

І.О. Лук'янець, П.Г. Костюк, О.О. Лук'янець

Кальцієвого гомеостаз у нейронів гіпоксіє-толерантного виду карася

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

Іони Ca^{2+} виконують подвійну роль у функціонуванні нейронів - з одного боку Ca^{2+} відіграє роль внутрішньоклітинного месенджера, який регулює збудливість нейронів та контролює створення та модифікацію синапсів. З іншого боку, за певних умов, Ca^{2+} може викликати набір реакцій які запускають клітинну смерть. Встановлено, що одним із таких руйнуючих факторів може бути зниження парціального тиску кисню в крові – гіпоксія/ішемія. Збільшений вміст Ca^{2+} у клітині, викликаний гіпоксією, викликає безладну активацію протеїнкіназ, фосфатаз та протеаз, які порушують внутрішньоклітинний гомеостаз, клітинну цілісність, що призводить до апоптозу або некрозу.

Відомо, що в природі існує багато видів тварин пристосованих вижити в екстремальних умовах, у тому числі при недостатці кисню – гіпоксії. Серед широкої різноманітності тварин такі представники зустрічаються серед теплокровних і холонокровних видів. Серед толерантних до гіпоксії тварин, відомі численні види риб. У водоймах України мешкає широко розповсюджений вид, представник сімейства коропових риб – карась срібний (*Carassius auratus gibelio*, Bloch). Карась володіє надзвичайно високою життєстійкістю, виживає в умовах, коли всі інші риби гинуть від несприятливих умов, включаючи гіпоксію.

Мета роботи – вивчення особливостей внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, які можуть забезпечувати високу стійкість карася до зниження парціального тиску кисню.

Матеріали і методи. Експерименти були виконані на ізольованих нейронах мозочку срібного карася *Carassius auratus gibelio*, Bloch, виділених з мозку 3-річних риб середньою вагою 70 г. Внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) вимірювалася за допомогою Ca^{2+} -чутливого барвника Fura-2AM, який збуджувався світлом із довжиною хвилі 360 та 390 нм за допомогою монохроматора, флуоресцентний сигнал вимірювався CCD камерою. Для завантаження клітин кальцій-чутливим барвником клітини витримувались в розчині Тіроде (Tyrode) до складу якого входив флуоресцентний барвник Fura-2AM ("Sigma"США) в концентрації 5 мкМ, розчинений в диметилсульфоксиді (DMSO) з додаванням детерген-

ту плуронік F-127 (0,02%). Завантаження клітин барвником здійснювалась на протязі 30 хв. при кімнатній температурі +22°C при відсутності світла. Після цієї процедури клітини інкубувались у розчині Тіроде протягом 30-40 хв. для забезпечення повної деестерифікації барвника. Для контролю рівню вмісту кисню в омиваючому клітину розчині використовувався полярографічний метод, а для досягнення гіпоксії – хімічна сполука гідросульфід натрію. При роботі з клітинами використовувався розчин DMEM ("Sigma"США) та розчин на основі Tyrode (в мілімолях на 1 л): NaCl – 125, CaCl – 2, KCl – 2,5, MgCl – 1, HEPES – 20, glucose – 10 (pH 7,4). В якості специфічного блокатора кальцієвого транспорту для Ca^{2+} -АТФаз використовували циклопіазонову кислоту (CPA) в концентрації 50 мкМ. Всі досліди проводили при кімнатній температурі.

Результати та їх обговорення. Були досліджені характеристики окремих внутрішньоклітинних компонентів-учасників кальцієвого гомеостазу. Серед них – Ca^{2+} -канали цитоплазматичної мембрани, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, Ca^{2+} -помпи мембрани та ретикулуму і $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. Для цього використовувалися відповідні фармакологічні інструменти – агоністи та антагоністи цих систем. Встановлено, що нейрони мозочку карася мають добре виражені основні системи очищення цитоплазми від Ca^{2+} - кальцієвою помпою (PMCA), Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулуму (SERCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та мітохондрії. Нами було встановлено, що вказані системи забезпечують очищення цитоплазми від Ca^{2+} приблизно у рівному співвідношенні, де SERCA та мітохондрії відіграють більш визначну роль. Припускається, що $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та PMCA відіграють більшу роль у підтриманні базального рівню Ca^{2+} в клітині, тоді як ретикулум (SERCA) та мітохондрії більш залучені в очищення цитоплазми від Ca^{2+} під час стимуляції клітини.

Висновок

Зроблено висновок, що гіпоксія викликає збільшення Ca^{2+} в клітинах мозочку карася. Найбільш ефективним агентом усунення гіпоксичного ефекту, є блокування Ca^{2+} -акумуляуючої функції мітохондрій та запобігання втоку Ca^{2+} в клітину через Ca^{2+} -канали.