення механізмів підсилення кальцієвого сигналу за рахунок вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму при відкритті ріанодинових рецепторів, було ускладнено через неможливість протягом тривалого часу реєструвати активність цих каналів безпосередньо в клітині. Запровадження швидкої конфокальної мікроскопії та флуоресцентних барвників дозволило реєструвати кальцієві сигнали, пов'язані з відкриттям RyRs.



**Рисунок. 4.1.** Схематичне зображення вивільнення кальцію з депо за рахунок RyRs. Відкриття RyR типу 2 та 3 (А) та RyR типу 1 (В). (С) Відкриття RyRs в центрі вивільнення кальцію.

Ріанодинові рецептори типів 2 та 3 за нормальних умов можуть активуватися кальцієм (рис. 4.1А). В міоцитах, після початку входу кальцію через DHPR, необхідно 3 мс для початку вивільнення кальцію з СР, при цьому воно починається в час максимального струму. RyR1 активуються кальцієм лише за умов сенсibiliзації або при впливі активних форм кисню, які можуть бути згенеровані у цитозолі, NADP(Н)-оксидазою чи мітохондрією (рис. 4.1В). Зміна глобального сигналу кальцію складається з дискретних подій – кальцієвих спалахів, що є результатом відкриття 20÷30 каналів RyRs; при цьому може спостерігатися рефрактерність механізму вивільнення кальцію, коли зазначені рецептори не встигають відновитися до наступного вивільнення (рис. 4.1С), що може призводити до альтернацій кальцію та аритмії міокарду.

Дана робота вирішує важливу наукову проблему впливу та формування кальцієвого сигналу за рахунок RyRs, при модуляції останніх за рахунок активних форм кисню, NADP(Н)-оксидази, взаємозв'язку з мітохондріальним кальцієм та NADH сигналом, рівнем електричної стимуляції, що було виявлено за допомогою швидкої конфокальної мікроскопії та раніше не було досліджено.

## ВИСНОВКИ

У даній роботі мною представлені результати мого комплексного дослідження особливостей регуляції кальцієвого сигналу в м'язових і нервових клітинах. Застосовуючи передові методи біофізичної візуалізації, зокрема швидку конфокальну мікроскопію, було розглянуто різноманітні моделі локальних (відкриття групи каналів RyRs, візуалізований як спалахи  $\text{Ca}^{2+}$ ) та глобальних сигналів змін концентрації кальцію в м'язових і нервових клітинах. З отриманих результатів зроблено наступні висновки:

1. Використовуючи високошвидкісну конфокальну двовимірну візуалізацію, вперше було продемонстровано надійну диференціацію між входом  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціал-залежні  $\text{Ca}^{2+}$ -канали поверхневої мембрани та RyRs-індукованим вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з СР на рівні окремих одиниць вивільнення в інтактних кардіоміоцитах як в просторі так і часі. Фаза наростання  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів має ступінчасту кінетику, що свідчить про участь групи каналів RyRs при вивільненні кальцію, візуалізованого як спалах  $\text{Ca}^{2+}$ .

2. Вперше, було використано тривимірне конфокальне сканування в часі для реєстрації вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР під час відкриття каналів RyRs, що представляють собою новий метод візуалізації  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів, які реєструються у місці вивільнення кальцію. Вперше було встановлено, що ці сфокусовані спалахи мають значно більші амплітуди порівняно з загальною кількістю виявлених несфокусованих спалахів і демонструють модальний розподіл амплітуди спалахів. Для виявлених  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів із часом наростання 11 мс, було розраховано, що такі сфокусовані спалахи потребують струму вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у розмірі 11 пА, що свідчить про залучення від 20 до 30 відкритих каналів RyRs.

3. Альтернації цитозольних транз'єнтів  $\text{Ca}^{2+}$  можуть відбуватися за відсутності міжімпульсних змін фізіологічного тригера кальцієвого струму через DHPR та зміни кінцевого діастолічного рівня кальцію в саркоплазматичному ретикулумі. Представлені переконливі докази про те, що в міоцитах передсердь залежні від часу

властивості реституції та рефрактерна кінетика механізму вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з CP є основним причинним фактором виникнення  $\text{Ca}^{2+}$  альтернацій.

4. Встановлено, що значна кількість мітохондрій встановлює тісні функціональні та можливо структурні взаємодії з CP, формуючи таким чином субклітинні мікродомени, що характеризуються переважною доступністю  $\text{Ca}^{2+}$  до цих органел.

5. Було показано, що поява спалахів  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабілізованих клітинах скелетних м'язів ссавців пов'язана з редокс-станом мітохондрій, при цьому дисбаланс між генерацією мітохондріальних активних форм кисню та здатністю клітини протистояти і нейтралізувати оксидативний стрес є причиною руйнування фізіологічного інгібування кальцій-індукованого вивільнення кальцію.

6. У інтактних скелетних м'язах миші осмотичний шок значно збільшує продукцію активних форм кисню. Преінкубація клітин з поглиначами ROS (MnTBAP, Mn-cpx 3, TIRON) усуває осмотично індуковані  $\text{Ca}^{2+}$  спалахи. У скелетних м'язових волокнах лінії миші mdx виявлено збільшену генерацію ROS та експресію NAD(P)H-оксидази порівняно з нормальними мишами. В mdx м'язових волокнах FDB, під час осмотичного шоку спостерігалось збільшення цитозольного ROS, мітохондріального кальцію та мітохондріального ROS, що призводить до стійкої активності  $\text{Ca}^{2+}$  спалахів по всій площині клітини.

7. У скелетних м'язах жаб за фізіологічних умов RyRs можуть активуватися за рахунок кальцій-індукованого вивільнення кальцію. Навпаки, скелетні м'язові волокна миші можуть демонструвати CICR тільки при фармакологічній сенсibiliзації каналів RyRs, тобто поза фізіологічних умов, при цьому супроводжуючись меншим потоком вивільнення кальцію з CP.

8. Асинхронне зростання  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу було виявлено у пірамідних нейронах гіпокампу щурів. Вивільнення кальцію з CP за рахунок RyRs спостерігалось в підмембранній зоні, дендритному дереві та центральній ділянці. Коротка електрична стимуляція (15 імпульсів, 9 Гц) недостатня для ініціації опосередкованого  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу через RyRs. Проте, тривала стимуляція (50 імпульсів, 9 Гц) призводить до того, що 30% пікової амплітуди  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенту відповідає вивільненню кальцію з CP за рахунок RyRs.

9. Отримані дані свідчать про важливу роль ріанодинових рецепторів у кальцієвій сигналізації в м'язових і нервових клітинах. Виявлено, що характер взаємодії та регуляції цих рецепторів відрізняється в залежності від типу клітин: скелетних м'язів, кардіоміоцитах та нейронів гіпокампу. Такі явища, як вивільнення кальцію та відкриття ріанодинових рецепторів, були модульовані різними факторами, такими як активні форми кисню, NAD(P)H-оксидазою, зміною рівня мітохондріального кальцію та самим кальцієм. CICR в скелетних м'язах ссавців виникали при стресі чи зміні редокс-стану мітохондрій, або сенсibiliзацією рецептору. Кальцій-індуковане вивільнення кальцію з депо в нормі є характерним для м'язів амфібій, міоцитах передсердь і шлуночків серця. У нейронах ріанодин-опосередковане підвищення кальцієвого сигналу спостерігалось лише при тривалій електричній стимуляції клітини. Ця точна регуляція внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу є важливою для нормального функціонування збудливих клітин.

## АНОТАЦІЯ

*Шкриль В.М.* Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису за сукупністю наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

У роботі представлені результати комплексного дослідження клітинних та молекулярних механізмів, які беруть участь у регуляції внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації у м'язових і нервових клітинах шляхом вивчення ролі ріанодинових рецепторів (RyRs). Ці рецептори відповідають за вивільнення кальцію з сарко/ендоплазматичного ретикулуму в цитозоль. Процес вивільнення кальцію з депо має велике значення для функціонування м'язів і нервової системи.

У даному дослідженні властивості кальцієвих спалахів (відкриття RyRs) у кардіоміоцитах передсердь були вперше досліджені за допомогою чотиривимірної конфокальної мікроскопії. Встановлено, що амплітуда  $Ca^{2+}$  спалахів зареєстрованих у місці вивільнення мали модальний розподіл і для формування спалаху  $Ca^{2+}$  необхідна активність 20 ÷ 30 відкритими RyRs. Ця методика дозволяє досліджувати RyRs, визначати потік вивільнення з великою достовірністю, що дає можливість використати її для фармакологічних досліджень ріанодинових рецепторів.

Показано, що динаміку збільшення концентрації  $Ca^{2+}$ , що входить у кардіоміоцит, та кальцій-індукованого вивільнення кальцію (CICR), можна достовірно розділити на рівні окремих центрів вивільнення кальцію за рахунок відкриття другого типу RyRs як у клітинах передсердя, так і у шлуночків міокарда, як у часі, так і просторі.

Було отримано перші прямі докази того, що в міоцитах передсердь зміна кінетики реституції вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР від стимулу до стимулу є ключовим причинним механізмом виникнення  $Ca^{2+}$ -альтернацій, як важливий механізм утворення серцевої аритмії.

В даній роботі було ідентифіковано мікродомени в скелетних м'язах, де кальцій, що вивільняється з СР має прямий доступ до мітохондрій. Встановлено, що дисбаланс між генерацією активних форм кисню та спроможністю клітин нейтралізувати окислювальний стан обумовлює появу спалахів  $Ca^{2+}$  при відкритті першого типу RyRs в скелетних м'язах ссавців. Надмірне утворення ROS та аномальні сигнали  $Ca^{2+}$  в дистрофічних скелетних м'язах взаємопов'язані, утворюючи порочне коло шкідливих подій, які сприяють аномальній чутливості RyRs при осмотичному стресі. Було виявлено значно збільшену експресію NAD(P)H-оксидаза у м'язах миші лінії mdx, сприяючи підвищеному утворенню ROS. Додатково встановлено, що при осмотичному шоці відбувається збільшення мітохондріального кальцію та посилення утворення мітохондріального ROS порівняно з нормальними тваринами.

Кальцій-індуковане вивільнення кальцію, що відбувається через активацію RyRs кальцієм, було досліджено на м'язових скелетних волокнах амфібій та ссавців. Показано відсутність активації RyR1 кальцієм за рахунок CICR у скелетних м'язів

ссавців в нормі, але ріанодинові рецептори в скелетних м'язах жаб можуть генерувати кальцій індуковане вивільнення кальцію з СР.

Досліджено роль третього типу RyRs у регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу в пірамідних нейронах гіпокампу. Зростання  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу є асинхронним і затримується в центральній ділянці порівняно з примембранними ділянками або в дендритах, де спостерігається його швидший розвиток. Більш коротка електрична стимуляція не викликала збільшення сигналу  $\text{Ca}^{2+}$  через CICR. Для вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулуму через RyR3 була необхідна тривала стимуляція електричним полем.

Отримані дані, щодо змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію в м'язових і нервових клітинах, вказують на складний процес регуляції кальцієвого сигналу. Мітохондрія, залежно від її функціональної близькості до СР, бере активну участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію і може модулювати активність RyRs через механізми, що включають АТФ і ROS. Регуляція кальцієвого сигналу відбувається завдяки змінам активності ріанодинових рецепторів, які модифікують своє функціонування через зміну окислювально-відновного потенціалу мітохондрій, впливу активних форм кисню, NAD(P)H-оксидази, а також в залежно від їхнього функціонального розташування на периферії або в центрі клітини, і модуляцією самим кальцієм.

**Ключові слова:** кальцій, мембранний транспорт, ріанодинові рецептори, кальцієві канали L-типу, мітохондрії, АТФ,  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, активні форми кисню, окиснювальний стрес, м'язи, кардіоміоцити, нейрони, петч-клемп, мікроскопія.

## ABSTRACT

*Shkryl V.M.* Ryanodine receptor-mediated calcium signaling in muscle and nerve cells. – Collection of scientific manuscripts.

The thesis focuses on conducting a comprehensive investigation into the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of intracellular calcium signaling in muscle and nerve cells by examining the role of ryanodine receptors (RyRs). These receptors are responsible for the release of calcium from the sarco/endoplasmic reticulum into the cytosol. The process of releasing calcium from the store is essential for the functioning of muscles and the nervous system.

In the present study, the properties of calcium sparks (opening of RyRs) in atrial cardiomyocytes were first investigated using four-dimensional confocal microscopy. It was demonstrated that the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks recorded in focus had a modal distribution. It was also found that activity of 20 to 30 open RyRs is necessary for the formation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. This technique enables precise studies of RyRs and the determination of release flux with high accuracy, thus facilitating its application in pharmacological investigations of ryanodine receptors.

It has been shown that the dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cardiomyocyte and calcium-induced calcium release (CICR) can be reliably separated at the level of individual calcium release sites due to the opening of the second type of RyRs in both atrial and ventricular myocardial cells, both in time and space.

Furthermore, we obtained the first direct evidence that the state of ryanodine receptors in atrial cardiomyocytes influences calcium alternans. Our findings demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$



alternations are associated with the kinetics of SR release restitution. This provided the initial direct evidence that refractory of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR plays a pivotal role in the occurrence of beat-to-beat  $\text{Ca}^{2+}$  alternans in cardiomyocytes.

In this study, we have identified microdomains within skeletal muscle where calcium has direct access to mitochondria upon release from the SR. We found a correlation between the activity of the first type of RyRs, as evidenced by the occurrence of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  sparks, and the mitochondrial redox potential in skeletal muscle cells. Our investigations revealed that that reactive oxygen species (ROS) can regulate RyR1 and  $\text{Ca}^{2+}$  release from SR.

Further studies demonstrated that ROS can induce aberrant RyRs activity in intact skeletal cells, leading to the emergence of calcium sparks at the cell's periphery under osmotic stress. NAD(P)H oxidase was identified as a potential source of ROS. Under osmotic shock, there is an additional increase in mitochondrial calcium and increased mitochondrial ROS production in mdx skeletal muscle fibers compared to normal ones, as well as an additional increase in mitochondrial ROS production, which amplifies abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.

The ability of CICR to initiate the activation of RyRs by calcium was investigated in both amphibian and mammalian skeletal muscle fibers. It has been demonstrated that under physiological conditions, there is no activation of RyR1 by calcium via CICR in mammalian skeletal muscle. However, ryanodine receptors in frog skeletal muscle exhibit the ability to produce calcium-induced release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the SR.

The role of the third type of RyRs in the regulation of intracellular calcium signaling in hippocampal pyramidal neurons was investigated. Our analysis revealed an asynchronous and delayed increase in free calcium concentration in specific areas of the neuron. Interestingly, short-term electrical stimulation did not augment the  $\text{Ca}^{2+}$  signal through CICR. However, prolonged stimulation was found to be sufficient to elicit calcium release from the endoplasmic reticulum via RyRs.

The data obtained regarding changes in intracellular calcium concentration in muscle and nerve cells indicate a complex process of calcium signal regulation. Mitochondria, depending on their functional proximity to the SR, actively participate in the regulation of intracellular calcium concentration and modulate ryanodine receptor activity via mechanisms involving ATP and ROS. Regulation of calcium signaling is attributed to variations in the activity of ryanodine receptors, which adapt their functionality in response to alterations in mitochondrial redox potential, the influence of reactive oxygen species, NAD(P)H oxidase, and their specific subcellular localization—whether in the periphery or at the center of the cell. Furthermore, calcium itself plays a modulatory role in their function.

**Keywords:** *calcium, membrane transport, ryanodine receptors, L-type of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, mitochondria, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, reactive oxygen species, oxidative stress, muscle, cardiomyocytes, neurons, patch-clamp, microscopy.*

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Основні наукові результати дисертації**, опубліковані у фахових виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікацій SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports:

1. **SHKRYL, V. M.** 2022. The spatio-temporal properties of calcium transients in hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Front Cell Neurosci*, 16, 1054950.
2. **SHKRYL, V. M.** 2020. Error correction due to background subtraction in ratiometric calcium measurements with CCD camera. *Heliyon*, 6, e04180.
3. FIGUEROA, L., **SHKRYL, V. M.**, BLATTER, L. A. & RÍOS, E. 2013. Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range. *PLoS One*, 8, e55778.
4. **SHKRYL, V. M.** & BLATTER, L. A. 2013. Ca(2+) release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging. *PLoS One*, 8, e61525.
5. **SHKRYL, V. M.**, BLATTER, L. A. & RÍOS, E. 2012. Properties of Ca<sup>2+</sup> sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle. *J Gen Physiol*, 139, 189-207.
6. **SHKRYL, V. M.**, MAXWELL, J. T., DOMEIER, T. L. & BLATTER, L. A. 2012. Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release determines Ca<sup>2+</sup> alternans in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H2310-20.
7. **SHKRYL, V. M.**, MAXWELL, J. T. & BLATTER, L. A. 2012. A novel method for spatially complex diffraction-limited photoactivation and photobleaching in living cells. *J Physiol*, 590, 1093-1100.
8. FIGUEROA, L., **SHKRYL, V. M.**, ZHOU, J., MANNO, C., MOMOTAKE, A., BRUM, G., BLATTER, L. A., ELLIS-DAVIES, G. C. & RÍOS, E. 2012. Synthetic localized calcium transients directly probe signalling mechanisms in skeletal muscle. *J Physiol*, 590, 1389-411.
9. **SHKRYL, V. M.**, MARTINS, A. S., ULLRICH, N. D., NOWYCKY, M. C., NIGGLI, E. & SHIROKOVA, N. 2009. Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch*, 458, 915-28.
10. MARTINS, A. S. \*, **SHKRYL, V. M.** \*, NOWYCKY, M. C. & SHIROKOVA, N. 2008. Reactive oxygen species contribute to Ca<sup>2+</sup> signals produced by osmotic stress in mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 586, 197-210. \* перший автор
11. **SHKRYL, V. M.** & SHIROKOVA, N. 2006. Transfer and tunneling of Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 281, 1547-54.
12. ISAEVA, E. V. \*, **SHKRYL, V. M.** \* & SHIROKOVA, N. 2005. Mitochondrial redox state and Ca<sup>2+</sup> sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 565, 855-72. \* перший автор

### Додатково наукові результати дисертації:

1. SHKRYL, V. M. 2017. Intracellular Calcium Fluxes in Excitable Cells. *Neurophysiology*, 49, 384-392.
2. SHKRYL, V.M. 2017. Основні принципи конфокальної мікроскопії кальцієвих сигналів. *Біофізичний вісник*, 2(38), 20-34. doi: 10.26565/2075-3810-2017-38-03.

3. ШКРИЛЬ, В.М. 2017. Спосіб визначення вмісту вільного кальцію в клітині при двохвильовому методі збудження флуоресцентного барвника. пат. 117834 Україна. № U 2017 00787. заявл. 30.01.2017 ; опубл. 10.07.2017, Бюл. № 13.
4. SHKRYL V.M., BLATTER L.A. 2020. Ca signaling during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. In: «Neurophysiological Essays of Platon Kostyuk and his Students» (Eds. Krishtal O.A., Lukyanetz E.A.). Akadempriodyka, Kyiv, p. 237-243.
5. ROZUMNA, N. M., SHKRYL, V. M., GANZHA, V. V. & LUKYANETZ, E. A. 2021. Effects of Modeling of Hypercalcemia and  $\beta$ -Amyloid on Cultured Hippocampal Neurons of Rats. *Neurophysiology (Ukraine)*, 52, 348-357.
6. SHKRYL, V. M., GANZHA, V. V. & LUKYANETZ, E. A. 2021. Effect of memantine on calcium signaling in hippocampal neurons cultured with  $\beta$ -amyloid. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 67, 1-8.
7. SHKRYL, V. M., TURYTSKA, T. G., YAVORSKY, V. A., LYASHENKO, V. P., LUKASHOV, S. M. & LUKYANETZ, E. A. 2021. Effect of caffeine and coffee diets on calcium signalling in rat hippocampal neurons. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 67, 37-43.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Hanzha V.V., Rozumna N.M. Shkryl V. M., Lukyanets O. O. 2023. The influence of dantrolene on hippocampal neurons in conditions of cultivation with amyloid- $\beta$ . Збірник тез доповідей ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства. С. 209-211.
2. Ганжа ВВ, Розумна НМ, Шкриль ВМ, Лук'янець ОО. 2022. Вплив дантролену на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів в умовах культивування з амілоїдом- $\beta$ . *Фізіол. журн.*, Т. 68(3S), С. 9.
3. Shkryl V. M., Ganzha V. V., Lukyanetz E. A. 2022. Influence of dantrolene on cytoplasmic calcium in hippocampal pyramidal neurons in vitro treated with amyloid-beta. *Fiziologichnyi Zhurnal*. Т. 68(3S), С. 37.
4. Shkryl V.M. 2022. The spatio-temporal changes in the intracellular calcium level in the pyramidal hippocampal neurons. *Fiziologichnyi Zhurnal*. Т. 68(3S), С. 47.
5. Ганжа ВВ, Шкриль ВМ, Розумна НМ, Лук'янець ОО. 2021. Дослідження впливу кальцію на життєздатність нейронів культури гіпокампу щурів в умовах культивування з А $\beta$ -амілоїдом.// тези доповідей ІІІ науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю: «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». – Харків, 12 травня, С. 54.
6. Shkryl VM, Rozumna NM, Ganzha VV, Lukyanetz EA. 2021. Effects of hypercalcemia and  $\beta$ -amyloid on intracellular calcium concentration in hippocampal cultured neurons of rats. 42 Наукові читання імені О.О. Богомольця. 24 травня, 2021. – С. 107. DOI: 10.32345/conf.2021/NMU/Kyiv
7. Ганжа ВВ, Шкриль ВМ, Розумна НМ, Лук'янець ОО. 2021. Вплив мемантину на нейрони гіпокампу щурів при їх культивуванні з амілоїдом А $\beta$ -1-42. // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції перші читання присвячені Д.О.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології». – Харків, 26 березня, 2021. – С. 41-42.

8. Шкрыль ВМ, 2019. Вивільнення іонів кальцію з внутрішнього депо в збудливих клітинах. Фізіол. журн., Т. 65(3), 37-38
9. Lukyanetz EA, Chopovska VV, Kravenska EV, Yavorskaya EN, Shkryl VM. 2014. Effect of  $\beta$ -amyloid on calcium signaling in rat hippocampal neurons. Programme book of 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9 2014, Abstract Number: FENS-2031 p. 320
10. Блашків Т.В., Шкрыль В.М., Широкова Н.В. 2012. Малат-аспартатные митохондриальные переносчики принимают участие в регуляции частоты спарков в пермеабиллизированных волокнах скелетной мышцы крыс. Актуальные вопросы биологической физики и химии, Севастополь 2012, С48 -50
11. Kysilov BA, Shkryl VM, Lukyanetz EA. 2013. Changes in calcium homeostasis in cultured hippocampal rat neurons under action of beta-amyloid. Kiev Taras Shevchenko symposium for young scientist.
12. Figueroa L, Shkryl VM, Zhou J, Manno C, Momotake A, Brum G, Blatter LA Ellis-Davies G and Rios E. 2012. Quantification of the CICR Response to Artificial Ca Sparks in Striated Muscle. Biophysical Journal 102(3) pp. 311a.
13. Shkryl VM, Blatter LA, Ríos E. 2011. 4-D Scanning of Calcium Sparks in Cardiomyocytes Reveals their In-Focus Amplitude. Biophysical Journal 100(3) pp. 558a - 559a.
14. Figueroa L, Shkryl V, Zhou J, Momotake A, Ellis-Davies G, Blatter LA, Brum G, Rios E. 2011. Different Capabilities for CICR of Skeletal Muscle of Amphibians and Mammals, Demonstrated through the Response to Artificial Ca Sparks. Biophysical Journal 100(3) pp. 353a.
15. Shkryl VM, Maxwell JT, Blatter LA. 2011. Spatially Complex Diffraction-Limited Photolysis of Caged Calcium and IP3 Combined with High-Speed Confocal Imaging. Biophysical Journal 100(3) pp. 558a.
16. Figueroa L, Shkryl V, Zhou J, Momotake A, Ellis-Davies G, Blatter LA, Brum G, Rios E. 2011. Different Capabilities for CICR of Skeletal Muscle of Amphibians and Mammals, Demonstrated through the Response to Artificial Ca Sparks. Biophysical Journal 100(3) pp. 353a.
17. Shkryl VM, Littwitz C, Domeier TL, Blatter LA. 2010. Refractoriness of Ryanodine Receptors During Calcium Alternans in Rabbit Atrial Myocytes. Biophysical Journal 98(3, Supplement 1), 103a.
18. Figueroa L, Shkryl V, Zhou J, Momotake A, Ellis-Davies G, Blatter LA, Rios E. 2010. CICR and Calcium-Dependent Inactivation, Quantified Through the Response to Artificial Ca Sparks in Single Muscle Cells. Biophysical Journal 98(3, Supplement 1), 294a.
19. Figueroa L, Zhou J, Shkryl V, Blatter LA, Momotake A, Ellis-Davies G, Rios E. 2010. Flux in Artificial Ca Sparks Generated by 2-Photon Release from a Novel Cage Confocally Imaged at Microsecond Resolution. Biophysical Journal 98(3, Supplement 1), 294a.
20. Shkryl VM & Blatter LA. 2009. New Insight Into Cardiomyocyte Ca Signaling Obtained By Fast Confocal Imaging. Biophysical Journal 96(3), 277a-278a.

21. Shkryl VM & Blatter LA. 2008. Spatial properties of Ca sparks and Ca transients in atrial and ventricular myocytes recorded with high-speed 2-dimensional confocal microscopy. *Biophysical Journal*, 94(1), 300a.
22. Shkryl VM, Zima AV, Blatter LA. 2007. Mechanisms of mitochondrial Ca extrusion in intact atrial myocytes. *Biophysical Journal*, 92(1), 137a.
23. Shkryl VM & Shirokova N. 2006. Local mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients in skeletal muscle in the presence of EGTA and BAPTA. *Biophysical Journal*, 90(1), 21a.
24. Shkryl VM & Shirokova N. 2006. ROS scavengers inhibit stress-induced Ca<sup>2+</sup> sparks in skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 90(1), 20a.
25. Shkryl VM & Shirokova N. 2005. Mitochondrial redox state and Ca<sup>2+</sup> sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *Biophysical Journal* 88(1), 86a.
26. Shkryl VM, Isaeva EV & Shirokova N. 2005. Transfer of Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in permeabilized mammalian skeletal muscle. *Biophysical Journal* 88(1), 440a.
27. Isaeva EV, Shkryl VM & Shirokova N. 2004. Energized mitochondria delay the onset of Ca<sup>2+</sup> sparks in permeabilized mammalian muscle fibers. *Biophysical Journal* 86 (1), 579A.

**ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ**

- АТФ – аденозинтрифосфорна кислота  
 AR – коефіцієнт альтернацій  
 ВАРТА – 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic кислота  
 $Ca^{2+}$  – іони кальцію  
 $[Ca^{2+}]$  – внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію  
 $[Ca^{2+}]_m$  – концентрації кальцію в мітохондрії  
 $[Ca^{2+}]_{SR}$  – концентрації кальцію в саркоплазматичний ретикулум  
 CICR – кальцій-індуковане вивільнення кальцію  
 CP – саркоплазматичний ретикулум  
 CRU – окрема одиниця вивільнення  $Ca^{2+}$   
 DHPRs – дигідропіриядинові рецептори  
 DCF – флуоресцентний барвник CM-H2DCFDA  
 ECC – процес спряження збудження в скорочення  
 EDL – довгий м'яз-розгинач пальців  
 EP – ендоплазматичний ретикулум  
 EFS – стимуляція електричним полем  
 EGTA – ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic кислота  
 $F_{340}$  – флуоресценція або інтенсивність при 340 нм.  
 $F_{380}$  – флуоресценція або інтенсивність при 380 нм.  
 FDB – м'яз підошовної частини стопи  
 FWHM – повна ширина на половині максимуму  
 I<sub>Ca</sub> – трансмембранний струм через кальцієві канали  
 IP<sub>3</sub>Rs – інозитол-3-фосфатних рецепторів  
 K<sub>d</sub> – константа дисоціації  
 МДД – м'язова дистрофія Дюшена  
 NAD(P)H – Нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат  
 NADH – нікотинамідаденіндинуклеотид  
 NMDA – каналів іонотропних рецепторів глутамату  
 NDBF-EGTA – нітродибензофуран-EGTA  
 NOXs –оксидаза NAD(P)H  
 NP-EGTA - нітрофеніл EGTA  
 ПД – потенціал дії  
 PICR – вивільнення  $Ca^{2+}$ , індуковане фотолізом  
 ROS – активні форми кисню  
 RyRs – ріанодинові рецептори  
 SERCA – саркоплазматичний/ендоплазматичний ретикулума  $Ca^{2+}$ -АТФаза  
 SLICs – штучне локалізоване підвищення концентрації  $[Ca^{2+}]$   
 SOD – супероксиддисмутази  
 Soleus – камбалоподібний м'яз  
 Т-трубочка – поперечна трубочка  
 4-CMC – 4-Chloromethcathinone