

П.Г. Костюк, Р.І. Станіка, Л.М. Коваль, О.О. Лук'янець

Внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз сенсорних нейронів при гіпоксичних впливах

Описується вплив гіпоксичного середовища (10 – 40 мм рт. ст.) на цитозольний вміст іонів Ca^{2+} в сенсорних нейронах щурів. Вміст парціального тиску кисню (pO_2) вимірювався методом полярографії біля зовнішньої поверхні клітини, а просторові зміни вмісту Ca^{2+} в цитозолі – через сканування клітини за допомогою кальцієвого індикатора фура-2АМ з використанням електромагнітної оптики. Гіпоксія викликала істотне підвищення внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} вже через декілька секунд після початку впливу, причому ефект був значно більшим у центрі клітини, ніж в її периферичних ділянках. Викликаний гіпоксією ефект майже повністю усувався блокуванням потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу або усуненням іонів Ca^{2+} з позаклітинного середовища. Заміна в останньому іонів Na^+ на Li^+ також зменшувала гіпоксичний ефект, однак менш значно. Мітохондріальний протоніфор СССР, що усуває викид Ca^{2+} з цих структур, також послаблював гіпоксичний ефект. Отримані результати дозволяють припустити, що початковими сенсорами гіпоксичного впливу на досліджуванні нейрони є потенціалкервані натрієві та кальцієві іонні канали плазматичної мембрани, зміни активності яких викликають вторинні порушення функції інших механізмів як плазматичної мембрани, так і мітохондрій.

ВСТУП

Зниження парціального тиску кисню (pO_2) в позаклітинному середовищі є одним з основних чинників, що виникають при мозковій патології, пов'язаної з порушенням мозкового кровообігу (ішемією). Таке зниження pO_2 супроводжується комплексом системних процесів, з яких одним з найбільш істотних є масивне вивільнення збуджувального синаптичного медіатора (глутамату) і відповідно викликана ним глибока деполяризація нервових клітин, що призводить практично до виключення їхньої активності. Механізмам цієї системної реакції присвячена значна кількість експериментальних досліджень [1, 11, 18]. Самим істотним компонентом її є масивний вхід іонів Ca^{2+} в нейрони через лігандактивовані канали. Разом з тим природа безпосередньої дії гіпоксії на нейрон менше

вивчена, хоча її з'ясування має першочергове значення для розуміння основ пошкоджувальної дії гіпоксії. Тому нами було проведено докладне дослідження тих первинних змін, що безпосередньо виникають у нейроні при зміні нормоксичного зовнішнього середовища на гіпоксичне (10 – 40 мм рт. ст.). Для усунення можливих міжклітинних взаємодій дослідження проводили на сенсорних нейронах щурів. Оскільки порушення кальцієвого гомеостазу є найбільш імовірним компонентом таких змін, нами було використане пряме визначення змін вмісту вільних іонів Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) у нейроні за допомогою введення в нього флуоресцентного кальцієвого індикатора фура-2АМ. Рівень pO_2 біля зовнішньої поверхні клітини безупинно вимірювався полярографічно за допомогою платиновіого мікроелектрода [7, 12]. Для виз-

начення змін просторового розподілу кальцію в середовищі клітини та можливої участі внутрішньоклітинних кальційакумуючих структур (мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума) ми використали систему оптичного сканування досліджуваної клітини за допомогою використання електромагнітної оптики. Таке сканування дозволяло порівнювати локальні зміни кальцієвих сигналів у ділянках клітини близько 3 мкм (10 % від загального її обсягу).

Ефект гіпоксії на внутрішньоклітинний Ca^{2+} . Проведені виміри показали, що зміна нормоксичного зовнішнього середовища клітини на гіпоксичне в усіх нейронах, що досліджувалися, призводила до істотного підвищення вмісту іонів Ca^{2+} в їхньому цитозолі (рис. 1). Така реакція розвивалася за декілька секунд і становила від 70 до 130 % базального рівня цих іонів. Цікаво відзначити деякі особливості такого підвищення, що виявляються при скануванні клітин – воно в усіх випадках було більш істотним у центрі клітини, ніж в навколосередовищних її ділянках. Кількісні характеристики підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відрізнялися і в клітинах з різним діаметром соми: у більших клітинах (сенсорні нейрони групи А β , що проводять імпульсацію від низькопорогових механорецепторів і проприоцепторів) воно було меншим, ніж у клітинах малого розміру (сенсорні нейрони групи А δ або С, що проводять в основному ноцицептивну імпульсацію). В центрі малих нейронів підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сягало 400 нмоль/л \pm 60 нмоль/л (порівняно з 170 нмоль/л \pm 10 нмоль/л до впливу гіпоксії), а в центрі більших нейронів – 300 нмоль/л \pm 27 нмоль/л. У більшості випадків описані зміни були зворотними, і після переходу клітини в нормоксичне середовище вміст Ca^{2+} у цитозолі через декілька хвилин повертався до початкового рівня. Однак у деяких випадках ефект був незворотним –

незважаючи на вихід із гіпоксії, цитозольний вміст Ca^{2+} продовжував підвищуватися, і незабаром наставала загибель клітини.

Отримані результати підтверджують припущення про те, що первинною прямою реакцією нервової клітини на гіпоксію є саме порушення її Ca^{2+} -гомеостазу; цей факт спонукає поставити наступне основне питання: які молекулярні процеси в клітині можуть бути тими сенсорами, що призводять до індукованого гіпоксією порушення. Серед можливих “кандидатів” на такі сенсори можуть бути безпосередньо кальцієві канали плазматичної мембрани, іонні обмінники і транспортери в цій мембрані (що за фізіологічних умов виносять іони Ca^{2+} з клітини і завдяки цьому забезпечують дуже низький вміст цих іонів у цитозолі), а також внутрішньоклітинні Ca^{2+} -акумуючі структури, що забезпечують також ефективне поглинання вільних іонів Ca^{2+} з цитоплазми. Мітохондрії в цьому відношенні представляють особливий інтерес, бо дані деяких досліджень свідчать, що ці структури є надзвичайно ефективними іонообмінниками, котрі відіграють важливу роль у модуляції амплітудних і часових характеристик внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів [6, 17, 19].

Початкове джерело іонів Ca^{2+} .

Експериментальним підходом для відповіді на ці питання є встановлення первинного джерела іонів Ca^{2+} , що наповнюють клітину за гіпоксичних умов. Найпростішим методичним підходом для такої відповіді є порівняння дії гіпоксії за наявності або відсутності цих іонів у позаклітинному середовищі – при заміщенні позаклітинного фізіологічного розчину на розчин, що не містив Ca^{2+} . Таке порівняння показало, що в середовищі з істотно зниженим вмістом іонів Ca^{2+} гіпоксичне підвищення внутрішньоклітинного рівня цих іонів різко знижується, становлячи всьо-

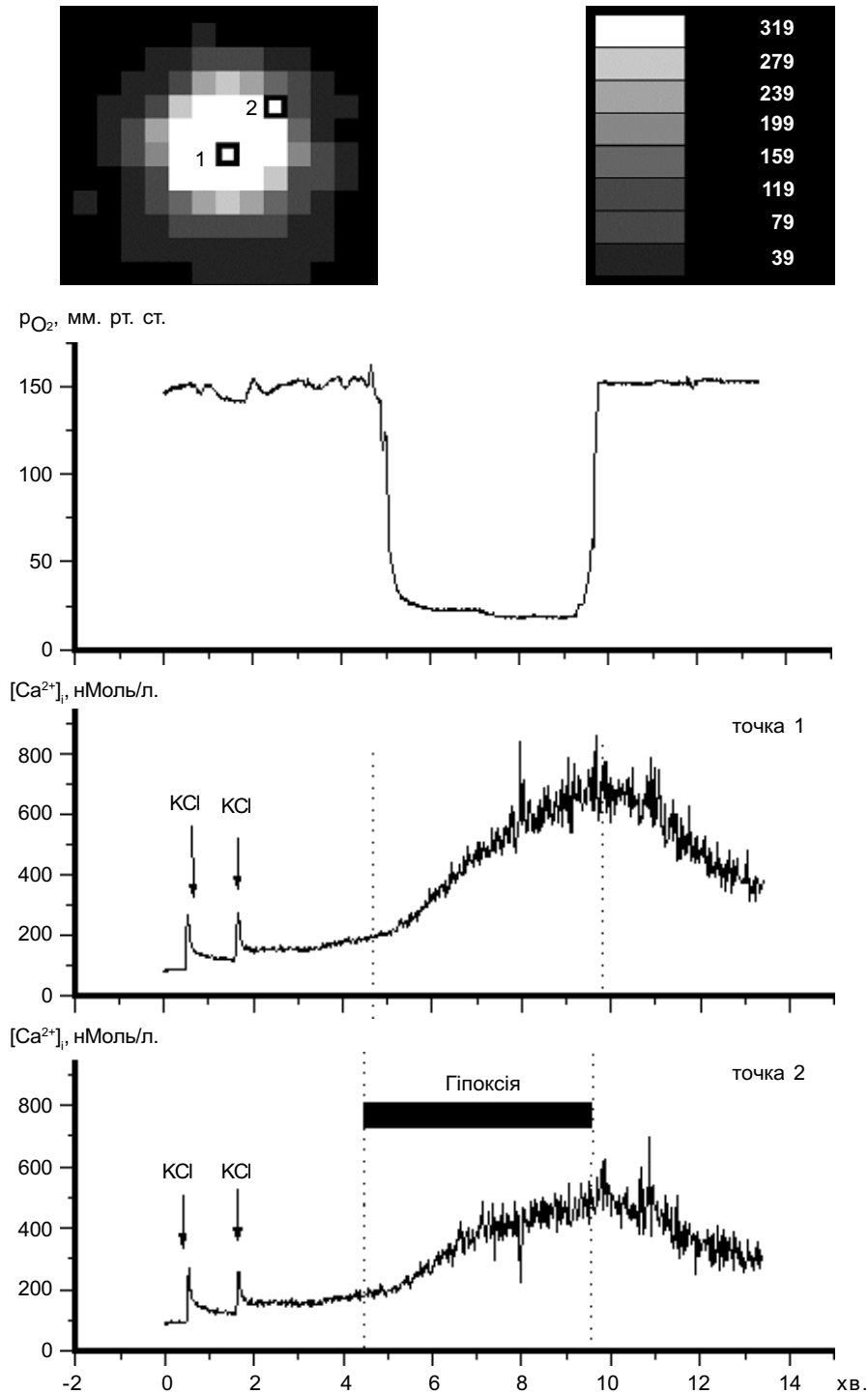


Рис. 1. Зміни внутрішньоклітинної концентрації вільного Ca^{2+} в ізолюваному первинному сенсорному нейроні щура. Зображення нейрона, на якому позначені вимірювані точки і відповідна шкала кількості зареєстрованих фотонів (верхня частина рисунка), полярографічна крива, що відображає виміри парціального тиску кисню в розчині та нижні дві криві, що показують відповідні зміни Ca^{2+} у зазначених вище також 1 (верхня крива) і 2 (нижня крива). Стрілками позначено аплікації 50 ммоль/л KCl . Часові шкали однакові для всіх графіків.

го 25 ± 6 і $19 \% \pm 4 \%$ у центрі і на периферії малих нейронів і, відповідно, 17 ± 10 і $11 \% \pm 8 \%$ в центрі і на периферії великих нейронів. Таким чином, надходження іонів з позаклітинного середовища справді є домінуючим чинником у виявленому гіпоксичному ефекті, хоча деяку частку його можуть складати і внутрішньоклітинні джерела іонів Ca^{2+} . Відповідно наступним етапом аналізу було визначення можливих шляхів надходження цих іонів в клітину через її поверхневу мембрану.

Потенціалкеровані кальцієві канали

Найбільш ефективним шляхом такого надходження можуть бути потенціалкеровані кальцієві канали плазмалемі. Тому нами було проведене порівняння описаних вище гіпоксичних ефектів до і після додавання специфічних блокаторів таких каналів. Оскільки в сенсорних нейронах домінуючими типом кальцієвими каналами є канали L-типу, як блокатор ми використали ніфедипін у концентрації 10 мкмоль/л. Його додання майже повністю відвертало індуковане гіпоксією підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яке знижувалося до $13,3 \pm 3$ і $10 \% \pm 3 \%$ у великих і малих нейронів відповідно. Отримані результати підтверджують попередній висновок про те, що вхід Ca^{2+} з позаклітинної середовища є визначальним у генерації описаного ефекту гіпоксії, і кальцієві канали плазмалемі можуть бути основним шляхом такого входу.

Плазмалемальний Na^+ – Ca^{2+} -обмінник

За фізіологічних умов іонообмінний механізм виводить іони Ca^{2+} з клітини в обмін на надходження всередину клітини двох іонів Na^+ , трансмембранний градієнт яких є рушійною силою для такого обміну. Однак за певних умов можливо реверсування цього обмінного механізму, при якому він стає переносником Ca^{2+} з зовнішнього середовища всередину клітини. Такою умовою може бути істотне підвищення внутрішньоклітинного вмісту іонів Na^+ , при якому градієнт цих іонів уже

не може бути рушійною силою для виведення Ca^{2+} з клітини. Для визначення такої можливості за умов гіпоксії можна замінити іони Na^+ в позаклітинному середовищі на інші одновалентні іони – Li^+ або холіну. Іони Li^+ проникають через потенціалкеровані натрієві канали, однак вони не можуть замінити іони Na^+ в іонному обміннику; іони холіну взагалі не проникають через ці канали. При заміщенні Na^+ на Li^+ відзначено невелике, але статистично вірогідне зниження гіпоксичного ефекту – підвищення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} зменшувалося у середньому до $11 \% \pm 15 \%$ у центрі клітин і до $76 \% \pm 10 \%$ в їхньому примембранному просторі. Отже, деяку роль у такому гіпоксичному підвищенні може відіграти і реверсія іонотранспортної функції плазмалемального іонообмінника. При заміщенні позаклітинного Na^+ на холін зниження гіпоксичного ефекту було менш істотним.

Участь мітохондрій

Вище було висловлено припущення про те, що висока ефективність захоплення іонів Ca^{2+} з цитоплазми мітохондріями завдяки наявності на їхній внутрішній мембрані високої трансмембранної різниці потенціалів і механізму уніпортерного переносу їх всередину органел під впливом значного електрохімічного градієнта на цій мембрані, в поєднанні з механізмами затриманого викиду Ca^{2+} назад у цитоплазму, також можуть бути задіяні в описаних гіпоксичних ефектах. Тому нами було досліджено зміни останніх у разі виключення цієї функції мітохондрій сполучкою, що проникає в клітину протонофора СССР (карбоніл-ціанід m-хлоро-феніл-гідразону) в концентрації 10 мкмоль/л. При цьому відзначалося досить значне зниження амплітуди викликаного гіпоксією підвищення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} , більш виражене на периферії клітин. Воно становило $45 \% \pm 5 \%$ в

центрі клітин і всього $17\% \pm 6\%$ в їхньому навколосмембранному просторі. Отримані результати свідчать, що Ca^{2+} -обмінна функція мітохондрій задіяна у вираженні гіпоксичного ефекту. Можна припустити, що мітохондрії ефективно поглинають ці іони після їхнього надходження в клітину через поверхневу мембрану і потім з часовою затримкою вертають їх назад у цитозоль за допомогою іонного обміну, подовжуючи завдяки цьому часове проходження згаданих транзієнтів. За умов гіпоксії така абсорбція, очевидно, ускладнюється в зв'язку з характерним для цих умов зниженням різниці потенціалів на внутрішній мітохондріальній мембрані і відповідним ослабленням уніпортерного захоплення іонів мітохондріями.

Викликає особливий інтерес відзначена вище різниця ефектів у центрі клітини і її примембранному просторі. Причиною такої відмінності можуть бути виявлені особливості локалізації мітохондрій у первинних сенсорних нейронах – як показали наші електронно-мікроскопічні дослідження, вони розташовуються щільним шаром саме в примембранному просторі (рис.2) і тому відразу ефективно поглинають саме іони Ca^{2+} , що надходять через плазмалемальні канали. Тому при виключенні їхньої Ca^{2+} -акумуляуючої функції тут практично в усіх клітинах не відзначається підвищення цитозольного вмісту цих іонів.

ОБГОВОРЕННЯ

Наведені вище експериментальні результати дозволяють розглядати саме кальцієві канали плазматичної мембрани як основне джерело викликаного гіпоксією надходження іонів Ca^{2+} в цитоплазму нервової клітини. Цей висновок ставить наступне фундаментальне питання – що саме є безпосереднім сенсором нестачі кисню? Чи можуть ними бути молекулярні струк-

тури самих кальцієвих іонних каналів, або ж активація останніх є опосередкованою процесами в інших молекулярних структурах клітинної мембрани. Точну відповідь на це питання зараз дати не можна, і воно вимагає подальших досліджень на молекулярному рівні. Раніше припускалося, що потенціалкервані кальцієві канали можуть бути такими сенсорами, і описаний гіпоксичний ефект зумовлений їх активацією внаслідок деполяризації мембрани, викликаній іншими причинами, найбільш певним пригніченням калієвих каналів, активність яких підтримує високий рівень потенціалу мембрани. Такий механізм детально досліджений у рецепторних зонах стінки судинного русла – дуги аорти і каротидних синусів. Однак у деяких недавніх роботах показана можливість прямого збільшення ймовірності відкритого стану кальцієвих каналів

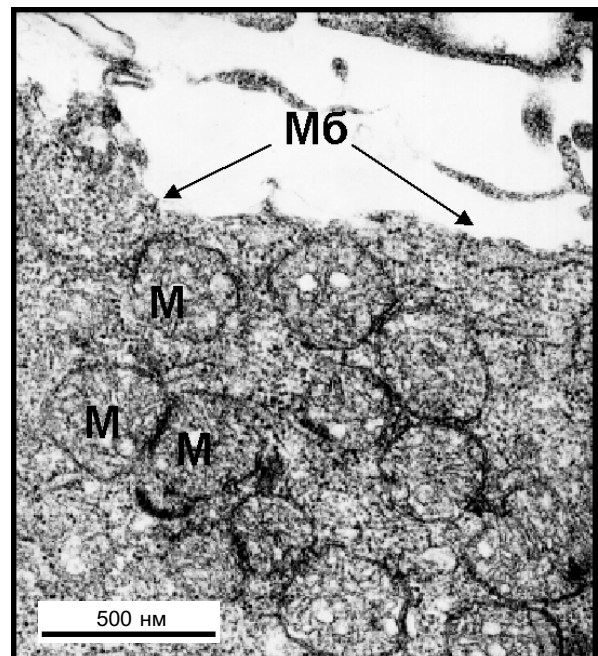


Рис.2. Локалізація мітохондрій у сенсорних нейронах.

Показано фрагмент клітини. М – мітохондрії, Мб – цитоплазматична мембрана. Розмір шкали 500 нм.

L-типу за гіпоксичних умов – наприклад у нейронах дихального центру довгастого мозку [9], що може забезпечити швидку його реакцію на нестачу кисню в крові. Однак у попередніх дослідженнях на сенсорних нейронах задньокорінцевих гангліїв [15] не відзначено підсилення активності високопорогових кальцієвих каналів при зниженні оксигенації позаклітинного розчину; більше того, в деякому відсотку клітин відбувалося навіть зниження їхньої активності. В зв'язку з такою розбіжністю даних важливо відзначити виявлену нами залежність розвитку гіпоксичного підсилення активності кальцієвих каналів від базового внутрішньоклітинного вмісту іонів Ca^{2+} [13, 14]. На нейронах гіпокампа було відмічено істотну потенціацію гіпоксичного впливу на кальцієві канали за умов, коли цей вміст штучно підвищувався [13]. Цей ефект може бути пояснено зниженням фонового пригнічення таких каналів або їхнього по-

тенціювання за допомогою кальційзалежного фосфорилування каналної молекули, що підвищує ймовірність відкритого стану каналу [5, 8, 10, 16].

Разом з тим опосередкована активація надходження Ca^{2+} в клітини може бути додатковим сенсорним механізмом гіпоксії. Нещодавно показано істотний потенціуючий вплив гіпоксії на “стійкий” компонент натрієвих струмів, створюваних ГТХ-чутливими натрієвими каналами [3, 4]. Викликаний посилений вхід іонів Na^+ всередину клітини може зумовити реверсування роботи $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника і додатковий вхід Ca^{2+} в цитоплазму клітини. З іншого боку, як свідчать результати нашої роботи, усунення Na^+ з позаклітинного середовища через заміну на Li^+ помітно пригнічувало гіпоксичне підвищення вмісту внутрішньоклітинного кальцію.

Накопичування Na^+ в цитозолі може також бути причиною зазначеного нами втягнення мітохондрій у формування гі-

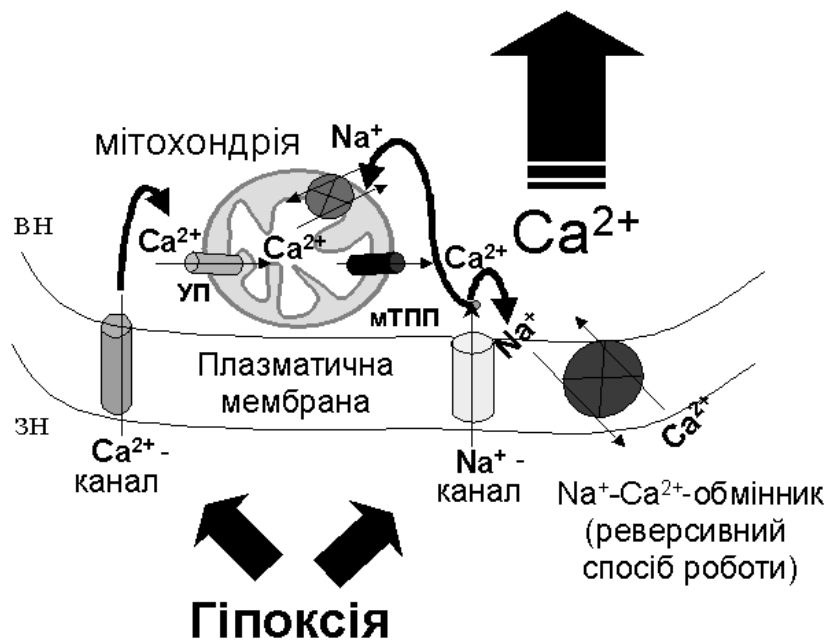


Рис.3. Схема дії гіпоксії на сенсорний нейрон: вн - внутрішній бік мембрани; зн – зовнішній бік мембрани; уп – уніпортер; МТПП – мітохондріальна пора перехідної проникності.

поксичного підвищення вмісту внутрішньоклітинного кальцію через активацію мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника і відповідного викиду Ca^{2+} , накопиченого в мітохондріях. Такий процес був раніше описаний при дії гіпоксії на нейрони гіпокампа [20]. Оскільки іони Li^+ можуть частково заміщати натрій у мітохондріальному обміннику [2], то можна зрозуміти збереження деякої участі мітохондрій у ефекті, який розглядали при заміні позаклітинного Na^+ на Li^+ і відсутність його при заміні на холін, що не проникає через мембрану всередину клітини. Така роль мітохондрій може призвести до парадоксального ефекту – зменшення можливості переваження клітини кальцієм у випадку виключення Ca^{2+} -акумуляуючої функції мітохондрій під дією протонофора (СССР або ФССР). Природно, що цей ефект можливий лише на початку дії гіпоксії. При її продовженні настають незворотні порушення Ca^{2+} -гомеостазу в зв'язку з порушенням енергетичного балансу клітини і відповідного пригнічення механізмів активного виведення цих іонів з клітини в зовнішнє середовище або їх захоплення ендоплазматичним ретикуломом. Основні первинні мішені дії гіпоксії та подальші вторинні зміни Ca^{2+} -гомеостазу представлено на рис.3.

Автори висловлюють вдячність С.І. Кабанченко за розробку програмного забезпечення керуючого роботою дисектора, С. В. Врублевському за розробку та виготовлення пристроїв для зміни оптичних фільтрів і О.В. Кравчук за приготування клітинних препаратів. Ця робота була частково підтримана грантом INTAS 99-01915.

P.G. Kostyuk, R.I. Stanika, L.M. Koval, E.A. Lukyanetz

INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS OF SENSORY NEURONS AT HYPOXIC INFLUENCES

Hypoxia is the main reason leading to neuronal death during different forms of brain diseases. The main phenomenon observed at hypoxia is excessive growth of intraneuronal Ca^{2+} concentration leading to irreversible cell damage. Despite extensive studies of this process, the intracellular mechanisms

responsible for disturbance in Ca^{2+} are still unclear. The aim of present investigations was to explore these mechanisms. Ca^{2+} was measured by spatial screening of isolated dorsal root ganglion (sensory) neurons loaded with fluorescent dye Fura-2AM after exposing them hypoxic solution. Hypoxia resulted in a reversible elevation of Ca^{2+} , which could be partly prevented by several pharmacological agents. We concluded that in sensory neurons hypoxia-induced elevation of cytosolic Ca^{2+} is induced by primary changes in ionic channels and secondary in function of mitochondria.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine;
International Center for Molecular Physiology, Kiev,
Ukraine*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Budd S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation // *Pharmacol. Ther.* – 1998. – **80**. – P. 203 – 229.
2. Duarte C.B., Carvalho C.A., Ferreira I.L., Carvalho A.P. Synaptosomal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as influenced by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and K^+ depolarization // *Cell Calcium* – 1991. – **12**. – P. 623 – 633.
3. Hammarstrom A.K., Gage P.W. Hypoxia and persistent sodium current // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – **31**. – P. 323 – 330.
4. Konovalov A.A., Lukyanetz E.A. Activity of sodium voltage-operated currents of cortical neurones during hypoxia. *Neurophysiology. (Kiev)* 1998. **30**. P. 312 – 315.
5. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. Effects of serotonin and cAMP on calcium currents in different neurones of *Helix pomatia*. *Pflug. Arch.* 1992. **420**. P. 9 - 15.
6. Kostyuk P.G., Shmigol A.V. Intracellular stores and calcium signalling in mammalian sensory neurones // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1997. – **42**. – P. 197 – 205.
7. Lukyanetz E.A., Shkryl V.M. Scientific and technological aspects of oxygen-sensitive electrodes for measurements of oxygen partial pressure in patch-clamp experiments. *J. Biochem. and Biophys. Methods* – 2003. **55**. P. 37 – 52.
8. Lukyanetz E.A., Sotkis A.V., Kostyuk P.G. Mechanisms of up-regulation of single calcium channels by serotonin in *Helix pomatia* neurones. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 2002. **293**. P. 132 – 138.
9. Mironov S.L., Richter D.W. L-type Ca^{2+} channels in inspiratory neurones of mice and their modulation by hypoxia // *J. Physiol.* – 1998. – **512** (Pt 1). – P. 75 – 87.
10. Mironov S.L., Richter D.W. Hypoxic modulation of L-type Ca^{2+} channels in inspiratory brainstem neurones: intracellular signalling pathways and metabotropic glutamate receptors // *Brain Res.* – 2000. – **869**. – P. 166 – 177.
11. Orrenius S., Ankarcrona M., Nicotera P. Mechanisms of calcium-related cell death // *Adv. Neurol.* – 1996. – **71**. – P. 137 – 149.

12. Shkryl V.M., Lukyanetz E.A. Properties of oxygen-sensitive electrodes using in patch-clamp experiments on nerve cells· Neurophysiology. (Kiev) 1998. **30**. P. 279 – 283.
13. Shkryl V.M., Kostyuk P.G.,Lukyanetz E.A. Dual action of cytosolic calcium on calcium channel activity during hypoxia in hippocampal neurones· Neuroreport. 2001. **12**. P. 4035 - 4039.
14. Shkryl V.M., Nikolaenko L.M., Kostyuk P.G.,Lukyanetz E.A. High-threshold calcium channel activity in rat hippocampal neurones during hypoxia· Brain Res. 1999. **833**. P. 319 - 328.
15. Solovyova N.A., Kostyuk P.G. Effects of nitric oxide and hypoxia on low- and high-voltage activated calcium currents in murine DRG neurons // Neurophysiology.(Kiev)–1999. – **31**. – P. 69 – 72.
16. Summers B.A., Overholt J.L.,Prabhakar N.R. Augmentation of calcium current by hypoxia in carotid body glomus cells // Adv.Exp.Med.Biol. – 2000. – **475**. – P. 589 – 599.
17. Thayer S.A., Miller R.J. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro // J.Physiol – 1990. – **425**. – P. 85 – 115.
18. Vergun O., Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V. et al. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture // Ibid – 2001. – **531**. – P. 147 – 163.
19. Werth J.L., Thayer S.A. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons // J.Neurosci. – 1994. – **14**. – P. 348 – 356.
20. Zhang Y., Lipton P. Cytosolic Ca²⁺ changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na⁺-dependent Ca²⁺ release from mitochondria // Ibid. – 1999. – **19**. – P. 3307 – 3315.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України;
Міжнар.центр молекуляр.фізіології НАН України, Київ*