

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

Участь Ca^{2+} -АТФази в кальцієвому гомеостазі нейронів мозочка карася

В наших дослідженнях була вивчена участь Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулула (*SERCA*, від англ. *sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), як окремого внутрішньоклітинного компонента-учасника кальцієвого гомеостазу нейронів мозочка гіпоксіє-толерантного виду риби – карася *Carassius gibelio*. Для цього використовувалися відповідні фармакологічні інструменти – блокатори цього компонента – циклопіазонова кислота та тапсигаргін. Внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) визначали за допомогою кальційчутливого барвника *fluo-2/AM* та мікрофлюоресцентного методу вимірювання концентрації вільного Ca^{2+} . Нами встановлено, що нейрони мозочка карася мають добре розвинену систему очищення цитоплазми від надлишкового Ca^{2+} , в якій бере участь *SERCA*. Так, при припиненні роботи останньої за допомогою її селективних блокаторів, амплітуда кальцієвих транзйєнтів і вхід Ca^{2+} в клітину збільшуються на 20–100 % відносно контролю залежно від тривалості деполаризації. Припускається, що *SERCA* нейронів карасів подібно до такої у ссавців суттєво впливає на часові та амплітудні характеристики кальцієвих сигналів у нейронах і відіграє значну роль в очищення цитоплазми від надлишкового Ca^{2+} під час функціональної активності клітини.

Ключові слова: кальцієва АТФаза – (*SERCA*) – ендоплазматичного ретикулула, гіпоксіє-толерантний вид, карась, кальцій, нейрони, мозочок.

ВСТУП

Одним із напрямків сучасних наукових пошуків ефективних засобів лікування патологічних станів, викликаних ішемією–гіпоксією, є вивчення стратегії виживання нейронів гіпоксіє-толерантних тварин [1, 2]. Адаптація до гіпоксичних умов проявляється у конституційній властивості нейронів у аноксіє-толерантних черепахах, жаб і риб, властивості внутрішньоутробного та раннього постнатального розвитку ссавців, а також повільних адаптивних процесах, які спостерігаються при акліматизації організму до високогір'я. Тому важливою частиною пошуку механізмів адаптації до гіпоксії є вивчення особливостей внутрішньоклітинного гомеостазу нейронів гіпоксіє-толерантних тварин.

У клітинному гомеостазі іони кальцію

відіграють подвійну роль у функціонуванні нейронів – з одного боку, Ca^{2+} – внутрішньоклітинним посередником (месенджер), який регулює збудливість нейронів та контролює функціонування синапсів. З іншого боку, за певних умов, Ca^{2+} може викликати реакції, 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, спричинює активацію протеїнкіназ, фосфатаз і протеаз, які порушують внутрішньоклітинний гомеостаз, клітинну цілісність, що призводить до апоптозу або некрозу.

Відомо, що в цитоплазмі клітини в стані спокою концентрація Ca^{2+} становить усього 50–100 нмоль/л, тоді як у позаклітинному середовищі – близько 2 ммоль/л. Однією із

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

важливих клітинних структур у підтриманні кальцієвого гомеостазу є ендоплазматичний ретикулум (ЕР). Поглинання кальцію з цитоплазми ЕР і підтримання дуже високого градієнта концентрацій Ca^{2+} між люменами ЕР $[\text{Ca}^{2+}]_L$ і цитоплазмою забезпечується роботою відповідної енергозалежної саркоендоплазматичної транспортної АТФази (помпи) – SERCA (від англ. sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Важливою особливістю SERCA є висока залежність швидкості транспорту іонів кальцію від їх концентрації в ЕР: зниження $[\text{Ca}^{2+}]_L$ різко підвищує швидкість накопичення кальцію в ЕР.

Завдяки своїм властивостям ЕР суттєво впливає на часові та амплітудні характеристики кальцієвих сигналів у нейронах [7, 20]. Так, було встановлено роль ЕР як координатора між- і внутрішньоклітинних сигналів з довготривалими адаптивними відповідями. ЕР також було ідентифіковано як джерела швидкої фізіологічної сигналізації – динамічне кальцієве депо, яке активується в результаті електричної [5] або хімічної [14] стимуляції клітини. Встановлено також, що ЕР має важливе значення в розповсюдженні цитозольних кальцієвих хвиль [4], а також в його здатності функціонувати як внутрішньоклітинний кальцієвий тунель [13]. Іони кальцію є молекулами-посередниками, які інтегрують різноманітні сигнали в ЕР. У межах структури кальцієвого каскаду ЕР є швидким обмінником запасу іонів кальцію, що здатен вивільнити їх при відповідній фізіологічній стимуляції. Для того щоб ЕР працював як динамічне кальцієве депо, необхідне підтримання високої концентрації Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_L$ у межах 0,2–2 ммоль/л. У первинних сенсорних нейронах ЕР зберігає у стані спокою значну кількість Ca^{2+} , який може бути відразу вивільнений у разі активації його кальцієвих каналів. У більшості центральних нейронів ЕР постійно не утримує велику кількість іонів кальцію, тому для їх вивільнення із депо потрібні

попередня активація клітини та перезавантаження депо [18].

Специфічним блокатором кальцієвого транспорту SERCA є алкалоїд тапсигаргін, який проходить крізь клітинну мембрану і діє в наномолярних концентраціях. Інші специфічні блокатори Ca^{2+} -АТФаз – це циклопіазонова кислота (в мікромольних концентраціях) і ВНҚ (2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinolone). Зв'язуючись з молекулою Ca^{2+} -АТФази, промотор пухлинного росту тапсигаргін викликає незворотну блокаду ферменту. Циклопіазонова кислота і ВНҚ мають той самий механізм блокування, і є також специфічними саме для SERCA і не впливають на інші АТФази. Неспецифічно SERCA також блокується ортованадатом та іонами фтору.

Метою нашої роботи було вивчення особливостей функціонування ЕР та його структурного компонента SERCA в кальцієвому гомеостазі нейронів мозочка гіпоксієтолерантного виду риб і вивчення пов'язаних з цим особливостей внутрішньоклітинного кальцієвого обміну.

МЕТОДИКА

Досліди виконано на ізольованих нейронах мозочка срібного карася *Carassius gibelio*, виділених з мозку 3-річних риб середньої масою 70 г. Для наркотизації риб використали метод природного газового наркозу, запропонований А.І. Карамьяном (1949) для операцій на головному мозку риб. Витягнута з води риба через декілька хвилин впадає в наркотичний стан. Ми модифікували цей метод, і рибу, підготовлену вищевказаним способом, поміщали в морозильну камеру при $-19\text{ }^\circ\text{C}$ в спеціальній ємкості на 5–10 хв. Після такої процедури риба готова до операції і не робить зайвих рухів. Видалений мозочок одразу занурювали в охолоджений до $+5\text{ }^\circ\text{C}$ розчин DMEM (“Sigma Aldrich”, США) на 7 хв. Далі його розділили на частини, які витримувалися 10 хв у розчині DMEM на льоду. Частини

мозочка піддавали ферментативній обробці розчином, який містив 0,1% протеази (“Sigma Aldrich”, США) та 0,1% трипсину (“Sigma Aldrich”, США) в при $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. Після ферментної обробки частини мозочка відмивали розчином DMEM і подрібнювали на менші фрагменти для подальшого піпетування. Отримані окремі клітини поміщали на покривні скельця. Для завантаження клітин кальційчутливим барвником їх витримували в розчині Тіроде, до складу якого входив флюоресцентний барвник fura-2/AM (“Molecular Probes”, США) в концентрації 5 мкмоль/л, розчинений в диметилсульфоксиді (DMSO) з додаванням детергенту плюронік F-127 (0,02 %). Завантаження клітин барвником здійснювали протягом 30 хв при кімнатній температурі ($+22\text{ }^{\circ}\text{C}$) без світла. Після цієї процедури клітини інкубували 30–40 хв у розчині Тіроде для забезпечення повної деестерифікації барвника.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ вимірювали методом мікрофлюоресцентного аналізу з застосуванням флюоресцентного зонда fura-2/AM. Цей барвник поперемінно збуджували ультрафіолетовими хвилями світла двох довжин: 360 та 390 нм за допомогою монохроматора. Для реєстрації кальцієвих транзєнтів під час експерименту використовували CCD-камеру Imago-QE (“Till Photonics”, ФРН). Сигнали з CCD-камери подавали на комп’ютер, за допомогою якого вимірювали відношення флюоресцентних сигналів на двох довжинах хвиль $R = \lambda_1/\lambda_2$ (це відношення адекватно відображає зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Для запису та обробки результатів використовували програму “TillVision”, ФРН. Всі чисельні значення наведено у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка (SE).

Склад розчинників DMEM та Тіроде був таким (ммоль/л): NaCl – 125, CaCl – 2, KCl – 2,5, MgCl – 1, HEPES – 20, глюкози – 10 (рН 7,4). Як специфічний блокатор кальцієвого транспорту для Ca^{2+} -АТФаз використовували циклопіазонову кислоту

(“Sigma-Aldrich”, США) в концентрації 20 мкмоль/л та 10 нмоль/л тапсигаргїну (“Sigma-Aldrich”, США). Всі дослїди проводили при кімнатній температурі. Статистичну обробку виконували використовуючи програмне забезпечення OriginPro 8.0. Рівень достовірності визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA), відмінності вважалися достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Для вивчення ролі SERCA досліджувалися кальцієві транзєнти, викликані деполяризацією мембрани нейронів мозочка. Використовувалися клітини із чітко окресленою мембраною, без пошкоджень і видимих внутрішньоклітинних компонентів. Деполяризація плазматичної мембрани викликала аплїкацією розчину з підвищеною концентрацією K^+ (50 ммоль/л). У відповідь на деполяризацію мембрани нейронів мозочка карася гіперкалієвим розчином швидко підвищувалося значення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, після чого відбувалося швидке експоненціальне його зниження до норми. Для тестування життєздатності клітин і відтворюваності відповідей ми використовували вплив гіперкалієвого розчину протягом 5 с. Амплїтуда кальцієвих транзєнтів у відповідь на деполяризацію мембрани була стабільною та стійкою упродовж усього періоду експерименту (25–30 хв). При цьому амплїтуди та кінетичні показники кальцієвих транзєнтів на початку експерименту та на його 25-й хвилині мали подібні значення, що вказувало на нормальну життєдіяльність клітини під час дослідження.

У подальших дослїдах ми вимірювали амплїтуду і форму кальцієвих транзєнтів у контрольних умовах, в яких викликали деполяризацію мембрани, використовуючи різні часові відрізки впливу гіперкалієвого розчину під час кожної аплїкації тривалїстю

1, 3, 5 та 10 с (рис. 1, ліворуч). Як показали вимірювання, амплітуда кальцієвих транз'єнтів при всіх значеннях часових інтервалів стимуляції в контролі була однаковою або трохи збільшувалася при тривалих деполяризаціях. Проте час повернення концентрації Ca^{2+} до базального рівня та відносна кількість Ca^{2+} , що входив у клітину під час деполяризації, зростали зі збільшенням тривалості аплікації гіперкалієвого розчину (див. рис. 1).

Для вивчення внеску Ca^{2+} -АТФази в очищення цитозолу від надлишків іонів кальцію ми використали циклопіазонову кислоту в концентрації 20 мкмоль/л, яка викликає зворотну блокаду активності SERCA. Для вивчення дії циклопіазонової кислоти був застосований такий самий як і в контролі протокол з використанням різних інтервалів часу дії гіперкалієвого розчину – 1, 3, 5 та 10, с відповідно, але за наявності у зовнішньому розчині блокатора (див. рис.1, праворуч). Як показали вимірювання, амплітуда кальцієвих транз'єнтів після блокування роботи SERCA значно підвищувалася для кожного інтервалу часу.

Концентрація Ca^{2+} вимірювалася як $R = \lambda_1 / \lambda_2$ (див. Методика). У наступних експериментах ми використовували протокол, в якому аплікацію KCl здійснювали розчином, що містив циклопіазонову кислоту, і після закінчення аплікації відмивку проводили контрольним розчином. Це було зроблено для усунення загибелі клітин внаслідок їх перевантаження Ca^{2+} . Кількісні вимірювання кальцієвих транз'єнтів викликаних 3 та 5-секундами деполяризаціями показали, що за наявності циклопіазонової кислоти, їх амплітуда збільшувалася відносно контрольних значень на $96,1 \% \pm 0,09 \% (P < 0,01)$ при 3-секундній стимуляції та на $79,7 \% \pm 0,12 \% (P < 0,05)$ при 5-секундній (рис. 2, а, б). Також підвищувалася і відносна кількість Ca^{2+} , що входить до клітини під час деполяризації для кожного випадку і котру визначали як інтегральне значення площі під кожним транз'єнтом, отриманим в експерименті. Площа також збільшувалася відносно контрольних значень, але значно менше – на $47,4 \% \pm 0,05 \% (P < 0,01)$ при 3 с стимуляції та на $23,1 \% \pm 0,04 \% (P < 0,05)$ при 5 с стимуляції (див. рис. 2, в, г).

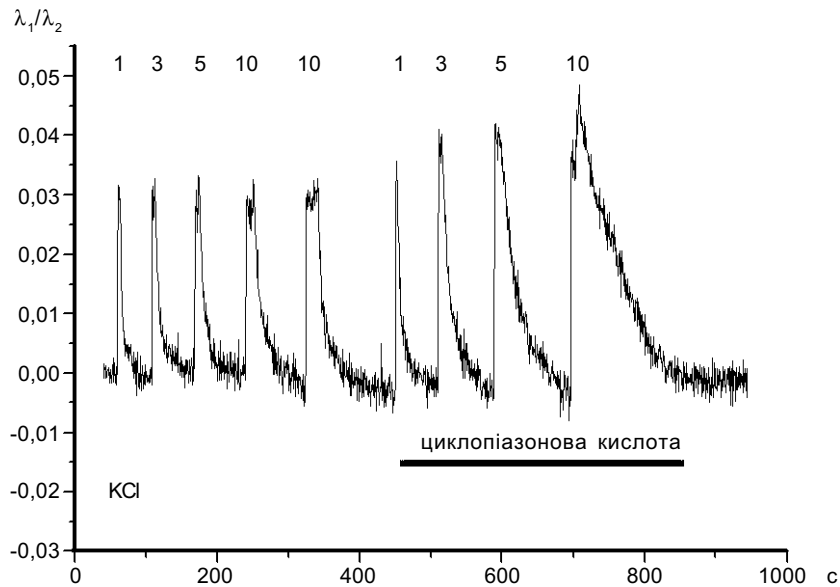


Рис. 1. Зміна амплітуди і форми кальцієвих транз'єнтів, викликаних аплікаціями 50 ммоль/л KCl різної тривалості 1, 3, 5, 10 с (позначено біля піків). Вимірювання проведені у контролі і за наявності в омиваючому розчині блокатора SERCA (20 мкмоль/л циклопіазонової кислоти)

Іншим шляхом визначення участі SERCA було застосування селективного блокатора цього ферменту. В наших експериментах ми використовували специфічний блокатор кальцієвої SERCA – тапсигаргін у концентрації 20 нмоль/л, який викликає незворотну блокаду SERCA. Для вивчення дії тапсигаргину був застосований такий самий як і в попередньому випадку протокол експерименту з використанням двох інтервалів часу дії деполяризації мембрани за допомогою гіперкалієвого розчину – 3 та 5 с відповідно (рис. 3). Амплітуда кальцієвих транзєнтів збільшувалася відносно контрольних значень на $71,4\% \pm 0,09\%$ ($P < 0,01$) при 3 с стимуляції та на $56,3\% \pm 0,1\%$ ($P < 0,05$) при 5 с стимуляції (див. рис. 3,а,б). На рис. 3,в,г представлені значення площі під кожним транзєнтом, отриманим в експерименті. Видно, що площа також

збільшувалася відносно контрольних значень, як і в першому випадку, значно менше – на $33,6\% \pm 0,11\%$ ($P < 0,05$) при 3 с стимуляції та на $28,3\% \pm 0,04\%$ ($P < 0,05$) при 5 с стимуляції.

Таким чином, отримані результати вказують на активність SERCA в нейронах карася та її суттєвий внесок в кальцієво-сигнальну систему нейронів цих тварин.

ОБГОВОРЕННЯ

У хребетних тварин найбільш чутливою та вразливою до дії ішемії–гіпоксії є нервова система та її основні компоненти – нейрони. Відомо, що в природі існує багато видів хребетних тварин, пристосованих виживати в екстремальних умовах, у тому числі при нестачі кисню – гіпоксії. У тварин такі представники зустрічаються серед тепло-

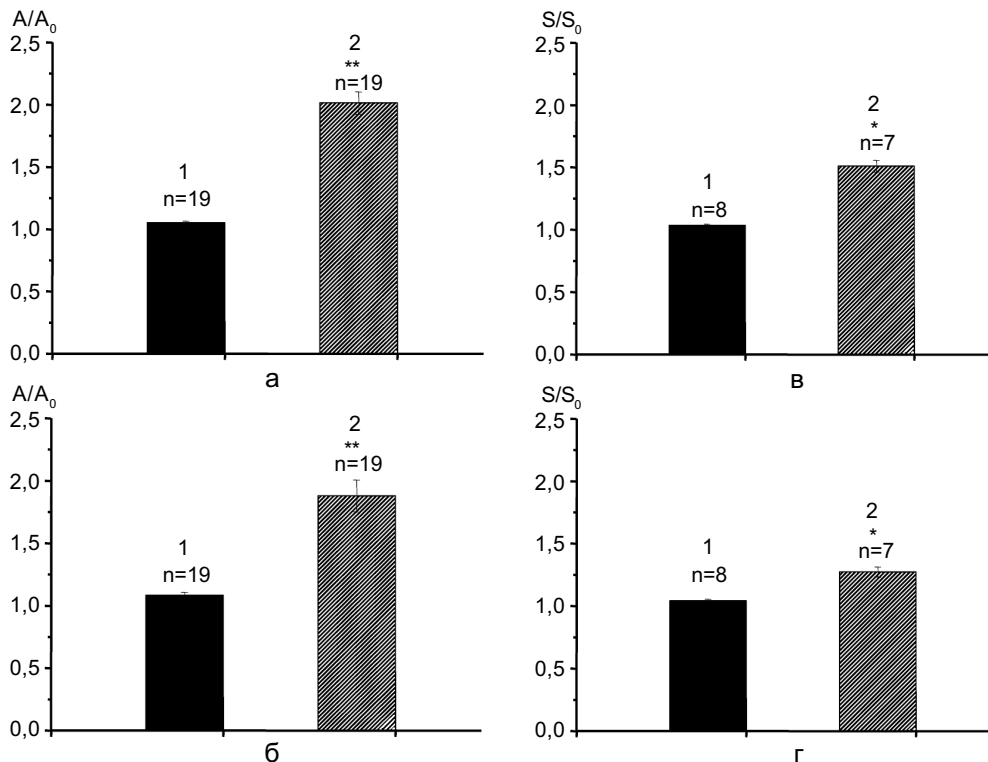


Рис. 2. Кількісна оцінка впливу циклопіазонової кислоти на кальцієві транзєнти викликані деполяризацією мембрани. Відносні зміни амплітуди кальцієвих транзєнтів (A/A_0) викликаних аплікацією KCl тривалістю 3 с (а) та 5 с (б). Зміни кількості Ca^{2+} , що входить в клітину під час деполяризації, представлені як площа кальцієвого транзєнта (S/S_0) при аплікації KCl тривалістю 3 с (в) та 5 с (г). Представлені значення в контролі (1) та за наявності 20 мкмоль/л циклопіазонової кислоти. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з контролем

і холоднокровних видів. Деякі види прісноводних черепах, жаб та риб здатні до виживання протягом тривалої аноксії або гіпоксії [1, 2, 6, 12]. Поміж толерантних до гіпоксії тварин відомі численні види риб. У водоймах України мешкає широко розповсюджений вид, представник родини коропових риб – карась срібний (*Carassius gibelio*). Він відомий своєю надзвичайно високою життестійкістю [15]; за наявності несприятливих умов нестачі кисню (гіпоксії) здатен виживати, тоді як переважна кількість інших видів риб при таких умовах гине.

Толерантність до гіпоксії проявляють деякі види карасів. Золотий карась *Carassius auratus* (в англійській транскрипції – *crucian carp*) є видом, який може виживати при гіпоксії протягом місяця при низькій температурі і є близьким за цією властивістю до північноамериканських черепах

[16]. Нейрони ссавців типово є дуже чутливими до аноксичних–гіпоксичних станів, і короткі періоди аноксії–гіпоксії або ішемії призводять до нейрональної смерті, яка часто асоціюється зі значним збільшенням $[Ca^{2+}]_i$ [8–11, 17].

Добре відомо, що загальна концентрація цитоплазматичного кальцію потроюється після 4 діб аноксії в нейронах жаб *Rana catesbeiana* і *Rana pipiens* [19]. У дослідженнях на нейронах ссавців показано, що незначне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ на 50–200 нмоль/л відіграє нейропротективну роль при гіпоксії та втраті глюкози [3]. У дослідженнях на гіпоксіє-толерантних тваринах, було зроблено припущення, що підвищення $[Ca^{2+}]_i$ в клітинах може бути як внутрішньоклітинним сигнальним механізмом в умовах аноксії–гіпоксії. Проте механізми функціонування, роль і внесок окремих компонентів цієї кальцієвої

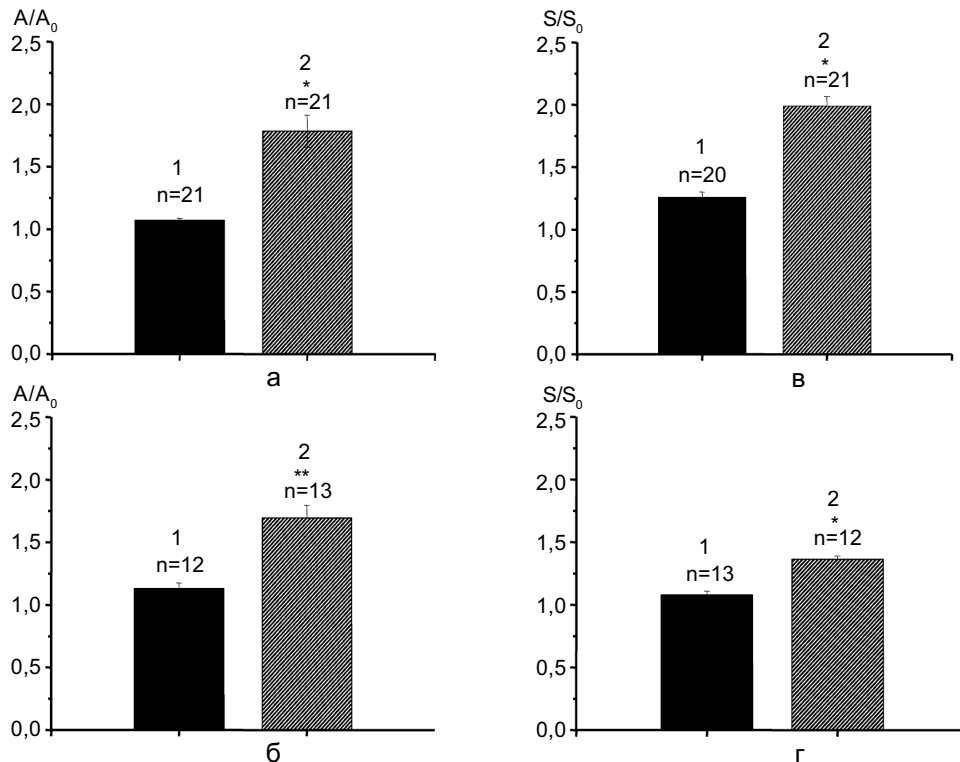


Рис. 3. Дія тапсигаргину на кальцієві транзєнти, викликані деполаризацією мембрани. Відносні зміни амплітуди кальцієвих транзєнтів (A/A_0), викликаних аплікацією KCl тривалістю 3 с (а) та 5 с (б) та зміни кількості Ca^{2+} , що входить в клітину під час деполаризації, представлені як площа кальцієвого транзєнта (S/S_0) при аплікації KCl тривалістю 3 с (в) та 5 с (г). Представлені значення в контролі (1) та за наявності 20 нмоль/л тапсигаргину. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з контролем

сигнальної системи в аноксії–гіпоксії-толерантних тваринах вивчено досить мало.

Ми досліджували особливості функціонування SERCA в кальцієвому гомеостазі нейронів мозочка гіпоксії-толерантного виду – карася *Carassius gibelio*. Кальцієві АТФази, що входять до складу цитоплазматичної або внутрішньоклітинних мембран являють собою мономерні білки і складаються з одного поліпептидного ланцюга, хоча відрізняються за молекулярною масою. Так, SERCA має молекулярну масу 108 кДа, а Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани – 120 кДа. Вони близькі за функціональними властивостями та мають визначену гомологію в структурі, проте утворюються при участі різних генів. Найкраще вивчена SERCA поперечно-смугастих м'язів. У загальних рисах встановлена послідовність стадій роботи Ca^{2+} -АТФази. Для роботи помпи характерно те, що стадії гідролізу АТФ чергуються зі стадіями переносу Ca^{2+} . На першій стадії відбувається зв'язування двох іонів кальцію на поверхні АТФази, яка повернена до цитоплазми; на тій же поверхні зв'язуються молекули АТФ. Під час наступної стадії відбувається фосфорилювання білка і вивільнення АДФ, а також вивільнення іонів кальцію з поверхні АТФази у внутрішню порожнину СР. Після гідролізу фосфатного зв'язку молекула ферменту переходить в початковий стан (центри зв'язування кальцію опиняються знову на цитоплазматичному боці СР).

Ми встановили, що всі протестовані нейрони мозочка карася при дії на них циклопіазонової кислоти та тапсигаргину відповідали значним підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – амплітуда збільшувалася вдвічі. Цей факт підтверджує наявність кальцієвих депо ЕР у нейронах мозочка карася. Вказана система забезпечує очищення цитоплазми від надлишкового Ca^{2+} , оскільки при виключенні роботи SERCA за допомогою селективних блокаторів амплітуда кальцієвих транзєнтів збільшується приблизно на 50–

100 % відносно загальної кількості Ca^{2+} , що входить в клітину під час її стимулювання КСІ і залежить від тривалості деполяризації. Підвищення амплітуди кальцієвого транзєнта є суттєвішим, ніж збільшення його площі під впливом блокаторів, – це може вказувати на те, що SERCA активується миттєво після входу в клітину Ca^{2+} , тоді як вона менше впливає на більш віддалені після стимуляції часові події. Про це ж говорить і менша ефективність блокаторів при більш довгих стимуляціях клітини. Отримані результати свідчать, що в нейронах риби SERCA залучена в очищення цитоплазми від надлишкового Ca^{2+} під час стимуляції клітини і відіграє істотну роль у короткочасовій модуляції кальцієвого сигналу.

И.А. Лукьянец, П.Г. Костюк, Е.А. Лукьянец

УЧАСТИЕ Ca^{2+} -АТФазы В КАЛЬЦИЕВОМ ГОМЕОСТАЗЕ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КАРАСЯ

В наших экспериментах исследовалось участие Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA) как отдельного внутриклеточного компонента-участника кальциевого гомеостаза нейронов мозжечка гипоксией-толерантного вида рыбы – карася *Carassius gibelio*. Для этого использовались соответствующие фармакологические блокаторы этого компонента – циклопиазоновая кислота и тапсигаргин. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) измерялась с помощью кальцийчувствительного красителя fura-2/AM и микрофлюоресцентного метода измерения концентрации свободного Ca^{2+} . Нами установлено, что нейроны мозжечка карася имеют хорошо выраженную систему очистки цитоплазмы от избыточного Ca^{2+} представленную SERCA. Так, при исключении работы SERCA посредством ее селективных блокаторов, амплитуда кальциевых транзєнтов и вход Ca^{2+} в клетку увеличиваются приблизительно на 20-100 % по отношению к контролю в зависимости от длительности деполяризации. Допускается, что SERCA нейронов карасей подобно к такой у млекопитающих существенно влияет на часовые и амплитудные характеристики кальциевых сигналов в нейронах и играет значительную роль в очистке цитоплазмы от избыточного Ca^{2+} во время функциональной активности клетки.

Ключевые слова: кальциевая АТФаза – SERCA, гипоксией-толерантный вид, карась, кальций, нейроны, мозжечок.

I.A. Lukyanets, P.G. Kostyuk, E.A. Lukyanetz**PARTICIPATION OF Ca^{2+} -ATPASE
IN CALCIUM HOMEOSTASIS
OF CEREBELLAR NEURONS IN CRUCIAN**

In our experiments the participation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) was studied as a separate intracellular participant of calcium homeostasis in neurons of cerebellum from hypoxia-tolerant fish species – crucian *Carassius gibelio*. The SERCA's blockers cyclopiazonic acid and thapsigargin were used. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by Ca^{2+} -sensitive dye Fura-2AM and microfluorescent method for measuring free Ca^{2+} concentration. We established that cerebellar neurons of crucian have a well expressed system to clean the cytoplasm from Ca^{2+} overflow that is presented by SERCA-pump of endoplasmic reticulum. The switching off a SERCA-pump by means of its selective blockers results in increase of the Ca^{2+} -transient amplitude and Ca^{2+} entrance in the cell approximately by 20% -100 % in comparison to control depending on duration of depolarization. It is assumed, that SERCA-pump of crucian neurons like in mammals substantially affects temporary and amplitude characteristics of calcium signals in neurons and plays a considerable role in cleaning of cytoplasm from Ca^{2+} during functional activity of the cell.

Key words: calcium ATPase - SERCA- pump, hypoxia-tolerant species, European carp, calcium, neurons, cerebellum.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bickler P.E. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms // *J. Exp. Biol.* – 2004. – **207**. – P. 3243–3249.
2. Bickler P.E., Buck L.T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability // *Annu. Rev. Physiol.* – 2007. – **69**. – P. 145–170.
3. Bickler P.E., Fahlman C.S. Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons // *Neuroscience*. – 2004. – **127**. – P. 673–683.
4. Bootman M.D., Lipp P., Berridge M.J. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals // *J. Cell. Sci.* – 2001. – **114**. – P. 2213–2222.
5. Ford L.E., Podolsky R.J. Regenerative calcium release within muscle cells // *Science*. – 1970. – **167**. – P. 58–59.
6. Hochachka P.W., Lutz P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals // *Comp.*

- Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* – 2001. – **130**. – P. 435–459.
7. Kostyuk P.G., Shmigol A.V. Intracellular stores and calcium signalling in mammalian sensory neurones // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1997. – **42**. – P. 197–205.
8. Kristian T., Siesjo B.K. Calcium in ischemic cell death // *Stroke*. – 1998. – **29**. – P. 705–718.
9. Lipton S.A. Neuronal protection and destruction by NO // *Cell. Death. Differ.* – 1999. – **6**. – P. 943–951.
10. Lukyanetz E.A. Influence of hypoxia on Ca^{2+} homeostasis in neurons. – In: *Receptors, channels and messengers* (eds. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A.) / Kiev: DUS, 2005. – P. 236–270.
11. Lukyanetz E.A., Stanika R.I., Koval L.M., Kostyuk P.G. Intracellular mechanisms of hypoxia-induced calcium increase in rat sensory neurons // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 2003. – **410**. – P. 212–221.
12. Lutz P.L., Nilsson G.E. Vertebrate brains at the pilot light // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2004. – **141**. – P. 285–296.
13. Mogami H., Nakano K., Tepikin A.V., Petersen O.H. Ca^{2+} flow via tunnels in polarized cells: recharging of apical Ca^{2+} stores by focal Ca^{2+} entry through basal membrane patch // *Cell*. – 1997. – **88**. – P. 49–55.
14. Nielsen S.P., Petersen O.H. Transport of calcium in the perfused submandibular gland of the cat // *J. Physiol.* – 1972. – **223**. – P. 685–697.
15. Nilsson G.E., Lutz P.L. Anoxia tolerant brains // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2004. – **24**. – P. 475–486.
16. Nilsson G.E., Renshaw G.M. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark // *J. Exp. Biol.* – 2004. – **207**. – P. 3131–3139.
17. 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.
18. Shmigol A., Kostyuk P., Verkhatsky A. Role of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in Ca^{2+} signal termination in adult mouse DRG neurones // *Neuroreport*. – 1994. – **5**. – P. 2073–2076.
19. Stewart E.R., Reese S.A., Ultsch G.R. The physiology of hibernation in Canadian leopard frogs (*Rana pipiens*) and bullfrogs (*Rana catesbeiana*) // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2004. – **77**. – P. 65–73.
20. Werth J.L., Usachev Y.M., Thayer S.A. Modulation of calcium efflux from cultured rat dorsal root ganglion neurons // *J. Neurosci.* – 1996. – **16**. – P. 1008–1015.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: elena@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 03.06.2009*