

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

СУХАНОВА ХРИСТИНА ЮРІЇВНА



УДК 577.352.5+591.463.6:599.323.41

**МЕХАНІЗМИ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ В АРТЕРІАЛЬНИХ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ ПРИ АКТИВАЦІЇ ІОНОТРОПНІХ
ПУРИНОРЕЦЕПТОРІВ**

03.00.02 – Біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії молекулярної фармакології та біофізики клітинної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук

Гордієнко Дмитро Валерійович,

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
провідний науковий співробітник, завідувач лабораторією
молекулярної фармакології та біофізики клітинної
сигналізації

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Жолос Олександр Вікторович,

завідувач кафедри біофізики,

ННЦ «Інститут біології»,

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

кандидат біологічних наук

Кізуб Ігор Володимирович,

старший науковий співробітник відділу експериментальної терапії,

Інститут фармакології і токсикології НАМН

Захист відбудеться «7» червня 2016 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 252024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 252024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті Інституту www.biph.kiev.ua.

Автореферат розісланий «28» квітня 2016 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

Загальна характеристика роботи

Актуальність роботи. Контроль загальної периферичної судинної резистивності, кровотоку і скорочення дрібних артерій опосередковується симпатичною нервовою системою через нейротрансмітери, які вивільнюються з нервових закінчень та активують постсинаптичні рецептори на плазматичній мембрані (ПМ) клітин гладеньких м'язів [Burnstock et. al., 1994; Kreulen et. al., 2003; Zang et. al., 2006; Ralevic et. al., 2015]. Один з основних збуджуючих нейротрансмітерів – АТФ, що вивільнюється з симпатичних нервових закінчень, діє на артеріальні міоцити через активацію P2X пуринорецепторів [Benham et. al., 1989; Burnstock et. al., 2007; Ralevic and Dunn et. al., 2015]. В серцево-судинній системі P2X рецептори експресуються переважно на гладеньком'язових клітинах (ГМК) [Khakh et. al., 2001; Zang et. al., 2006; Burnstock G. і Ralevic V., 2014].

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію $[Ca^{2+}]_i$, викликане активацією P2X рецепторів, є результатом комбінованого внеску декількох пов'язаних процесів: входу Ca^{2+} через плазматичну мембрану безпосередньо через P2X рецептори, входу Ca^{2+} через потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу (L-VGCCs), які активуються P2X-рецептор-опосередкованою деполяризацією мембрани, і вивільненням Ca^{2+} із внутрішньоклітинних кальцієвих депо за механізмом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR) [Fabiato et. al., 1975; Dormanns et. al., 2015], залучаючи Ca^{2+} чутливі кальцієві канали саркоплазматичного ретикулу (CP) ГМК. Проте, залучення CICR механізму в ГМК викликає багато дискусій [Laporte et. al., 2004; Zang et. al., 2006; Fameli et. al., 2015]. Дійсно, відносний внесок вивільнення Ca^{2+} із CP у внутрішньоклітинну $[Ca^{2+}]_i$ мобілізацію варіює в різних типах ГМК, і часто залежить від концентрації діючої речовини та засобу стимулювання. Хоча вивільнення Ca^{2+} із CP, викликане входом Ca^{2+} в клітину через VGCCs, було показано методом фіксації потенціалу в експериментах, виконаних на різних типах вісцеральних та судинних ГМК [Kamishima et. al., 1997; Kohda et. al., 1997; Bolton et. al., 1998; Shmigol et. al., 1998; Coussin et. al., 2000], існує ряд досліджень [наприклад Bradley et. al., 2002, 2004], які демонструють, що повне спустошення CP від Ca^{2+} не зменшує $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнт, викликаний ступінчастою деполяризацією клітинної мембрани. Останнє означає, що CICR не залучається у цей механізм. Альтернативне пояснення, надане Бредлі та ін. [Bradley et. al., 2002], показує, що CP і сарколема можуть утворювати пасивний фізичний бар'єр для входу Ca^{2+} ("Ca²⁺ trap"), який зазвичай обмежує підвищення $[Ca^{2+}]_i$, викликане деполяризацією. Речовини, які сприяють вивільненню Ca^{2+} через інозитолтрифосфатні (IP₃Rs) і р'янодинові (RyRs) рецептори CP полегшують витік Ca^{2+} із CP, зменшують вплив "Ca²⁺ trap", і можуть, таким чином, збільшити амплітуду $[Ca^{2+}]_i$ транз'єнту, що призводить до входу Ca^{2+} через VGCCs навіть коли CP містить мало Ca^{2+} або CP спустошений [Bradley et. al., 2002].

Іншим важливим аспектом Ca^{2+} сигналізації в ГМК є різниця у здатності різних механізмів входу Ca^{2+} викликати вивільнення Ca^{2+} із CP. Ця варіабельність може виникнути як результат просторової організації та молекулярного складу внутрішньоклітинних субодиниць RyRs [Gordienko et. al., 2004; Moore et. al., 2004; Morimura et. al., 2006; Hotta et. al., 2007; Gordienko et. al., 2008]. Візуалізація

кальцієвих мікродоменів в міоцитах змінила наше розуміння Ca^{2+} сигналізації і надала прямі докази для підтвердження концепції, що замкнута система органел має специфічні біохімічні функції ("концепція локального контролю"); [Berridge et. al., 1997]). Нещодавно ця концепція еволюціонувала у гіпотезу, що ділянки клітини, які знаходяться між органелами, в наслідок своєї наноструктури є також функціонально спеціалізованими регіонами, що забезпечують важливі клітинні процеси [Poburko et. al., 2004, 2008].

Проте, незважаючи на значну кількість експериментальних даних, на сьогодні залишається ще багато питань щодо механізмів кальцієвої сигнальної системи міоцитів гладеньких м'язів, і зокрема архітектури $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відповідей на стимуляцію P2X рецепторів судинних ГМК.

Таким чином, детальна характеристика механізмів підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в артеріальних міоцитах у відповідь на активацію P2X пуринорецепторів є актуальною проблемою, вивчення якої є основою ідентифікації потенціальних молекулярних мішеней терапії артеріальної гіпертензії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась згідно з тематичними планами науково-дослідної роботи лабораторії молекулярної фармакології та біофізики клітинної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за темами «Механізми збуджувальної та гальмівної дії нейромедіаторів на гладенькі м'язи в нормі та патології» (2008-2010, (номер державної реєстрації 0107U005324), «Фармакологічна модуляція механізмів збудження-гальмування гладеньких м'язів у нормі та патології» (2011-2013, номер державної реєстрації 0110U004758), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2016, номер державної реєстрації 0113U007273).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягала у з'ясуванні мембранних та внутрішньоклітинних механізмів змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) при активації P2X рецепторів артеріальних ГМК.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі **задачі**:

- Провести аналіз відносного внеску механізмів входу Ca^{2+} в клітину та його вивільнення з внутрішньоклітинних депо у підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) у відповідь на селективну стимуляцію P2X рецепторів свіжоізолюваних артеріальних міоцитів.
- Дослідити внесок L-VGCCs плазматичної мембрани, IP_3Rs і RyRs рецепторів CP у процес мобілізації Ca^{2+} при активації P2X рецепторів свіжоізолюваних артеріальних міоцитів.
- Дослідити просторову організацію CP та просторову локалізацію IP_3Rs і RyRs поодиноких ГМК мезентеріальної артерії за допомогою конфокальної мікроскопії.
- Дослідити відносний внесок механізмів мобілізації $[\text{Ca}^{2+}]_i$, які залучаються до активації фазних скорочень мезентеріальної артерії морської свинки у відповідь на стимуляцію P2X пуринорецепторів.

Об'єкт дослідження:

– Кальцієві транзйєнти, що викликаються активацією P2X рецепторів ізолюваних артеріальних міоцитів;

– Скоротливі реакції кільцевих сегментів мезентеріальної артерії на активацію P2X рецепторів.

Предмет дослідження – динаміка змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) артеріальних гладеньком'язових міоцитів.

Методи дослідження – метод конфокальної мікроскопії, метод тензометрії, метод фіксації потенціалу “patch-clamp”, методи статистичного аналізу отриманих даних.

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі за допомогою метода конфокальної мікроскопії та інгібіторів L-VGCCs, сарко/ендолазматичної кальцієвої АТФ-ази (SERCA), IP_3Rs , $RyRs$, фосфоліпази C були детально досліджені зміни $[Ca^{2+}]_i$ та участь вищезазначених компонентів у збільшенні $[Ca^{2+}]_i$ при активації P2X рецепторів селективним агоністом $\alpha\beta$ -меАТФ. Вперше продемонстровано, що активація P2X рецепторів ГМК мезентеріальних артерій викликає паралельне включення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які розрізняються за своїм внеском у створенні загальної внутрішньоклітинної $[Ca^{2+}]_i$ відповіді: вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори. Вперше показано, що в контрольних умовах, коли в пуринергічній сигналізації артеріальних міоцитів задіяні і P2X рецептори, і L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за участю і IP_3Rs , і $RyRs$. Було відмічено, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} переважно пов'язане з активацією L-VGCCs. Виявлено зміни амплітуди фазного ізометричного скорочення кільцевих де-ендотелізованих сегментів мезентеріальної артерії морської свинки, які підтвердили, що Ca^{2+} із CP вивільнюється через обидва типи рецепторів – IP_3Rs і $RyRs$, – та бере участь у генерації фазного скорочення, викликаного пуринергічною стимуляцією. Імунофлуоресцентне забарвлення IP_3Rs і $RyRs$ виявило, що IP_3Rs експресовані переважно у субплазмалемальному CP, в той час як $RyRs$ розміщені на центральних та навколоядерних елементах CP.

Таким чином, отримані результати істотно доповнюють сучасні уявлення щодо механізмів кальцієвої сигналізації, які виникають при активації P2X рецепторів гладеньких м'язів судин.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Ця робота належить до фундаментальних досліджень, тому має важливе практичне значення. З одного боку, отримані результати розширюють та поглиблюють розуміння клітинних і молекулярних механізмів регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів кровоносних судин та можуть бути включені в лекційні курси біофізики, фізіології та патофізіології. З іншого боку, отримані результати окреслюють потенційні фармакологічні мішені для терапії захворювань серцево-судинної системи та інших захворювань, пов'язаних з порушеннями регуляції кровообігу.

Особистий внесок здобувача. Всі експерименти, описані в дисертаційній роботі, такі як виділення функціонально повноцінних ГМК та сегментів судин, обробка експериментального матеріалу були виконані особисто автором. Постановка задачі досліджень, обговорення та узагальнення результатів, формулювання висновків проводилась під керівництвом к.б.н., п.н.с. Д.В. Гордієнка, дослідження фазних

скорочень кільцевих сегментів мезентеріальної артерії проводились спільно з к.б.н., с.н.с. В.О. Бурим.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на наукових міжнародних і національних конференціях та симпозіумах, зокрема, на Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, Україна, 2006), International Symposium «Calcium Channels and Transporters» (Manchester, Great Britain, 2007), Society's Vascular & Smooth Muscle Physiology Themed Meeting (King's College London, Great Britain, 2008), International Conference «Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling» (Kyiv, Ukraine, 2009), III Съезде физиологов СНГ, «Физиология и здоровье человека» (Ялта, Украина, 2011), Main Meeting of Physiology Society «Physiology 2012» (Edinburgh, Great Britain, 2012), XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, Україна, 2014), а також на семінарах сектора молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 праць: 6 журнальних статей, з них 2 статі у наукових фахових виданнях України і 4 статі у наукових періодичних закордонних виданнях, та 7 тез доповідей на наукових міжнародних та національних конференціях та симпозіумах.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження, їх обговорення, висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 140 сторінках машинописного тексту і проілюстрована 34 рисунками. Бібліографічний список включає 235 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано необхідність та актуальність досліджень механізмів кальцієвої сигналізації в артеріальних ГМК при активації іонотропних пуринорецепторів. Сформульовані мета і завдання дослідження, наведені відомості щодо наукової новизни, теоретичного та практичного значення роботи, апробації отриманих результатів.

Розділ 1 «Огляд літератури» присвячений обговоренню такого феномену, як кальцієва сигналізація в ГМК, висвітленню сучасних відомостей про функцію P2X рецепторів і потенціалкерованих кальцієвих каналів плазматичної мембрани, та інозитолтрифосфатних і ріанодинових рецепторів саркоплазматичного ретикулума, та їх ролі в кальцієвій сигналізації при активації P2X рецепторів.

В **розділі 2 «Матеріали і методи»** описані методичні підходи, які були використані під час роботи. Усі експерименти із тваринами проводились у відповідності до міжнародних етичних стандартів та згідно з постановою Комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, Україна).

Досліди було проведено на ізольованих кільцевих сегментах та поодиноких ГМК мезентеріальної артерії морської свинки (250-350 г). Частина експериментів була виконана на резистивних артеріях нирок щурів (150-200 г).

Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів. Кільцеві сегменти мезентеріальної артерії 3-го порядку довжиною близько 2 мм та діаметром до 0,5 мм розтягували з силою до 5 мН в проточній термостатованій камері об'ємом 50 мкл при температурі 36°C. Ендотелій кожного кільця руйнували механічно. Скоротливі відповіді реєстрували в режимі близькому до ізометричного за допомогою тензометричного датчика, до якого кріпили лігатуру кільцевого сегменту мезентеріальної артерії. Сигнал з тензометричного датчика оцифровувався за допомогою аналого-цифрового перетворювача L761 («L-Card», Росія) і в цифровій формі зберігався для подальшого аналізу.

Виділення ізольованих артеріальних міоцитів. Поодинокі ГМК отримували за допомогою методу ферментативно-механічної ізоляції. Виділені артерії інкубували в безкальцієвому розчині Кребса з додаванням (мг/мл): колагенази (тип 1A) 1.0, протеази (тип X) 0.5, соєвого інгібітору трипсину (тип II-S) 0.5, та бичачого сироваткового альбуміну (БСА) 1.0, і витримували при 37°C протягом 20-25 хвилин. Далі сегменти артерій відмивали від ферментів при кімнатній температурі (20-25°C). Ізольовані міоцити отримували піпетуванням і переносили в камери, де вони зберігалися при 4°C у нормальному розчині Кребса. Експерименти проводилися при кімнатній температурі протягом 8 годин після ізоляції клітин.

Візуалізація змін $[Ca^{2+}]_i$. Візуалізація змін $[Ca^{2+}]_i$ здійснювалася за допомогою високоафінного ($k_d = 390$ нМ) Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3, АМ (максимуми збудження/емісії = 506 нм/526 нм), який був розчинений в DMSO, 0.125 % (v/v) з додаванням Pluronic F-127, 0.025 % (w/v) з доведенням нормальним розчином Кребса до кінцевої концентрації 5мкМ. Суспензію клітин додавали у експериментальні камери із скляним дном. Через 30 хвилин клітини, що прикріпились до скла, завантажували барвником протягом 20 хвилин і відмивали 40 хвилин у розчині Кребса для повної де-естерифікації при кімнатній температурі. Щоб запобігти скороченню клітин за 10 хвилин до вимірів у камеру додавали вортманін в кінцевій концентрації 40 мкМ. Міоцити стимулювали 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ або 3мМ кофеїну через систему локальної подачі агоністів.

Візуалізація внутрішньоклітинних кальцієвих запасників (BK3) та CP. Візуалізація просторової організації BK3 здійснювалася за допомогою низькоафінного ($k_d=42$ мкМ) Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3FF АМ (максимуми абсорбції/емісії = 462 нм/ 526 нм). ГМК завантажували 5 мкМ Fluo-3FF АМ протягом 30 хвилин та відмивали протягом 60 хвилин при 20-25°C. Візуалізація просторової організації CP здійснювалася за допомогою Brefeldin A BODIPY (максимуми абсорбції/емісії = 558 нм/ 568 нм). ГМК завантажували 2 мкМ Brefeldin A BODIPY протягом 20 хвилин та відмивали протягом 90 хвилин при 20-25°C.

Імунодетекція RyRs і IP_3Rs . ГМК фіксували шляхом інкубації у фізіологічному розчині, який містив 4% параформальдегіду, протягом 5-10 хвилин при 4°C. Імунозабарвлення проводили за непрямим флуоресцентним методом. Неспецифічне зв'язування блокувалося шляхом інкубації ГМК у розчині з 3% БСА та 0.3% Triton X-100 протягом 60 хвилин при 20-25°C. Первинні та вторинні антитіла розбавляли у розчині, який містив 3% БСА, 0.3 % Triton X-100, 20 одиниць/мл пеніциліну та 20 мкг/мл стрептоміцину. Щоб візуалізувати локалізацію

IP₃Rs або RyRs, ГМК інкубували в присутності первинних анти- IP₃Rs типу 1 та анти- RyRs антитіл (1:300 та 1:480, відповідно) протягом 16 годин при 4°C. Після чотирьох 10-хвилинних відмивань у фізіологічному розчині, який містив 3% БСА, специфічне зв'язування первинних антитіл виявлялося шляхом 2-годинної інкубації ГМК при 20-25°C з Alexa Fluor 633 кон'югованою з курячим анти-кролячим IgG (1:300) та з Alexa Fluor 488 кон'югованою з козячим анти-мишиним IgG (1:300). У контрольних експериментах первинні антитіла не додавалися у розчин, в якому клітини інкубувалися протягом перших 16 годин.

Конфокальні дослідження. Експериментальну камеру (500 мкл) з суспензією клітин розміщували на предметному столику інвертованого мікроскопа Axiovert 200M з лазерним сканером LSM 5 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Конфокальні зображення отримували за допомогою об'єктиву Zeiss plan-Apochromat 40×1,4 Ч.А. (масляна імерсія). Для оптимізації якості флуоресцентного сигналу у процесі сканування [Ca²⁺]_i пінхол було встановлено так, щоб забезпечити оптичний зріз менш ніж 1.2 мкм. Візуалізація змін [Ca²⁺]_i на субклітинному рівні здійснювалась за допомогою послідовного двохвимірної сканування при фіксованому фокусуванні, що дозволяло отримувати послідовність 1000 двовимірних (x-y) зображень з частотою 13-32 Гц. Щоб уникнути перехресного засвічування/флуоресценції у експериментах з подвійним імунозabarвленням та забарвленням СР, ми використовували флуоресцентні барвники з добре відособленими спектральними характеристиками: Alexa Fluor 488 (максимуми абсорбції/емісії = 495 нм / 519 нм), Alexa Fluor 633 (максимуми абсорбції/емісії = 632 нм / 647 нм) та Brefeldin A BODIPY 558/568 (максимуми абсорбції/емісії = 558 нм / 568 нм). Потрійне збудження флуоресценції у мултітрековій конфігурації LSM 510 META (послідовна реєстрація зображень на 3 оптичних каналах) здійснювалось за допомогою 488 нм лінії аргонного лазера та 543 нм та 633 нм лініях двох гелій-неонових лазерів, відповідно. Щоб керувати конфокальним мікроскопом, ми використовували програму LSM5 Pascal (Zeiss, Oberkochen, Germany), яка була встановлена на комп'ютері, сполученому з мікроскопом через SCSI інтерфейс..

Електрофізіологічні дослідження. Мембранні струми реєстрували за допомогою модифікації “perforated patch” методу “patch-clamp” з використанням антибіотика амфотеріцина Б (200 мкг/мл) та за допомогою підсилювача Multiclamp 700A (Molecular Devices Co.). Опір піпеток, заповнених внутрішнім розчином, складав 1-3 МОм. Для утворення гігаомного контакту, мікропіпетку підводили до поверхні клітини та створювали незначний від'ємний тиск. Внаслідок дифузії відбувалась заміна моновалентного іонного складу внутрішньоклітинного середовища на внутрішньопіпетковий розчин. Для генерації імпульсів напруги і оцифровки трансмембранних струмів використовували АЦП DigiData 1322A під управлінням програмного забезпечення pClamp 8,2 (Molecular Devices Co., США). Потенціалзалежні струми викликали 500 мс деполяризацією до 0 мВ від підтримуваного потенціалу -80 мВ. Щоби збільшити низькоамплітудні струми через L-VGCCs, в цих експериментах в якості носія заряду використовували Ba²⁺ (5 мМ) замість Ca²⁺.

Подача агоністів. В дослідях з тензометричними вимірюваннями, за виключенням агоністів P2X рецепторів – АТФ і $\alpha\beta$ -меАТФ, – всі реактиви розводили в перфузуючому розчині Кребса в необхідній концентрації. Аплікація агоністу здійснювалась шляхом ін'єкції 200 мкл в перфузуючий розчин в робочу камеру. Концентрація кожного з агоністів у розчині була підібрана так, щоб викликати субмаксимальне фазне скорочення і становила 1 мМ для АТФ або 10 мкМ для $\alpha\beta$ -меАТФ. Аплікації агоністів проводили через 25 хвилин.

В конфокальних дослідях використовували розслаблені видовжені клітини з гладенькою поверхнею та стимулювали за допомогою Picospritzer III (Intracel Ltd., Велика Британія) короткими аплікаціями агоністу (≤ 300 мс), який під тиском подавали через скляну мікропіпетку, розташовану на відстані 100–200 мкм від поверхні клітини. Після кожної аплікації агоніста камеру промивали нормальним розчином Кребса та витримували 10 хвилин між аплікаціями. Відповідні до протоколу блокатори додавали у камеру для досягнення потрібної концентрації.

Розчини. В дослідях з тензометричними вимірюваннями використовували розчин Кребса наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 120.0; KCl – 5.9; NaHCO₃ – 15.5; NaH₂PO₄ – 1.2; MgCl₂ – 1.2; CaCl₂ – 2.5; глюкоза – 11.5.

Для ізольованих клітин використовували розчин Кребса наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 120.0; KCl – 6.0; CaCl₂ – 2.5; MgCl₂ – 1.2; глюкоза – 12.0; HEPES – 10.0; рН доводили до 7,4 за допомогою NaOH. Безкальцієвий розчин готували на основі розчину Кребса для ізольованих клітин без додавання CaCl₂.

Для електофізіологічних вимірювань – позаклітинний розчин наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 135.0, CsCl – 5.8, BaCl₂ – 5.0, MgCl₂ – 1.2, D-глюкози – 10.0, HEPES – 10; рН доводили до 7.4 за допомогою CsOH. Внутрішній розчин піпеток містив (у мМ/л): CsCl 126.0; NaCl 5.0; HEPES 10.0; рН доводили до 7.4 за допомогою CsOH.

Аналіз результатів. Комп'ютерну обробку зображень здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою програми Widget, написаною на програмній мові IDL (The IDL Virtual Mashine, Distribution Platform for IDL Application). Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції в зображеннях, отриманих до аплікації $\alpha\beta$ -меАТФ, і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0). Кінцеві малюнки отримували за допомогою програм MicroCal Origin 7.5 (MicroCal Software, Inc., USA) та CorelDraw 7.0 (Corel Corporation, Canada).

Результати статистичної обробки експериментальних даних представлені як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення середнього арифметичного, із зазначенням кількості експериментальних точок (n) – кількість досліджених клітин або гладеньком'язових кільцевих сегментів. Порівняльний аналіз груп даних виконувався за допомогою *t*-тесту Стюдента для парних або непарних проб, в залежності від протоколу дослідження, з порогом статистичної достовірності 0.05. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

В розділі 3 «Результати досліджень» описані всі результати нашого дослідження, які були отримані при виконанні поставлених задач, зокрема аналіз механізмів входу Ca²⁺ в клітину та вивільнення Ca²⁺ із депо та особливості участі рецепторів CP при активації P2X рецепторів.

Активация P2X рецепторів викликає підмембранний $[Ca^{2+}]_i$ стрибок

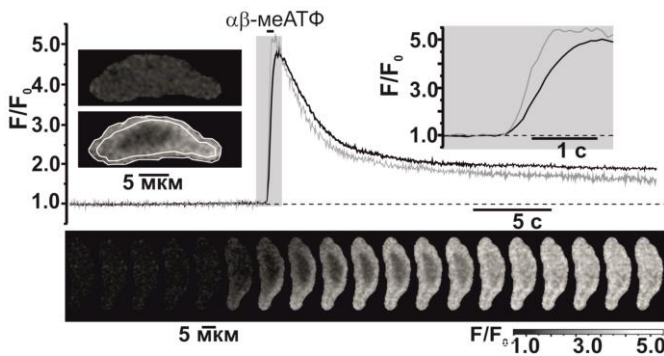


Рис.1. $\alpha\beta$ -меАТФ-індукована $[Ca^{2+}]_i$ хвиля зареєстрована при двовимірному (x-y) скануванні артеріальних ГМК при активації P2X рецепторів. Вставка справа: різниця в кінетиці відповідей на периферії та в центрі клітини.

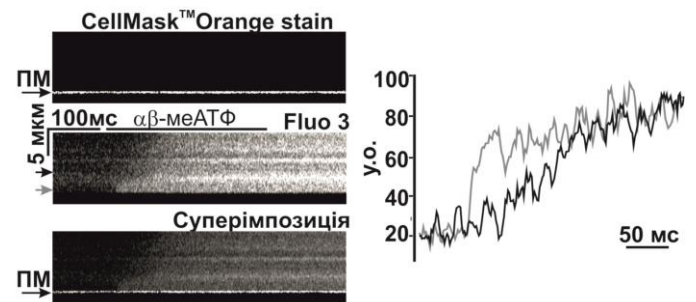


Рис.2. $\alpha\beta$ -меАТФ-індукована $[Ca^{2+}]_i$ хвиля зареєстрована при лінійному скануванні: Конфокальні зображення флуоресценції CellMask™ Orange (вгорі) і Fluo-3 (всередні) та їх накладення (знизу). Кінетика відповідей у місцях, відмічених чорною і сірою стрілками, показана на графіку (праворуч) у відповідному кольорі.

Високошвидкісне двовимірне (x-y) (рис.1) та лінійне (рис.2) конфокальне сканування виявили, що кожна аплікація 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ супроводжувалась швидким підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ у підмембранних регіонах клітини – підмембранним $[Ca^{2+}]_i$ стрибком: sub-plasmalemmal Ca^{2+} upstroke (SPCU). Тому в подальших дослідженнях ми аналізували динаміку зміни $[Ca^{2+}]_i$ в цих підмембранних регіонах ініціації, які відображено на рис. 1, вставка. Дослідження дії антагоністів вимагає

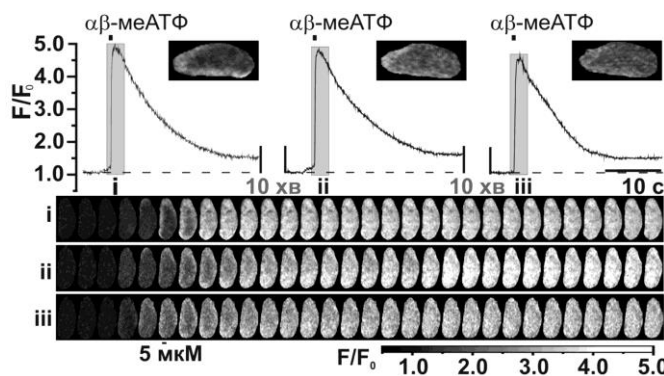


Рис.3. Відтворюваність відповідей при повторній стимуляції P2X рецепторів міоцитів мезентеріальної артерії морської свинки.

послідовних аплікацій $\alpha\beta$ -меАТФ і високої відтворюваності $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованого $[Ca^{2+}]_i$ тринзента у контрольних умовах. Відтворюваність відповіді на повторні аплікації 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ через 10-хвилинні інтервали (для забезпечення перезавантаження Ca^{2+} депо і усунення десенситизації P2X рецепторів) вимірювали як відношення амплітуди SPCU наступної відповіді до попередньої. При такій стимуляції відтворюваність складала $81 \pm 1.4\%$ ($n=52$) (рис.3).

У дисертаційній роботі на рисунках графіки показують часовий хід нормалізованої інтенсивності флуоресценції Fluo-3 (F/F_0), усередненої у суб-плазмолемальних регіонах ініціації (SPCU). Галереї під графіками демонструють конфокальні зображення, послідовно зібрані за період, відмічений на графіках сірим фоном (i), (ii) та (iii) відповідно. Інтенсивність флуоресценції нормалізувалася до середньої інтенсивності флуоресценції у зображеннях, отриманих до аплікації, $\alpha\beta$ -меАТФ і кодувалася у відтінках сірого (шкала F/F_0).

Визначення внеску P2X рецепторів і VGCCs у загальний $[Ca^{2+}]_i$ сигнал при активації P2X рецепторів

Оцінка внеску механізмів трансмембранного входу Ca^{2+} у загальну Ca^{2+} мобілізацію базувалася на блокуванні входу Ca^{2+} через L-VGCCs та/або на усуненні викиду Ca^{2+} із СР шляхом його спустошення. Для досягнення цієї мети ми використовували нікардипін (5мкМ) – блокатор L-VGCCs, та циклопіазонову кислоту (CPA, 10мкМ) – оборотний інгібітор Ca^{2+} -АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума (SERCA). У додаткових експериментах була встановлена тривалість інкубації клітин в CPA, необхідний для повного спустошення депо при відповідній концентрації інгібітора. Також було протестовано вплив CPA на вхід Ca^{2+} через L-VGCCs. Показано, що за 10 хвилин 10 мкМ CPA повністю спустошує депо і не впливає на вхід Ca^{2+} через L-VGCCs.

При блокуванні L-VGCCs за допомогою 5 мкМ нікардипіну, амплітуда ($\Delta F/F_0$) $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованого SPCU зменшувалася на $64 \pm 2\%$ ($n=22$) (рис.4,А). Нікардипін, нечутлива фракція відповіді, відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори плюс викликане цим входом вивільнення Ca^{2+} із СР і складає $\sim 36\%$ від загальної Ca^{2+} відповіді. Подальше спустошення внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо за 10 хвилин інкубації клітин в 10 мкМ CPA достовірно ($p < 0.001$) зменшувало амплітуду $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованого сигналу ($\Delta F/F_0$). Амплітуда залишкового сигналу, що відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, складала $11 \pm 2\%$ ($n=10$).

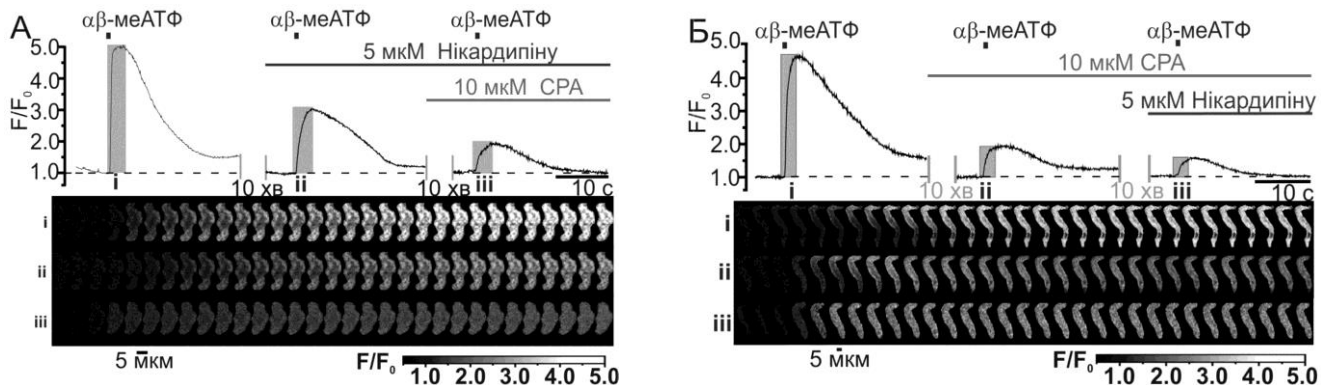


Рис. 4. Вплив блокування L-VGCCs з подальшим спустошенням Ca^{2+} депо (А) і спустошення Ca^{2+} депо з подальшим блокуванням L-VGCCs (Б) на $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковані SPCU.

Повне спустошення депо зменшувало амплітуду Ca^{2+} сигналу на $81 \pm 0.5\%$ (рис.4,Б). Залишкова відповідь у цих умовах відображає сумарний трансмембранний вхід Ca^{2+} в ГМК через P2X рецептори та L-VGCCs і складає $19 \pm 0.8\%$ ($n=24$) від загальної Ca^{2+} відповіді. Для оцінки Ca^{2+} сигналу, що виникає тільки за рахунок входу Ca^{2+} через P2X рецептори, ми усували VGCC – опосередкований вхід Ca^{2+} за допомогою 5 мкМ нікардипіну в ГМК з спустошеним Ca^{2+} депо. Залишкова відповідь за цих умов була значно меншою ($P < 0.00001$), ніж після спустошення Ca^{2+} депо. Ця фракція, що відображає прямий вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, складала $11 \pm 1.4\%$ ($n=14$) від загальної Ca^{2+} відповіді. Таким чином, прямий внесок входу Ca^{2+} через L-VGCCs у загальну відповідь ($\Delta F/F_0$) складав в середньому $8 \pm 0.8\%$ ($n=24$). Ми дійшли до висновку, що активація P2X рецепторів запускає два механізми входу Ca^{2+} в клітину, які забезпечують співмірний внесок до загального входу Ca^{2+} в клітину: P2X – опосередкований ($\sim 11\%$) і VGCC – опосередкований ($\sim 8\%$).

Порівняння підсилення P2X- та VGCC-опосередкованих Ca^{2+} сигналів

Аналіз отриманих результатів дає можливість оцінити і порівняти підсилення за рахунок CICR кальцієвих сигналів утворених входом Ca^{2+} через P2X рецептори і L-VGCCs (рис. 5). Проаналізовано амплітуду ($\Delta F/F_0$) наступних фракцій $\alpha\beta$ -меАТФ

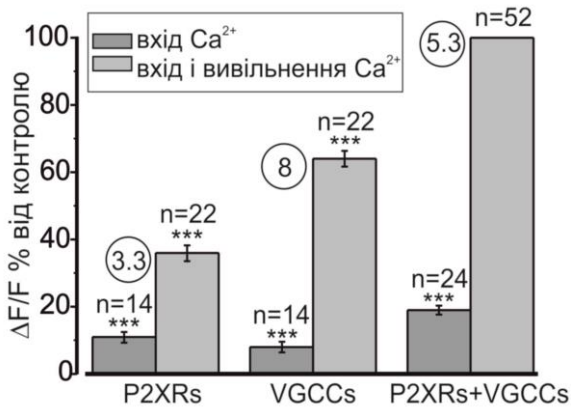


Рис.5. Порівняння підсилення Ca^{2+} сигналів після входу іонів Ca^{2+} через P2X рецептори (P2XRs) і через VGCCs при активації P2XRs з урахуванням відповідних компонентів Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR). *** $p < 0.001$.

через L-VGCC) і (v) фракція, що зберігається після блоку L-VGCCs при спустошеному CP (відображає вхід Ca^{2+} через P2X рецептори). Коефіцієнти підсилення за рахунок CICR (обведені колом на рис.5) розраховувалися як співвідношення середніх максимальних амплітуд відповідних фракцій. Загальний $\alpha\beta$ -меАТФ-індукований Ca^{2+} сигнал ($\Delta F/F_0$) представлено на діаграмі як 100%. Відносний внесок кожної з фракцій представлено з урахуванням того, що відтворюваність відповіді в контрольних умовах була в середньому 81%, та порівняно із загальною $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованою відповіддю в контрольних умовах.

Аналіз результатів показав, що вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше (коефіцієнт 8), ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори (коефіцієнт 3.3). Отримані результати дають підставу для висновку, що при активації P2X рецепторів, окрім входу Ca^{2+} через P2X рецептори, ГМК мезентеріальної артерії залучають більш ефективний механізм мобілізації Ca^{2+} , суттєвим компонентом якого є вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, яке започатковується входом Ca^{2+} через L-VGCCs.

Внесок RyRs та IP_3Rs у вивільнення Ca^{2+} із CP після активації P2X рецепторів

Щоб проаналізувати внесок RyRs та вірогідну участь IP_3Rs у процесі вивільнення Ca^{2+} із CP після активації P2X рецепторів, були співвіднесені амплітуди $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзентів, викликаних 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ в присутності відповідного блокатора рецепторів CP із амплітудами, отриманими на тих же клітинах в контрольних умовах (рис.6). Нещодавно повідомлялося, що 2-APB, блокатор IP_3Rs , може впливати на механізми внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу, такі як інгібування катіонних каналів і SERCA [Bootman et al, 2002; Lee et al, 2003]. Тому були проведені додаткові експерименти і було показано, що 30 мкМ 2-APB не впливає на трансмембранний вхід Ca^{2+} і на перезавантаження CP в досліджуваних ГМК.

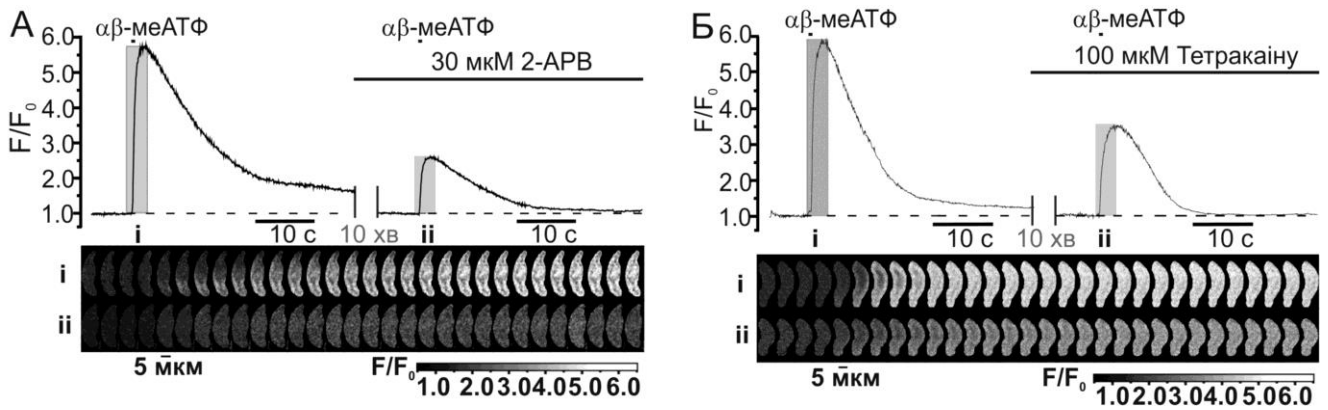


Рис. 6. Порівняння амплітуд $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей при блокуванні IP_3Rs та $RyRs$ (панелі А і Б, відповідно)

Блок IP_3Rs пригнічував за допомогою 30 мкМ 2-АРВ амплітуду Ca^{2+} сигналу значно сильніше, ніж блок $RyRs$, викликаний 100 мкМ тетракаїну (або ріанодину): амплітуда SPCU в присутності 2-АРВ (за умовами коли $RyRs$ не заблоковані) зменшувалася на $67 \pm 7\%$ ($n=16$), в той час як в присутності тетракаїну (за умовами коли IP_3Rs не заблоковані) амплітуда SPCU зменшувалася на $40 \pm 5\%$ ($n=26$) (рис.6), а при використанні ріанодину – на $41 \pm 2\%$, ($n=3$).

Для підтвердження участі IP_3Rs і $RyRs$ у процес вивільнення Ca^{2+} із СР, після активації P2X рецепторів були проведені дослідження на свіжоізолюваних артеріальних ГМК нирок щурів і отримані аналогічні дані. Блокування $RyRs$ приводить до зниження амплітуди $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованої відповіді ($\Delta F/F_0$) лише на $18 \pm 5\%$ ($n=7$). При цьому блокування IP_3Rs приводить до зменшення відповіді на $60 \pm 8\%$ ($n=10$).

Таким чином, можна зробити висновок, що активація P2X рецепторів призводить до вивільнення Ca^{2+} через обидва типи рецепторів - IP_3Rs і $RyRs$.

Функціональний зв'язок між L-VGCCs та рецепторами СР

Щоб встановити зв'язок між механізмами входу Ca^{2+} в клітину та вивільнення Ca^{2+} із депо, які запускаються при активації P2X рецепторів, ми оцінювали зміну при блокуванні VGCCs відносного внеску IP_3Rs та $RyRs$ у $\alpha\beta$ -меАТФ - індукований $[Ca^{2+}]_i$ транзйєнт (рис. 7).

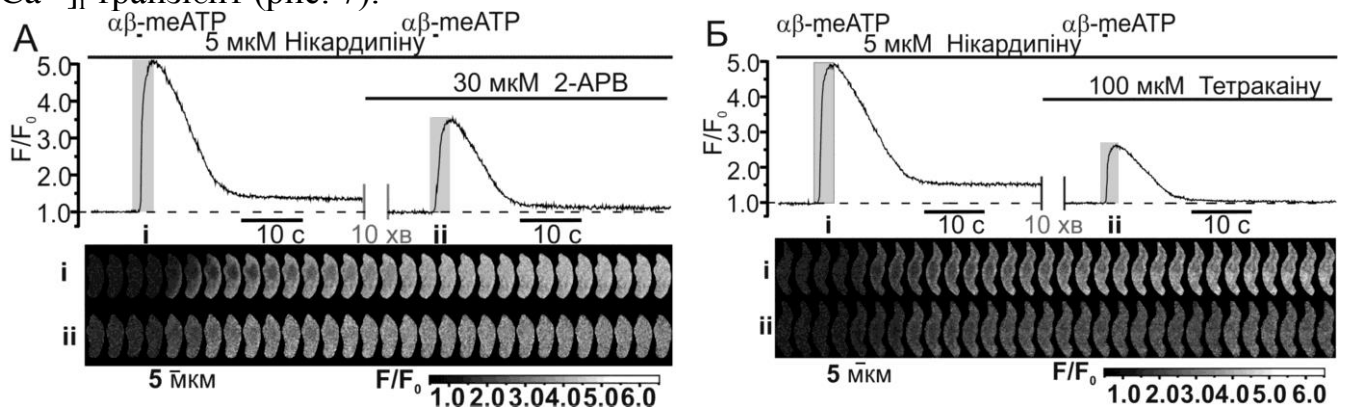


Рис. 7. Відносний внесок IP_3Rs (А) або $RyRs$ (Б) у $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану відповідь в умовах блокування VGCCs.

Як було зазначено вище, в присутності 5 мкМ нікардипіну, блокатору L-VGCCs, внутрішньоклітинний Ca^{2+} сигнал ініціювався іонами Ca^{2+} , які надходили в клітину виключно через P2X рецептори. Сумарний результат блокади рецепторів СР

в контрольних умовах та при подальшій блокаді L-VGCCs представлений на рис. 8, в порівнянні з амплітудами SPCU, які були викликані активацією P2X рецепторів за умови (1) збереження VGCC-опосередкованої компоненти (вхід Ca^{2+} через L-VGCCs та через P2X рецептори) та (2) входу Ca^{2+} , який забезпечується тільки через P2X рецептори. Інгібування L-VGCCs призвело до істотного зниження IP_3R -опосередкованого внеску в $\alpha\beta$ -меАТФ-індукований $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнт. Тетракаїн/ріанодин-нечутлива фракція (що відображає IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+}) зменшувалась після блоку L-VGCCs більш ніж в 4 рази: від $60\pm 5\%$ ($n=26$)/ $62\pm 6\%$ ($n=3$) до $16.6\pm 2\%$ ($n=7$)/ $18\pm 3\%$ ($n=3$), відповідно. У той час як 2-APB-нечутлива фракція (відображає RyR -опосередковане вивільнення Ca^{2+}) зменшувалась тільки на 10%: від $33\pm 7\%$ ($n=16$) до $22.7\pm 3\%$ ($n=9$).

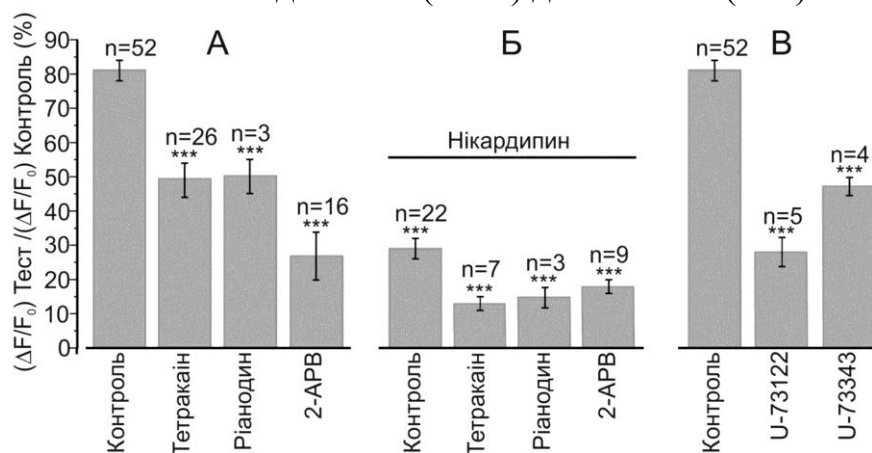


Рис.8. Діаграма дії інгібіторів L-VGCC/ IP_3Rs / RyRs /PLC на $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану відповідь. На діаграмах порівнюються амплітуди тетракаїн/ріанодин- або 2-АРВ-нечутливих фракцій $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей Fluo-3 з «Контролем» до (А) і після (Б) блокування L-VGCCs. (В) На діаграмах порівнюються амплітуди U-73122- і U-73343 – нечутливих фракцій $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей Fluo-3, з «Контролем». Відповіді «Контроль» отримані до інкубації з антагоністами вивільнення Ca^{2+} . *** $p < 0.001$

Треба відзначити, що фракція $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованої відповіді Fluo-3, яка залишається в присутності нікардипіну ($36\pm 3\%$; $n=22$), була подібна до залишкової фракції після блоку IP_3Rs за допомогою 2-АРВ ($33\pm 7\%$; $n=16$). Це свідчить про наступне: (1) хоча прямий вхід Ca^{2+} безпосередньо через VGCCs робить порівняно невеликий внесок у $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану відповідь, він значно підсилюється IP_3R -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} і (2) активація L-VGCCs не є єдиним механізмом, що пов'язує активацію P2X рецепторів із IP_3R -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} . Зважаючи на те, що активація P2X рецепторів не викликає активації фосфоліпази C (PLC), базальний рівень $[\text{IP}_3]_i$, який продукується за рахунок спонтанної активності PLC, може відігравати ключову роль в активації IP_3R -опосередкованого вивільнення Ca^{2+} , яке запускається потенціалзалежним входом Ca^{2+} в клітину. Як блокатори PLC, U-73122, так і його аналог U-73343, значно зменшували $\alpha\beta$ -меАТФ-індуковану амплітуду відповіді (2.5 мкМ U-73122 – зменшення амплітуди на $65\pm 7\%$; $n=5$; 2.5 мкМ U-73343 – зменшення амплітуди на $42\pm 5\%$; $n=4$). Ці дані свідчать, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} , викликане активацією P2X рецепторів, залежить від активності PLC. В свою чергу функціональний зв'язок між L-VGCCs та IP_3Rs свідчить на користь експресії IP_3Rs переважно у підмембранних “junctional” елементах саркоплазматичного ретикулула

(jSR), що сприяє просторовій ко-локалізації L-VGCCs плазматичної мембрани та IP_3Rs цих елементів СР.

Підмембранний СР збагачений IP_3Rs

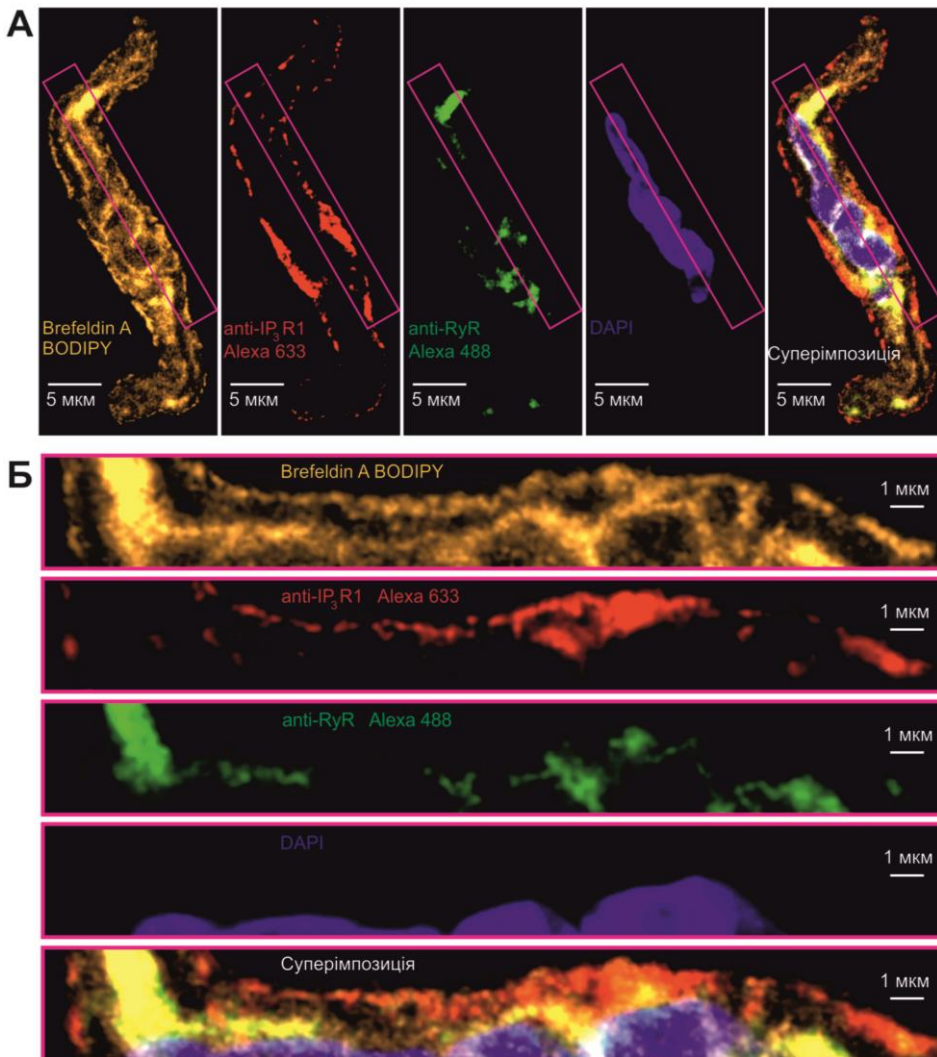


Рис. 9. Конфокальні зображення Brefeldin A BODIPY, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 488 і флуоресценції DAPI та їх суперімпозиція (А) ілюструють просторову організацію елементів СР і ядра та розподіл IP_3Rs і RyRs. Збільшені зображення виділених регіонів показано на малюнку (Б).

Скоротливі відповіді ГМ смужок мезентеріальної артерії на $\alpha\beta$ -меАТФ

Аплікація селективного агоніста P2X рецепторів, $\alpha\beta$ -меАТФ, в перфузуючий розчин призводила до швидкого фазного скорочення. На рис.10 (А, В) показані типові результати дослідів, в яких визначався внесок RyRs та IP_3Rs у вивільненні Ca^{2+} із СР після стимуляції P2X рецепторів 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ та послідовного додавання відповідного блокатору рецепторів. Повторна контрольна аплікація агоніста або преінкубаційна дія 60 мкМ 2-АРВ або 100 мкМ тетракаїну в перфузуючому розчині складала 25 хвилин. Більша частка ($61.7 \pm 9.6\%$) скоротливої відповіді виявилась чутливою до пригнічення IP_3Rs , в той час як RyRs були відповідальні за $48.2 \pm 7.8\%$ скоротливої реакції (рис.10 Б та Г). Перевищення суми двох часток рівня 100%

Імунозabarвлення RyRs і IP_3Rs типу 1 в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки, а також забарвлення СР за допомогою Brefeldin A BODIPY та ядра за допомогою DAPI виявило (рис.9), що елементи СР, що знаходяться безпосередньо під мембраною, збагачені IP_3Rs , у той час як RyRs розташовані переважно у центральних навколо ядерних елементах СР ($n=15$). Ця особливість розподілу IP_3Rs сприяє L-VGCCs - IP_3R зв'язку, який може полегшувати накопичення молекул, Ca^{2+} і IP_3 , в мікрооб'ємі цитозолу між jSR і мікродоменами плазмолемі, з якого дифузія в об'єм цитоплазми є обмеженою.

свідчить про кооперативність цих процесів: Ca^{2+} , який вивільнюється через IP_3Rs , залучається до вивільнення Ca^{2+} через RyRs і/або навпаки.

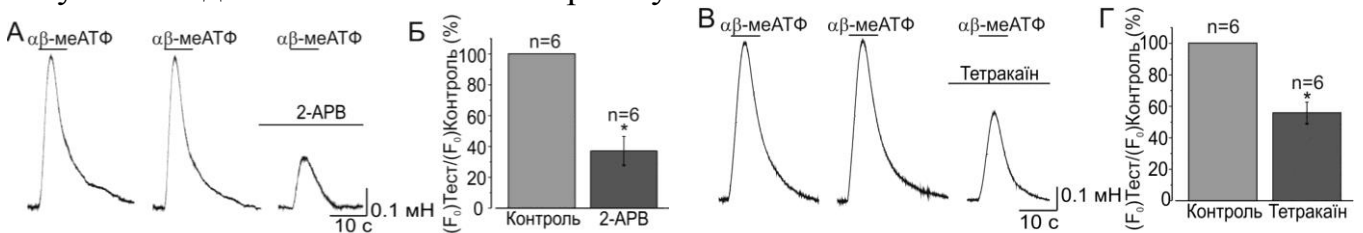


Рис. 10. Вплив блокатору IP_3Rs та RyRs на фазне скорочення викликане агоністом P2X рецепторів, 10 мкМ $\alpha\beta\text{-meATP}$. Для кожного з блокаторів показані типові записи скорочення (А,В) та усередненні результати (Б,Г) (* $p < 0.05$).

Особливості залучення трансмембранного входу Ca^{2+} до вивільнення Ca^{2+} через RyRs і IP_3Rs саркоплазматичного ретикулуму при фазному скороченні

Амплітуди фазного скорочення порівнювалися при активації P2X рецепторів у присутності й відсутності нікардіпіну, з метою виявлення особливостей залучення іонів Ca^{2+} , що входять до ГМК через канали поверхневої мембрани, у вивільнення Ca^{2+} через RyRs і IP_3Rs саркоплазматичного ретикулуму (рис. 11). Було виявлено, що фазне скорочення в присутності нікардіпіна було менш чутливе до блокування IP_3Rs ніж RyRs (пригнічення відповідей інгібіторами IP_3Rs та RyRs , відповідно, на $47.1 \pm 9.5\%$ та $22.9 \pm 1.4\%$ в контролі у порівнянні з інгібуванням на $38.3 \pm 9.6\%$ та $51.8 \pm 7.8\%$ після блоку L-VGCCs). Таким чином, обмеження входу Ca^{2+} через L-VGCCs настільки зменшує внесок IP_3Rs , що їх відносний внесок у скорочення, викликане активацією P2X рецепторів, стає на 29% нижчим, ніж внесок RyRs .

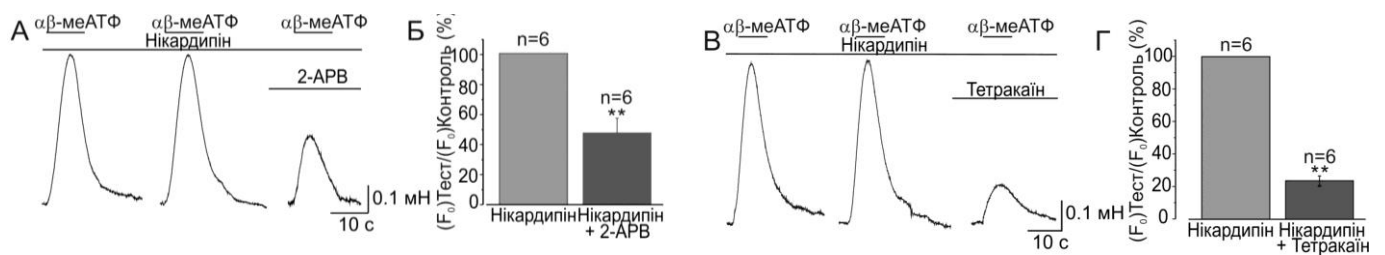


Рис. 11. Вплив блокаторів IP_3Rs та RyRs на фазне скорочення, викликане агоністом P2X рецепторів в присутності блоатора L-VGCCs нікардіпіну. Типові записи скоротливих реакцій (А,В) Усереднені результати дії блокаторів IP_3Rs (Б) та RyRs (Г). * $p < 0.05$.

Таким чином, тензометричні дослідження на сегментах мезентеріальної артерії морської свинки підтверджують участь обох типів рецепторів CP , IP_3Rs та RyRs , у генерації фазного скорочення, викликаного стимуляцією пуринаргічних рецепторів. Оскільки фазне скорочення після блокування L-VGCCs є менш чутливим до блокування IP_3Rs ніж RyRs , IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} в основному пов'язане з активацією L-VGCCs .

В розділі 4 «Обговорення результатів досліджень» проведено узагальнення результатів цього дослідження та порівняння їх із існуючими даними щодо мембранних та внутрішньоклітинних механізмів підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при активації P2X рецепторів артеріальних міоцитів та участі L-VGCCs , IP_3Rs і RyRs в цьому процесі. Виявлено два основних шляхи входу Ca^{2+} в клітину: через P2X рецептори і через L-VGCCs . Для внеску кожного із цих компонентів були розраховані

коефіцієнти підсилення за рахунок залучення механізму CICR як відношення середніх максимальних амплітуд відповідних фракцій, які зберігалися або усувалися наступною інкубацією з блокатором L-VGCCs та/або блокатором Ca^{2+} -АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума. Цей підхід показав, що вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється CICR значно більше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори, хоча окремий внесок кожного з цих двох механізмів, що обумовлюється входом Ca^{2+} в клітину, істотно не відрізняється. Суттєва відмінність в ефективності цих двох Ca^{2+} сигнальних шляхів дає підстави для висновку, що вони можуть активувати різні механізми вивільнення Ca^{2+} із СР. Показано, що в контрольних умовах, коли в пуринергічній сигналізації задіяні і P2X рецептори, і L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за участю як IP_3Rs , так і RyRs , причому внесок вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs був більшим, ніж внесок RyRs та зменшувався при блокуванні L-VGCCs. Виходячи з цього, вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs залежить головним чином від активації L-VGCCs. Ця гіпотеза додатково підтримується даними на різних судинних ГМК [огляд Urena et al., 2013], згідно з якими активація L-VGCCs може запускати G білок/PLC/ IP_3 шлях, і, як наслідок, вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs . Це дозволяє пояснити і механізм участі IP_3 в пуринергічній сигналізації, так і більш ефективне підсилення Ca^{2+} сигналу через L-VGCCs, ніж через P2X рецептори. Проведена імунодетекція RyRs і IP_3Rs типу 1 в ГМК мезентеріальної артерії з виявленням відповідних забарвлених ділянок СР і ядра виявила, що IP_3Rs переважно експресуються в суб-плазмалеммальних ("junctional") елементах саркоплазматичного ретикулума (jSR), в той час як RyR в основному розташовані в центральних глибоких та навколядерних областях СР міоцитів. Ця структурна особливість робить IP_3Rs більш доступними для входу Ca^{2+} в клітину через плазматичну мембрану. Зважаючи на вищевикладене, jSR лежить в межах 10-15 нм від плазмалеми, а розташовані над ним плазмалемальні мікродомени і крихітний об'єм цитозолу, що знаходиться між ними, можуть утворювати "junctional" комплекси, які слугують Ca^{2+} «буферним бар'єром», через який Ca^{2+} може рухатися безпосередньо між позаклітинним середовищем і jSR [Blaustein et al., 2002, Poburko et al., 2008]. Це може полегшити (1) локальне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в jSR і (2) накопичення молекул, в тому числі Ca^{2+} , Na^+ [Blaustein et al., 2002, Poburko et al., 2008] і IP_3 , в цитозольному мікрооб'ємі, від якого дифузія в об'єм цитоплазми помітно обмежується [Poburko et al., 2008]. Беручи це до уваги, наступні фактори можуть сприяти активації IP_3Rs , що була викликана входом Ca^{2+} : (1) стійке збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в "junctional" цитозольному мікрооб'ємі [Blaustein et al., 2002, Poburko et al., 2008], (2) спонтанна фонові активність PLC [Prestwich et al., 1991, Horowitz et al., 2005, Peng et al., 2007], (3) Ca^{2+} активація IP_3Rs типу 1 з перехресною взаємодією [Foskett et al., 2007], (4) регулювання IP_3Rs іонами Ca^{2+} в просвіті СР [Rainbow et al., 2009] і (5) IP_3Rs кластеризація [Rahman et al., 2009]. Таким чином, при активації P2X рецепторів, окрім входу Ca^{2+} безпосередньо через P2X рецептори, артеріальні ГМК залучають більш ефективний механізм Ca^{2+} сигналізації, основним компонентом якого є вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинного депо, яке започатковується входом Ca^{2+} через L-VGCCs.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети, досліджено мембранні та внутрішньоклітинні механізми динаміки змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) при активації P2X рецепторів артеріальних гладеньком'язових клітин (ГМК).

За результатами поставлених в роботі задач зроблено такі висновки:

1. Активація P2X рецепторів ГМК мезентеріальної артерії морської свинки викликає паралельне залучення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які значно розрізняються за своїм внеском у загальну $[Ca^{2+}]_i$ відповідь, не зважаючи на те, що прямі внески трансмембранного входу Ca^{2+} через P2X рецептори та потенціалкеровані Ca^{2+} канали L-типу (L-VGCCs) є співставними.
2. Вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори. Таким чином, при активації P2X рецепторів, окрім входу Ca^{2+} через самі P2X рецептори, ГМК мезентеріальної артерії залучають більш ефективний механізм Ca^{2+} сигналізації, суттєвим компонентом якого є вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, що започатковується входом Ca^{2+} через L-VGCCs.
3. В контрольних умовах, коли в пуринергічній сигналізації задіяні як P2X рецептори так і L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за участю IP_3R та RyR . При цьому, відносний внесок вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs у загальну $[Ca^{2+}]_i$ відповідь є більшим, ніж $RyRs$. IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} , залучене активацією P2X рецепторів, виявилось більш чутливим до блоку L-VGCCs, ніж RyR -опосередковане, що свідчить про його функціональний зв'язок з активацією L-VGCCs.
4. Дослідження $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих відповідей кільцевих деендотелізованих сегментів мезентеріальної артерії морської свинки підтвердили, що вивільнення Ca^{2+} через обидва типи рецепторів $CP - IP_3Rs$ та $RyRs$ – бере участь у генерації фазного ізометричного скорочення. Блок L-VGCCs робить ці скоротливі відповіді менш чутливим до інгібіторів IP_3Rs ніж $RyRs$.
5. Імунофлуоресцентне забарвлення $RyRs$ і IP_3Rs виявило, що IP_3Rs експресовані переважно у субплазмалемальних цистернах CP , в той час як $RyRs$ розміщені переважно у центральних навколо-ядерних елементах CP . Ця структурна особливість робить IP_3Rs більш доступними для Ca^{2+} , який надходить у клітину через L-VGCCs. Таким чином, IP_3Rs можуть відігравати роль «проміжного підсилювача» між L-VGCCs та RyR -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} із CP .

Список опублікованих робіт здобувача за матеріалами дисертації

Статті:

1. **Суханова Х.Ю.** Дія модуляторів кальцієвого метаболізму на скорочення мезентеріальної артерії морської свинки при активації P2X рецепторів / Х.Ю. Суханова, В.О. Бурий, В.Ф. Сагач, Т.В. Болтон, Д.В. Гордієнко // Фізіологічний журнал. – 2009. – Vol. 55. – № 4. – Р. 74 – 82.

Дисертантом особисто розроблена концепція статті, виконані всі експерименти, аналіз та обробка результатів, написана стаття.

2. **Sukhanova K.Yu.** Contribution of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release mechanisms to purinergic contraction of the guinea-pig small mesenteric arteries / K.Yu. Sukhanova, V.A. Bouryi, D.V. Gordienko // International Journal of Physiology and Pathophysiology. – 2010. – Vol. 1. - № 1. – P. 67-77.

Дисертантом особисто розроблена концепція статті, виконані всі експерименти, аналіз та обробка результатів, написана стаття.

3. **Sukhanova K.Yu.** Mechanisms of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation following P2X receptor activation in the guinea-pig small mesenteric artery myocytes / K.Yu. Sukhanova, M.I. Harhun, V.A. Bouryi, D.V. Gordienko // Pharmacological Reports. – 2013. – Vol. 65. – P. 152-163.

Дисертантом особисто розроблена концепція статті, виконані всі експерименти, аналіз та обробка результатів, написана стаття.

4. **Sukhanova K.Yu.** Mechanisms of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release induced by P2X receptor activation in mesenteric artery myocytes / K.Yu. Sukhanova, M.I. Harhun, V.A. Bouryi, O.M. Thugorka, D.V. Gordienko // Pharmacological Reports. – 2013. – Vol. 66. – P. 363-372.

Дисертантом особисто розроблена концепція статті, виконані всі експерименти, аналіз та обробка результатів, написана стаття.

5. **Суханова К.Ю.** Конвергенция ионотропных и метаботропных сигнальных путей при активации P2X рецепторов гладкомышечных клеток сосудов / К.Ю. Суханова, В.О. Бурий, Д.В. Гордиенко // Нейрофизиология. – 2014. – Vol. 46. – № 5. – P. 389-397.

Дисертантом особисто розроблена концепція статті, виконані всі експерименти, аналіз та обробка результатів, написана стаття.

6. Gordienko D. Impaired P2X signalling pathways in renal microvascular myocytes in genetic hypertension / D. Gordienko, **K. Sukhanova**, O. Povstyan, M. Raphae, M. Harhun, Y. Dyskina, V. Lehen'kyi, A. Jama, Z.-L. Lu, R. Skryma, N. Prevarskaya // Cardiovascular Research. – 2015. – Vol. 105. – P. 131-142.

Дисертант особисто виконувала частину експериментів, їх аналіз та обробку, брала участь у обговоренні результатів дослідів.

Тези доповідей:

1. **Суханова Х.Ю.** Просторово-часові характеристики кальцієвих сигналів при активації іонотропних пуринорецепторів / Х.Ю. Суханова, Т.В. Болтон, Д.В. Гордієнко // Міжнародна наукова конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем», Львів, 8-11 листопада 2006. – Збірка тез. - с.142-143.
2. **Sukhanova K.Yu.** Spatio-temporal characteristics of intracellular Ca^{2+} mobilisation in stimulated mesenteric artery myocytes / K.Yu. Sukhanova, T.B. Bolton, D.V. Gordienko // International Symposium on Calcium Channels and Transporters, Manchester, 7th-9th June, 2007. – Abstract book. – PC. 27.
3. **Sukhanova K.Yu.** Intracellular Calcium Mobilisation and contraction induced by purinergic stimulation of vascular myocytes / K.Yu. Sukhanova, V.A. Bouryi, T.B. Bolton, V.F. Sagach, D.V. Gordienko // Society's Vascular & Smooth Muscle Physiology Themed Meeting at King's College London, 15th-17th December, 2008. - J. Physiol. – Proc. Physiol. Soc. – PC9.

4. **Sukhanova K.Yu.** Mechanisms of $[Ca^{2+}]_i$ mobilisation following P_2X receptor stimulation in the guinea-pig small mesenteric artery myocytes / K.Yu. Sukhanova, D.V. Gordienko // International Conference “Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling” Kyiv, Ukraine. – 11th-13th October 2009.
5. **Суханова Х.Ю.** Вход Ca^{2+} в клетку и высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при активации P_2X рецепторов мезентериальной артерии морской свинки / К.Ю. Суханова, Д.В. Гордиенко // III Съезд физиологов СНГ, Физиология и здоровье человека. – Ялта – 1-6 октября 2011. – Сборник тезисов. – С. 75.
6. **Sukhanova K.Yu.** Mechanisms of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release induced by P_2X receptor activation in small mesenteric artery myocytes / K.Yu. Sukhanova, V.A. Bouryi, D.V. Gordienko // Main Meeting of Physiology Society, Physiology 2012, Edinburgh, 1st-5th July 2012. – J. Physiol. – Proc. Physiol. Soc. – PC160.
7. **Суханова Х.Ю.** P_2X опосередкована активація Ca^{2+} каналів L-типу спричиняє IP_3 залежне вивільнення Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах мезентеріальної артерії / К.Ю. Суханова, В.О. Бурий, Д.В. Гордієнко // XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, 24-26 травня 2014 року, Львів. – Фізіологічний журнал. – Т. 60. – С. 20-21.

АНОТАЦІЇ

Суханова Х.Ю. **Механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком'язових клітинах при активації іонотропних пуринорецепторів.** Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена виявленню мембранних та внутрішньоклітинних механізмів пуринергічної кальцієвої сигналізації, які лежать в основі скоротливої активності гладеньком'язових клітин (ГМК) дрібних артерій і регуляції системного артеріального тиску. Проведено детальний аналіз відносного внеску механізмів входу Ca^{2+} в клітину та його вивільнення з внутрішньоклітинних депо у підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на стимуляцію P_2X рецепторів. Результати дослідження показали, що вхід Ca^{2+} в клітину через L-VGCCs підсилюється за рахунок CICR набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P_2X рецептори, не зважаючи на те, що відносний внесок цих механізмів у забезпечення входу Ca^{2+} в клітину значно не відрізняється. Таким чином, окрім входу Ca^{2+} через самі P_2X рецептори, артеріальні ГМК залучають більш ефективний механізм Ca^{2+} сигналізації, суттєвим компонентом якого є вивільнення Ca^{2+} із СР, яке започатковується входом Ca^{2+} через L-VGCCs. Виявлені особливості вивільнення Ca^{2+} із СР полягають в тому, що обидва типи рецепторів - $RyRs$ і IP_3Rs - беруть участь у пуринергічній регуляції скоротливої активності ГМК кровоносних судин. При цьому за контрольних умов внесок IP_3Rs є суттєво більшим ніж внесок $RyRs$, а блок L-VGCCs змінює ситуацію на протилежну. Останнє свідчить, що активація L-VGCCs пов'язана з IP_3Rs -опосередкованим вивільненням Ca^{2+} із СР. Імунофлуоресцентне забарвлення $RyRs$ і IP_3Rs продемонструвало, що IP_3Rs експресовані переважно у субплазмалемальних

цистернах СР, в той час як RyRs розміщені у центральних навколоядерних елементах СР.

Ключові слова: конфокальна мікроскопія, кальцієва сигналізація, P2X рецептори, потенціал-керовані кальцієві канали L-типу, IP₃-рецептори, ріанодинові рецептори, артеріальні гладеньком'язові клітини.

Суханова К.Ю. Механизмы кальциевой сигнализации в артериальных гладкомышечных клетках при активации ионотропных пуринорецепторов
Рукопись. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена выявлению мембранных и внутриклеточных механизмов пуринергической кальциевой сигнализации, которые лежат в основе сократительной активности гладкомышечных клеток (ГМК) мелких артерий и регуляции системного артериального давления. Проведено детальный анализ относительного вклада механизмов входа Ca^{2+} в клетку и высвобождения его из внутриклеточных депо в увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на стимуляцию P2X рецепторов. Анализ результатов показал, что вход Ca^{2+} в клетку через L-VGCCs усиливается за счет CICR намного сильнее, чем вход Ca^{2+} через P2X рецепторы, не смотря на то, что относительный вклад механизмов, которые обеспечивают вход Ca^{2+} в клетку, значительно не отличается. Таким образом, кроме входа Ca^{2+} через сами P2X рецепторы, артериальные ГМК вовлекают более эффективный механизм Ca^{2+} сигнализации, существенным компонентом которого является высвобождение Ca^{2+} из СР, которое запускается входом Ca^{2+} через L-VGCCs. Выявленные особенности высвобождения Ca^{2+} из СР состоят в том, что оба типа рецепторов – RyRs и IP₃Rs – участвуют в пуринергической регуляции сократительной активности ГМК кровеносных сосудов. При этом вклад IP₃Rs больший, чем вклад RyRs, а блок L-VGCCs меняет ситуацию на противоположную. Последнее свидетельствует, что активация L-VGCCs связана с IP₃Rs-опосредованным высвобождением Ca^{2+} из СР. Иммунофлуоресцентным окрашиванием RyRs и IP₃Rs продемонстрировано, что IP₃Rs экспрессированы главным образом под мембраной в субплазмалемальном СР, тогда как RyRs расположены на центральных и около ядерных элементах СР.

Ключевые слова: конфокальная микроскопия, кальциевая сигнализация, P2X рецепторы, потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа, IP₃-рецепторы, рианодиновые рецепторы, артериальные гладкомышечные клетки.

Sukhanova K.Y. Mechanisms of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in artery smooth muscle cells following ionotropic purinergic receptor stimulation. Manuscript.

Thesis for Ph.D. degree in biological science, speciality 03.00.02 – biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

This study unravels the mechanisms of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilisation following P2X receptor activation in arterial myocytes. Ionotropic P2X receptors (P2XRs) are involved in sympathetic control of the vascular tone and mediate Ca^{2+} influx into smooth muscle cells (SMCs) leading to plasma membrane depolarization and activation of L-type voltage-

gated calcium channels (L-VGCCs). In addition, Ca^{2+} entering the cell may trigger Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR) via ryanodine receptors (RyRs). It was recently demonstrated that Ca^{2+} release mediated by inositol trisphosphate (IP_3) receptors (IP_3Rs) also provides a considerable contribution to P2XR-linked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses, thus suggesting convergence of metabotropic and ionotropic signaling pathways.

Using confocal detection of changes in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and the inhibitors of calcium channels (nicardipine, 5 μM), sarco-endoplasmic Ca^{2+} -ATPase SERCA (CPA, 10 μM), IP_3Rs (2-APB, 30 μM), RyRs (tetracaine, 100 μM), and phospholipase C (PLC; U-73122, 2.5 μM), we estimated relative contribution of the above-mentioned four components to the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by selective P2XR agonist $\alpha\beta$ -meATP. We found that relative contribution of Ca^{2+} entry via P2XRs and L-VGCCs the $\alpha\beta$ -meATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses are comparable. The contribution of Ca^{2+} release via IP_3Rs was found to be three times greater than that via RyRs. However, block of L-VGCCs resulted in a sevenfold decrease in the contribution of IP_3R -mediated Ca^{2+} release and reversal of the situation. This observation suggests a functional coupling between activation of L-VGCCs and metabotropic PLC/ IP_3 -mediated signaling cascade. The efficiency of inhibition of $\alpha\beta$ -meATP-induced calcium responses by PLC inhibitor, on the one hand, and by the IP_3Rs blocker and nicardipine, on the other hand, were found to be comparable, what supports further the above hypothesis. According to our data, P2XR-linked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response results not only from P2XR-mediated Ca^{2+} entry that triggers Ca^{2+} release via RyRs, but also from Ca^{2+} release via IP_3Rs activated mainly by L-VGCCs-mediated Ca^{2+} influx. The latter process, involving PLC-mediated pathway, provides predominant contribution to Ca^{2+} release from the stores after activation of ionotropic purinoceptors.

Keywords: confocal microscopy, calcium signaling, P2X receptors, L-type voltage-gated calcium channels, I_3P -receptors, ryanodine receptors, artery smooth muscle cells.