

## УЧАСТЬ КАЛЬЦІЙТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ В КАЛЬЦІЄВОМУ ОБМІНІ В НЕЙРОНАХ МОЗОЧКА КАРАСЯ

Надійшла 15.07.09

Вивчали роль натрій-кальцієвого обмінника (NCX) та Ca<sup>2+</sup>-АТФази плазматичної мембрани (PMCA) як важливих внутрішньоклітинних систем регуляції кальцієвого обміну в нейронах мозочка толерантного до гіпоксії виду риб – карася *Carassius gibelio*. В експериментах використовували відповідні блокатори цих транспортних систем – іони літію та лантану. Внутрішньоклітинну концентрацію Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) вимірювали за допомогою кальційчутливого барвника Fura-2AM та мікрофлуоресцентного методу. Як було встановлено, нейрони мозочка карася мають ефективну систему очищення цитоплазми від надлишкового Ca<sup>2+</sup>, котре забезпечується як NCX, так і PMCA, присутніми в плазматичній мембрані. В умовах блокування роботи PMCA за допомогою лантану базальний рівень Ca<sup>2+</sup> у клітині збільшувався в середньому на 31.4 % відносно контролю незалежно від тривалості тест-деполяризації. При виключенні роботи NCX за допомогою заміни іонів натрію в зовнішньому розчині іонами літію рівень Ca<sup>2+</sup> у клітині збільшувався на 36.6 % відносно контролю (також незалежно від тривалості деполяризації). Отримані дані вказують на те, що функціонування PMCA та NCX у нейронах мозочка карася істотно впливає на внутрішньоклітинний кальцієвий обмін, забезпечуючи підтримання адекватного базального рівня Ca<sup>2+</sup> у цих нейронах.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** натрій-кальцієвий обмінник, Ca<sup>2+</sup>-АТФаза, гіпоксія, толерантність до гіпоксії, карась, кальцій, нейрони, мозочок.

### ВСТУП

Перспективним напрямком наукових пошуків ефективних засобів лікування патологічних станів, викликаних ішемією/гіпоксією, є вивчення механізмів виживання нейронів тварин, толерантних до гіпоксії [1, 2]. До подібних видів, зокрема, відноситься срібний карась *Carassius gibelio*. Як було показано раніше, в умовах ряду патологічних станів, у тому числі під час гіпоксії/ішемії, відбувається істотне підвищення концентрації кальцію в цитоплазмі нервових клітин, що може призводити до їх апоптозу та загибелі [3, 4]. Вилучення надлишкового Ca<sup>2+</sup>, що накопичується в цитозолі під час збудження нейронів, забезпечується декількома мембранними системами. Серед них істотну роль відіграють натрій-кальцієвий обмінник (NCX) та Ca<sup>2+</sup>-АТФаза

цитоплазматичної мембрани (PMCA). Вважається, що NCX є одним з найпотужніших клітинних механізмів виведення Ca<sup>2+</sup> із цитозолу [5]. PMCA розповсюджена ширше, має набагато вищу спорідненість до Ca<sup>2+</sup>, але набагато нижчу місткість. Висока спорідненість PMCA до Ca<sup>2+</sup> забезпечує їй здатність зв'язувати ці іони навіть в умовах, коли їх концентрації дуже низькі. Тому вважається, що PMCA реалізує модуляцію кальцієвих внутрішньоклітинних сигналів при низьких концентраціях даних іонів у межах нормального функціонування клітини [6], а активності NCX і PMCA є взаємодоповнюючими факторами.

NCX є антипортерним мембранним білком, який має здатність ефективно видаляти кальцій із клітини. Для цього процесу використовується енергія електрохімічного градієнта натрію, забезпечуючого вхід іонів Na<sup>+</sup> згідно з градієнтом концентрації через плазматичну мембрану в обмін на зустрічний транспорт іонів Ca<sup>2+</sup>, котрі виводяться назовні клітини. У перебігу одиночного циклу NCX видаляє з

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).  
Ел. пошта: elena@biph.kiev.ua (О. О. Лук'янець).

цитоплазми один іон кальцію та натомість імпортує три іони натрію [7]. NCX зв'язує  $\text{Ca}^{2+}$  не дуже міцно (має низьку спорідненість), але має високу місткість і може швидко переносити згадані іони – аж до п'яти тисяч іонів  $\text{Ca}^{2+}$  за секунду [8]. Такі властивості NCX забезпечують його ефективну роботу в разі значних підвищень концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , і він є здатним позбавляти клітини великих кількостей  $\text{Ca}^{2+}$  за короткий час. Необхідність у цьому може виникати в умовах гіперзбудження клітини та деяких патологічних станів, наприклад при глутаматній ексайтотоксичності [9], гіпоксії та ін.

До теперішнього часу було знайдено декілька блокаторів NCX, але всі вони виявилися не досить селективними, справляючи дію на інші клітинні процеси, а не тільки на обмін  $\text{Ca}^{2+}$ . Відносно специфічними блокаторами кальцієвого транспорту, котрий забезпечується NCX, є такі сполуки, як CGP-37157 (7-хлоро-5-(2-хлорфеніл)-1,5-дигідро-4,1-бензотіазепін-2(3H)один), TRP (тетрафенілфосфоній) та KB-R7943 ([нітробензилокси)фенілетил]мезилат ізотіосечовини). Останній є сильним селективним інгібітором реверсного способу роботи NCX ( $\text{IC}_{50} = 0.7$  мкМ). Він не впливає на натрійзалежні транспортні системи, натрієві канали або іонотропні глутаматні рецептори, але блокує канали сімейства TRPC [10]. Серед відповідних агентів також відомі SEA-0400 (2-[4-[(2,5-дифлуорофеніл)метокси]феноксид]-5-етоксіанілін), беприділ та DCB (3',4'-дихлорбензамілгідрохлорид). Виявилося, що деякі з них є більш специфічними щодо або плазматичного (NCX-пм), або мітохондріального (NCX-мх) NCX. Так, CGP-37157 є ефективним селективним інгібітором мітохондріального NCX ( $\text{IC}_{50} = 0.4$  мкМ), але він також блокує мітохондріальну перехідну проникність. TRP, який виявився специфічним блокатором мітохондріального NCX, також блокує мітохондріальні калієві канали mitoKIR та mitoKATP [11]. Крім того, він та його аналог конкурентним чином істотно пригнічують амінооксидази, зокрема амінооксидазу сироватки бика (BSAO) [12]. Багато сполук, що мають властивості блокаторів кальцієвих каналів, є також блокаторами NCX-мх. Серед них – дилтіазем, феніламін, фенілідин, ніфедипін та верапаміл. Їх  $\text{IC}_{50}$  відповідно складають 7, 12, 13, 66 та 150 мкМ [13]. У той же час така споріднена сполука, як клоназепам, виявилася сильним блокатором NCX ( $\text{IC}_{50} = 7$  мкМ), але вона не впливає на активність кальцієвих каналів. Таким чином, можна констатувати, що, хоча відносно селективні блокатори NCX існують, їх

дія може ускладнюватися можливими впливами на інші компоненти клітинних процесів.

Ефективним інструментом для вивчення активності NCX може бути заміна іонів  $\text{Na}^+$  іонами  $\text{Li}^+$  або застосування іонів  $\text{La}^{3+}$ . Ще в 1974 р. Карафолі та співавт. показали, що такі іони, як  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  або  $\text{Mg}^{2+}$ , не можуть замінювати іони  $\text{Na}^+$  або  $\text{Ca}^{2+}$  у роботі NCX, проте іони  $\text{Li}^+$  можуть замінювати іони  $\text{Na}^+$  у перебігу NCX-мх-опосередкованого транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  [14]. Пізніше встановили, що мембранний NCX-пм не має такої властивості, але іони  $\text{Li}^+$  у цьому випадку можуть бути активаторами NCX; в їх присутності активність NCX могла збільшуватися до 270 % порівняно з контролем [15]. Іншою особливістю NCX-мх виявилася здатність цього обмінника опосередковувати неелектрогенний обмін  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  у відсутності  $\text{Ca}^{2+}$  (див. [13]). Результати досліджень показали, що іони  $\text{La}^{3+}$  ефективно блокують NCX як у плазматичній мембрані, так і в мітохондріях, але менш ефективно, ніж кальцієвий уніпортер мітохондрій. Крім того, як було встановлено,  $\text{La}^{3+}$  не блокує протон-кальцієвого обмінника, забезпечуючого обмін  $\text{Ca}^{2+}$  у незбудливих клітинах, де NCX є відсутнім.

На даний час специфічні блокатори РМСА плазматичної мембрани невідомі, але існують антагоністи кальмодуліну (такі, як кальмідазоліум або трихлорпромазин), ортованадат, (карбоксі-)еозин та іони  $\text{La}^{3+}$ , котрі паралельно блокують активність цього ферменту. Підвищення рН на зовнішньоклітинному боці мембрани також блокує дану молекулярну помпу, оскільки згаданий фермент обмінює протони на викачуваний  $\text{Ca}^{2+}$ . Існують дані про те, що іони  $\text{La}^{3+}$  у низьких концентраціях (<250 мкМ) блокують РМСА та не впливають на активність NCX, але при більших концентраціях вони також можуть ефективно пригнічувати активність NCX [16].

У нашій роботі ми вивчали особливості функціонування NCX та РМСА мембрани в нейронах мозочка толерантного до гіпоксії виду риб (*Carassius gibelio*) та пов'язані з цим особливості внутрішньоклітинного кальцієвого обміну в зазначеному об'єкті. В експериментах використовували ізольовані нейрони мозочка.

## МЕТОДИКА

Експерименти були виконані на ізольованих нейронах мозочка срібного карася *Carassius gibelio*, ви-

ділених з мозку трирічних риб (середня маса 70 г). Для знеболювання було використано метод природного газового наркозу, запропонований Карамяном для операцій на головному мозку риб [17]. Ми модифікували даний метод: рибу, підготовлену вищевказаним способом, додатково охолоджували, вміщуючи в спеціальній ємкості в морозильну камеру (температура  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) на 5–10 хв. Видалений мозочок одразу вміщували в охолоджений до  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  розчин DMEM (“Sigma Aldrich”, США) на 7 хв і після цього розрізали на частини, які витримували 10 хв у розчині DMEM на льоду. Блоки тканини мозочка піддавали ферментативній обробці розчином, котрий вміщував 0.1 % протеази (“Sigma Aldrich”, США) та 0.1 % трипсину (“Sigma Aldrich”, США), при температурі  $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Після ферментної обробки частини мозочка відмивали розчином DMEM, подрібнювали на менші фрагменти та пропускали через піпетки. Отримані окремі нейрони розміщували на покривних скельцях. Для завантаження клітин кальційчутливим барвником клітини витримували в розчині Тіроде з додаванням флуоресцентного барвника Fura-2AM (“Molecular Probes”, США) у концентрації 5 мкМ та детергенту Плуронік F-127 (0.02 %). Завантаження клітин барвником здійснювалося протягом 30 хв при кімнатній температурі ( $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Після цієї процедури клітини інкубували в розчині Тіроде протягом 30–40 хв для забезпечення повної деестерифікації барвника.

Рівень внутрішньоклітинного кальцію вимірювали за допомогою мікрофлуоресцентного аналізу. Для вимірювання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  барвник поперемінно збуджували ультрафіолетовим світлом з двома довжинами хвиль (360 та 390 нм), використовуючи монохроматор. Для реєстрації кальцієвих транз'єнтів під час експерименту застосовували CCD-камеру Imago-QE (“Till Photonics”, ФРН). Сигнали з CCD-камери подавали на комп'ютер, за допомогою якого вимірювали відношення величин флуоресцентних сигналів при двох довжинах хвиль ( $R = F_1/F_2$ ); це відношення, як відомо, адекватно відображує зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Запис та обробка даних експерименту здійснювалися із застосуванням програми “TillVision” (ФРН).

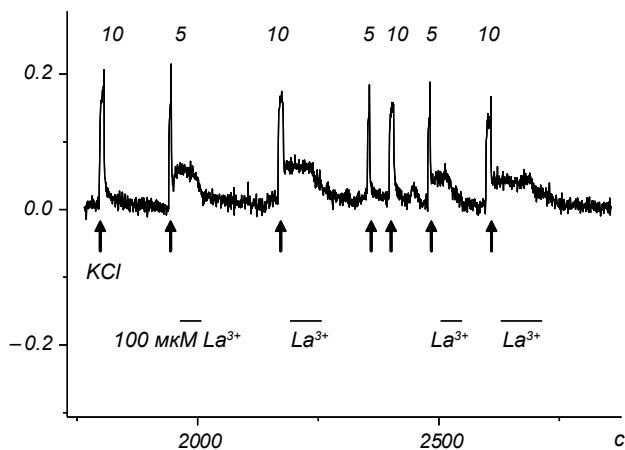
Під час роботи з клітинами використовували розчин DMEM та розчин, аналогічний розчину Тіроде, такого складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 125, CaCl – 2, KCl – 2.5, MgCl – 1, HEPES – 20, глюкоза – 10 (рН 7.4). Усі досліди проводили при кімнатній температурі. Статистична обробка вико-

нувалася за допомогою програмного забезпечення “OriginPro 8.0”. Усі чисельні значення результатів дослідження наведені у вигляді середніх значень  $\pm$  похибка середнього ( $m \pm s.e.m.$ ). Рівень вірогідності різниць визначався за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA), і відмінності вважалися вірогідними при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

Кальцієві транз'єнти в досліджуваних клітинах мозочка карася викликалися деполяризацією плазматичної мембрани. Використовували лише клітини із чітко окресленою мембраною без пошкоджень і без чітко видимих внутрішньоклітинних компартментів. Деполяризацію плазматичної мембрани викликали аплікацією розчину з підвищеною концентрацією  $\text{K}^+$  (50 мМ). У відповідь на таку деполяризацію мембрани гіперкалієвим розчином у нейронах мозочка карася відбувалося швидке зростання внутрішньоклітинного рівня  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), після чого спостерігалось швидке експоненціальне падіння  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до нормальних значень протягом відносно короткого проміжку часу. Для тестування життєздатності клітин та задовільного відтворення відповідей ми використовували аплікації гіперкалієвого розчину тривалістю 5 с. Амплітуда кальцієвих транз'єнтів, що виникали у відповідь на деполяризацію мембрани, була стабільною та стійкою протягом усього періоду експерименту (25–30 хв). Амплітуди та кінетичні параметри кальцієвих транз'єнтів на початку експерименту та через 25 хв мали подібні значення, що вказувало на збереження нормальної життєдіяльності клітини під час дослідження.

У наступних експериментах ми досліджували участь мембранної PMCA в кальцієвому обміні нейронів. Для цього ми використовували додавання 100 мкМ іонів  $\text{La}^{3+}$  у зовнішній розчин (при такій концентрації  $\text{La}^{3+}$  блокує активність PMCA і не впливає на активність NCX [16]). Кальцієві транз'єнти в контрольних умовах викликали деполяризацією мембрани, використовуючи аплікації гіперкалієвого розчину тривалістю 5 або 10 с (рис. 1). Амплітуда контрольних кальцієвих транз'єнтів при таких тривалостях стимуляції була ідентичною або трохи більшою в разі триваліших деполяризацій. Час повернення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до базального рівня та відносна кількість  $\text{Ca}^{2+}$ , що входив у клітину під час деполяризації, зі збільшенням три-

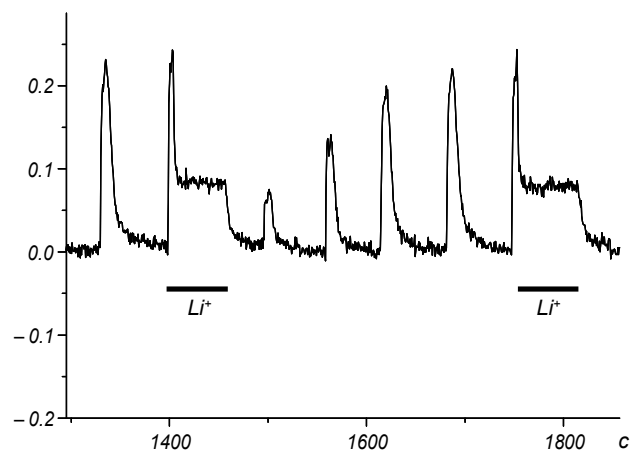


**Р и с. 1.** Кальцієві транзєнти в нейронах мозочка карася, викликані деполаризацією плазматичної мембрани – аплікаціями 50 мМ КСІ (позначено стрілками) різної тривалості – 5 та 10 с (позначено вгорі).

Вимірювання були проведені в контролі і в умовах блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани в присутності 100 мкМ  $\text{La}^{3+}$  в зовнішньому розчині (позначено лініями під записами транзєнтів). По осі абсцис – час, с; по осі ординат – відношення величини флуоресцентних сигналів при двох довжинах хвиль ( $F/F_0$ ), що відображає зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію.

валості аплікації гіперкалієвого розчину зростали (рис. 1).

Дія  $\text{La}^{3+}$  тестувалася також із використанням двох тривалостей дії гіперкалієвого розчину (5 та 10 с). Відомо, що  $\text{La}^{3+}$ , як і багато інших неорганічних катіонів, може також блокувати активність потенціалзалежних кальцієвих каналів мембрани. Тому для виключення такої можливості ми аплікували розчин, який вміщував  $\text{La}^{3+}$ , відразу ж після деполаризації мембрани. Як показали вимірювання, амплітуда кальцієвих транзєнтів після блокування роботи РМСА не зростала при збільшенні тривалості дії  $\text{La}^{3+}$ , проте у всіх досліджуваних клітинах рівень  $\text{Ca}^{2+}$  повертався не до базального, а до деякого значно вищого значення. Іншими словами, спостерігалася певна «поличка», котра існувала стільки, скільки тривала аплікація  $\text{La}^{3+}$  (рис. 1). Це вказувало на блокування роботи РМСА, в результаті чого в цитозолі накопичувався  $\text{Ca}^{2+}$  і базальний рівень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  зростав. Після видалення  $\text{La}^{3+}$  із зовнішнього розчину за допомогою відмивання базальний рівень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  повертався до початкової величини протягом приблизно 1 хв. Кількісні вимірювання кальцієвих транзєнтів, викликаних 3- або 5-секундними деполаризаціями під дією гі-

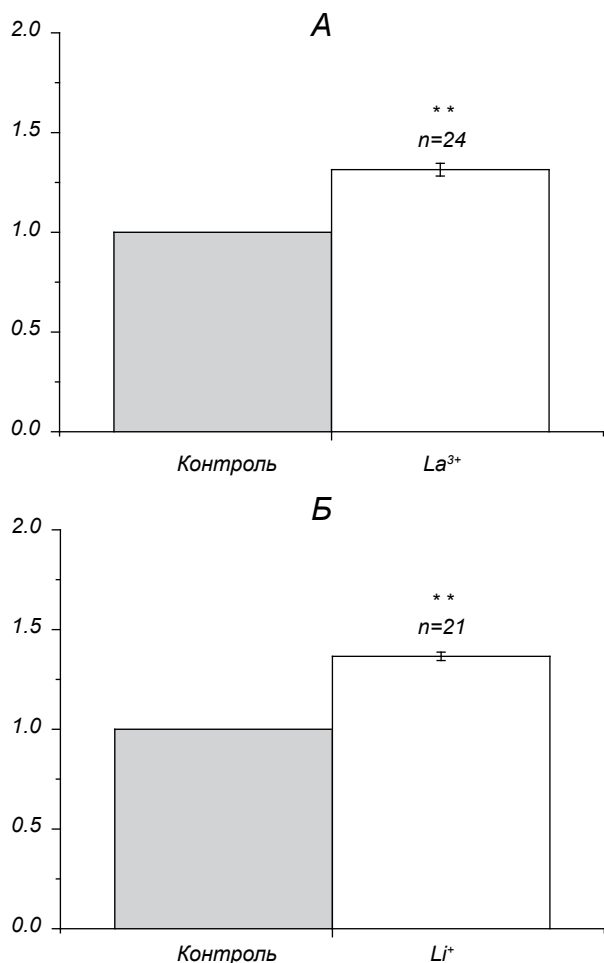


**Р и с. 2.** Кальцієві транзєнти, викликані в нейронах мозочка карася деполаризацією мембрани (аплікаціями 50 мМ КСІ тривалістю 5 с).

Вимірювання були проведені в контролі і в умовах блокування мембранного натрій-кальцієвого обмінника в результаті заміни  $\text{Na}^+$  у зовнішньому розчині іонами  $\text{Li}^+$ . Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.

перкалієвого розчину, показали, що в присутності 100 мкМ  $\text{La}^{3+}$  базальний рівень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  підвищувався відносно контрольних значень у середньому на  $31.4 \pm 3.2\%$  ( $P < 0.01$ ; рис. 3, А), і цей ефект не залежав від тривалості деполаризації. При збільшенні концентрації  $\text{La}^{3+}$  характер змін кальцієвих транзєнтів істотно змінювався.

Для визначення участі мембранного NCX ми замінювали іони  $\text{Na}^+$  у зовнішньоклітинному розчині іонами  $\text{Li}^+$ . Як уже вказувалося вище, NCX-пм не може функціонувати в умовах, коли іони  $\text{Na}^+$  заміщені іонами  $\text{Li}^+$ , тоді як робота NCX-мх при цьому не порушується [13]. Така ситуація дає змогу за допомогою іонів  $\text{Li}^+$  дослідити роль NCX-пм, не втручаючись у роботу NCX-мх. Для вивчення дії іонів  $\text{Li}^+$  був застосований такий самий, як і в попередньому випадку (у разі використання  $\text{La}^{3+}$ ), протокол експериментів; використовували два значення тривалості деполаризації мембрани (5 і 10 с) під дією гіперкалієвого розчину. Як видно з рис. 2, вплив  $\text{Li}^+$  в аналогічних умовах був подібним до такого іонів  $\text{La}^{3+}$ , описаного вище. У присутності іонів  $\text{Li}^+$  амплітуда кальцієвих транзєнтів не змінювалась, а рівень цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$  після розвитку таких транзєнтів не повертався до почат-



**Рис. 3.** Вплив блокування Ca<sup>2+</sup>-АТФази плазматичної мембрани під дією 100 мкМ La<sup>3+</sup> (А) та мембранного натрій-кальцієвого обмінника в результаті заміни Na<sup>+</sup> у зовнішньому розчині іонами Li<sup>+</sup> (Б) на базальний рівень Ca<sup>2+</sup> у нейронах мозочка карася. Наведені нормовані значення даного параметра; за одиницю прийнятий рівень Ca<sup>2+</sup> в умовах контролю. \*\**P* < 0.01 порівняно з контролем.

кового значення. Цей рівень збільшувався відносно контрольних значень у середньому на  $36.6 \pm 2.1\%$  ( $P < 0.01$ ; рис. 3, Б); величина таких зрушень не залежала від тривалості деполяризації клітини. Після відмивання базальний рівень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> повертався до початкового значення протягом 1–2 хв. На відміну від дії La<sup>3+</sup> у випадку використання Li<sup>+</sup> і заміни його контрольним розчином, що вміщував Na<sup>+</sup>, спостерігалось значне зменшення амплітуди кальцієвих транзєнтів, викликаних контрольними аплікаціями KCl (рис. 2). Однак згодом (через 6–7 хв) амплітуда цих транзєнтів поступово відновлювалася до контрольного рівня. Даний феномен можна пояснити нездатністю іонів Li<sup>+</sup> замінювати іони Na<sup>+</sup>

у перебігу деполяризації мембрани нейронів, зумовленої роботою натрієвих каналів. Необхідно зазначити, що описані ефекти проявлялись у всіх досліджуваних нейронах і дуже добре відтворювались.

Таким чином, отримані дані можуть вказувати на те, що активність РМСА та NCX мембрани в нейронах мозочка карася є досить істотною. Вона забезпечує значний внесок у функціонування кальцієвої сигнальної системи нейронів цих тварин.

## ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що у хребетних тварин нервова система є найбільш вразливою до дії ішемії/гіпоксії. З іншого боку, виявилось, що існує цілий ряд видів тварин, пристосованих виживати в екстремальних умовах нестачі кисню – інтенсивної гіпоксії. Серед толерантних до гіпоксії тварин відомі досить багато видів риб; зокрема, у водоймах України мешкає представник родини корошових – карась срібний (*Carassius gibelio*). Цей вид карася відомий своєю загальною високою життєстійкістю [18]. У несприятливих умовах замору (нестачі кисню) він здатен успішно виживати, тоді як переважна кількість інших видів риб у таких умовах гинуть. Беручи до уваги той факт, що в процесах ушкоджень нервової тканини під час гіпоксії істотну роль відіграє значне підвищення рівня цитоплазматичного кальцію, вивчення особливостей клітинних механізмів кальцієвого обміну в нейронах толерантних до гіпоксії тварин є перспективним напрямом; такі механізми зумовлюють високу стійкість нейронів до виживання в умовах нестачі кисню.

Метою наших досліджень було визначення особливостей функціонування двох основних механізмів видалення іонів Ca<sup>2+</sup> із цитозолу – РМСА та NCX ендоплазматичної мембрани – та їх ролі в забезпеченні кальцієвого гомеостазу в нейронах мозочка толерантного до гіпоксії виду риб – карася *Carassius gibelio*. РМСА мембрани має дуже багато спільних властивостей з Ca<sup>2+</sup>-АТФазою ендоплазматичного ретикулуму (SERCA). Обидва ці транспортних ензими мають велику спорідненість до Ca<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub> = 0.2–0.5 мкМ). Проте виявилось, що РМСА значно ефективніша, ніж SERCA, у відновленні базального рівня Ca<sup>2+</sup> після стимуляції клітини. Вважається, що ця властивість може бути пов'язана з особливостями локалізації даних транспортних систем, насамперед в аспекті близькості до кальцієвих каналів [19]. Можливо, саме останнім і

зумовлена більша ефективність РМСА. Іншою відмінністю РМСА від SERCA є стехіометрія  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ -реакції, яка є рівною одиниці в РМСА та двом у випадку SERCA. РМСА є об'єктом контролю, котрий здійснюється численними клітинними ферментами та регуляторами, серед яких слід згадати протеїнкінази, протеази (особливо кальцинейрин), каспази та ін. Однією з особливостей РМСА є присутність в її цитозольному домені кальмодулінзв'язуючого сайту, котрий за відсутності кальмодуліну діє як автоінгібуєча ділянка молекули ферменту. Саме це є причиною того, що антагоністи кальмодуліну можуть блокувати активність РМСА. Існує чотири ізоформи РМСА (1–4), котрі кодуються різними генами, а також багато її сплайсових варіантів. Три ізоформи РМСА (1–3) експресуються в мозку, тоді як РМСА-4 є ізоформою, розповсюдженою в усіх тканинах [6]. Експресія РМСА регулюється іонами  $\text{Ca}^{2+}$  – збільшення їх концентрації стимулює експресію даного ферменту. Позитивна регуляція (up-regulation) експресії РМСА, очевидно, є фундаментальною властивістю, котра гарантує виживання нейронів у несприятливих умовах (значного та/або довготривалого підвищення рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ ).

NCX є присутнім у різних типах клітин різних видів тварин [5]. Були ідентифіковані три ізоформи плазматичного NCX (NCX1, NCX2 та NCX3). Ці ізоформи експресуються родиною окремих генів, що знаходяться в різних хромосомах; всі ізоформи мають багато сплайсових варіантів [20]. Їх активність залежить від багатьох клітинних факторів і модулюється останніми, у першу чергу іонами  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^+$ , а також протеїнкіназами,  $\text{PIP}_2$ , АТФ та ін. [15]. Встановлено, що NCX існує в плазматичній мембрані, мембранах мітохондрій та ендоплазматичного ретикулу збудливих і незбудливих клітин [9, 13, 21]. Усі форми NCX експресуються в нейронах різних ділянок мозку, у тому числі й мозочка. Цікавою особливістю NCX-пм є його здатність оперувати в двох режимах – прямому та зворотному. Коли концентрація  $\text{Na}^+$  в цитоплазмі істотно збільшується, NCX переходить до оперування в зворотному режимі – іони  $\text{Na}^+$  виводяться з клітини в обмін на іони  $\text{Ca}^{2+}$ , що вносяться в середину клітини. Даний феномен роботи NCX у натрійзалежному режимі може спричинювати кальційзалежне ушкодження

нейронів в умовах гіпоксії/аноксії, коли рівень АТФ падає (це значно знижує активність РМСА, яка виводить надлишковий  $\text{Na}^+$  з цитоплазми), а рівень  $\text{Ca}^{2+}$  значно підвищується. Іншою особливістю NCX-пм є те, що місце зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  для активації вказаного обмінника відрізняється від місця транспортування  $\text{Ca}^{2+}$ . Значення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , необхідні для активації NCX, лежать у діапазоні 100–300 нМ. Відомо, що NCX залучений у реалізацію різноманітних функцій клітини, таких, як контроль нейросекреції, активність фоторецепторних клітин, спряження збудження/скорочення у м'язових клітинах, регуляція концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у збудливих клітинах, обмін  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях та ендоплазматичному ретикулі.

Результати наших досліджень свідчать про те, що всі протестовані нейрони мозочка карася на дію на них  $\text{La}^{3+}$  у досить низьких концентраціях відповідали істотним підвищенням базального рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , тоді як часові параметри кальцієвого транзєнта як такого змінювалися мало. Цей факт підтверджує, що РМСА присутня в цитоплазматичній мембрані і демонструє значну активність. Ми встановили, що вказана транспортна система ефективно забезпечує очищення цитоплазми від надлишкового  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки при виключенні роботи РМСА-помпи за допомогою її блокатора  $\text{La}^{3+}$  базальний рівень кальцієвих транзєнтів збільшувався приблизно на третину відносно їх контрольної величини. Робота цієї помпи практично не залежала від тривалості тест-деполяризації. Виявилось, що інша система очищення цитоплазми від надлишкового  $\text{Ca}^{2+}$  – NCX – також представлена в плазматичній мембрані нейронів мозочка карася. При виключенні роботи NCX за допомогою специфічного щодо такого обмінника фактора – іонів  $\text{Li}^+$  – базальний рівень  $\text{Ca}^{2+}$ , від якого починалося формування кальцієвих транзєнтів, збільшувався більш ніж на 36 % відносно його контрольної величини. Робота даної транспортної системи також не залежала від тривалості депполяризації.

Отримані нами результати дають підстави вважати, що функціонування РМСА та NCX у нейронах мозочка карася істотно впливає на внутрішньоклітинний кальцієвий обмін, забезпечуючи підтримання адекватного базального рівня  $\text{Ca}^{2+}$  у цих нейронах.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. E. Bickler, "Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms," *J. Exp. Biol.*, **207**, 3243-3249 (2004).
2. P. E. Bickler and L. T. Buck, "Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability," *Annu. Rev. Physiol.*, **69**, 145-170 (2007).
3. R. I. Stanika, P. G. Kostyuk, and E. A. Lukyanetz, "Studies of action of hypoxia on calcium homeostasis in sensory neurons of rats," *Фізіол. журн.*, **48**, 15-16 (2002).
4. E. A. Lukyanetz, V. M. Shkryl, and P. G. Kostyuk, "Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal neurons," *Biochim. Biophys. Acta*, **1618**, 33-38 (2003).
5. R. DiPolo and L. Beauge, "Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions," *Physiol. Rev.*, **86**, 155-203 (2006).
6. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. Brady, and D. L. Price, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Acad. Press, New York (2005).
7. S. P. Yu and D. W. Choi, "Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate," *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 1273-1281 (1997).
8. E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, et al., "Generation, control, and processing of cellular calcium signals," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 107-260 (2001).
9. L. Kiedrowski, G. Brooker, E. Costa, et al., "Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient," *Neuron*, **12**, 295-300 (1994).
10. R. Kraft, "The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 230-236 (2007).
11. G. D. Mironova, A. E. Negoda, B. S. Marinov, et al., "Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR)," *J. Biol. Chem.*, **279**, 32562-32568 (2004).
12. M. L. Di Paolo, M. Lunelli, M. Scarpa, et al., "Phosphonium compounds as new and specific inhibitors of bovine serum amine oxidase," *Biochem. J.*, **384**, 551-558 (2004).
13. P. Castaldo, M. Cataldi, S. Magi, et al., "Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases," *Prog. Neurobiol.*, **87**, 58-79 (2009).
14. M. Crompton, M. Kunzi, and E. Carafoli, "The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier," *Eur. J. Biochem.*, **79**, 549-558 (1977).
15. L. Annunziato, G. Pignataro, and G. F. Di Renzo, "Pharmacology of brain Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives," *Pharmacol. Rev.*, **56**, 633-654 (2004).
16. H. Shimizu, M. L. Borin, and M. P. Blaustein, "Use of La<sup>3+</sup> to distinguish activity of the plasmalemmal Ca<sup>2+</sup> pump from Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in arterial myocytes," *Cell Calcium*, **21**, 31-41 (1997).
17. А. И. Карамян, *Методологические основы эволюционной нейрофизиологии*, Наука, Ленинград (1949).
18. G. E. Nilsson and P. L. Lutz, "Anoxia tolerant brains," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **24**, 475-486 (2004).
19. M. Brini, "Plasma membrane Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role," *Pflügers Arch.*, **457**, 657-664 (2009).
20. J. Lytton, "Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport," *Biochem. J.*, **406**, 365-382 (2007).
21. M. Patterson, J. Sneyd, and D. D. Friel, "Depolarization-induced calcium responses in sympathetic neurons: relative contributions from Ca<sup>2+</sup> entry, extrusion, ER/mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and release, and Ca<sup>2+</sup> buffering," *J. Gen. Physiol.*, **129**, 29-56 (2007).