

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

**Грищенко Олексій Вадимович**

УДК 612.812:611.813.14

**Впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та змін депозалежного  
входу іонів кальцію на функціонування збудливих та незбудливих  
клітин**

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2020

**Дисертацією є сукупність наукових статей за науковою тематикою**

Робота виконана у відділі молекулярної біофізики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

**Науковий консультант:**

доктор біологічних наук, професор **Білан Павло Володимирович**  
завідувач відділу молекулярної біофізики  
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор  
**Соловйов Анатолій Іванович**,  
завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем  
та експериментальної терапії ДУ «Інститут фармакології та  
токсикології НАМН України»

доктор біологічних наук, професор,  
**Толстанова Ганна Миколаївна**,  
завідувачка науковою частиною КНУ імені Тараса Шевченка

доктор медичних наук, професор  
**Панова Тетяна Іванівна**,  
завідувачка кафедри патофізіології НМУ імені О.О.  
Богомольця

Захист відбудеться «30» червня 2020 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України  
за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О.  
Богомольця НАН України та на сайті:  
[http://biph.kiev.ua/en/Specialized\\_Scientific\\_Council](http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council).

Автореферат розісланий «29» травня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої  
вченої ради,



к. б. н. Любанова О.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Внутрішньоклітинні іони кальцію є одним з найбільш універсальних вторинних посередників. Вони задіяні у цілому ряді принципово важливих клітинних процесів, таких як клітинна збудливість, секреція, проліферація, синаптична передача, скорочення та інші (Avila et al., 2019). Іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) беруть участь у передачі сигналів від структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур, забезпечуючи таким чином реакцію клітини на зовнішній стимул (Petersen a. Verkhratsky, 2016). У процесі еволюції молекулярні механізми, що контролюють рівень внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), були сформовані дуже рано; вони необхідні для точного регулювання рівнів як вільного, так і зв'язаного кальцію у цитозолі, а також кількості кальцію, накопиченого у внутрішньоклітинних депо (Shahidul, 2020). Ці механізми є універсальними і по суті однакові і у прокариот і еукаріот. Вони включають низьку проникність фосфоліпідних мембран для  $\text{Ca}^{2+}$ , високу внутрішньоклітинну буферну здатність та ефективну систему видалення  $\text{Ca}^{2+}$  за межі клітин (Case et al., 2007). Щоб зрозуміти на клітинному рівні загальні закономірності біологічних процесів, пов'язаних з кальцієм у організмі тварин і людини, кальцієву регуляцію вивчають на широкому колі різних модельних об'єктів, від дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*; Catterall et al., 2005) та нематод (*Caenorhabditis elegans*; Suzuki et al., 2010) до риб (*Danio rerio*; Kettunen, 2020) та мишей і щурів (Györke, 2017). Ці дослідження призвели до важливих фундаментальних відкриттів у царині механізмів контролю  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Слід, проте, визнати, що деякі важливі аспекти кальцієвої регуляції все ще залишаються нез'ясованими.

Кальцієва сигналізація має велике значення для функціонування збудливих клітин. Саме іони кальцію відіграють основну роль у процесах спряження збудження і скорочення кардіоміоцитів. У кардіоміоцитах ссавців до скорочення призводить вхід іонів кальцію через потенціалкервані  $\text{Ca}^{2+}$  канали L-типу (VDCC); ефект такого входу підсилюється вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуму (CP) через ріанодинові рецептори другого типу (RyR2). Відповідний процес називається кальційіндуковане вивільнення кальцію (CICR; Ríos, 2018). Однак досі невідомо, як скорочення забезпечується в клітинах ранньої стадії кардіоміогенезу, коли експресія іонних каналів, включаючи VDCC, у цих клітинах є значно меншою, ніж у зрілих кардіоміоцитах. Отже, з'ясування кальційзалежних механізмів скорочення незрілих кардіоміоцитів є дуже важливим як в аспекті встановлення більш детальної картини сполучення між збудженням та скороченням, так і для лікування деяких захворювань серця, котрі ініціюються ще на стадії ембріогенезу.

Захворювання серцево-судинної системи посідають перші місця в переліку смертельних захворювань людини в усьому світі. Серед цих захворювань виділяється родинна гіпертрофічна кардіоміопатія (РГК) – одна з найпоширеніших причин раптової смерті (один випадок на 500 людей). РГК є етіологічно гетерогенною, але виникає значною мірою внаслідок аутосомно-домінантних мутацій у генах, що кодують скоротливі білки серцевих м'язів (Maron et al., 1995). Зокрема, заміна певної амінокислоти у білку тропоніну Т (TnT) підвищує чутливість міофіламентів до  $\text{Ca}^{2+}$

та може викликати шлуночкову аритмію. Механізм виникнення цього феномена досі залишається невідомим (Miller et al., 2001). Встановлення цього механізму є конче необхідним для лікування хворих на цю патологію, що становлять основну частку пацієнтів із захворюваннями серцево-судинної системи.

В електророзбудливих клітинах вхід іонів кальцію до цитозолу в основному відбувається через потенціалзалежні кальцієві канали. Активація цих каналів під час деполяризації мембрани призводить до виникнення транзєнтів концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , які ініціюють широкий спектр фізіологічних процесів, включаючи скорочення. На відміну від збудливих клітин, у незбудливих клітинах вхід  $\text{Ca}^{2+}$  опосередковується рецепторактивованими шляхами, які відіграють роль головного постачальника іонів кальцію всередину клітин. Напевно, найбільш поширеним рецепторкерованим механізмом входу  $\text{Ca}^{2+}$  є депо-керований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через канали плазматичної мембрани (SOCE), який активується, коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинних кальцієвих депо зменшується (Putney, 2005). Невдовзі після ідентифікації SOCE було виявлено високоселективний кальцієвий струм, що активується спустошенням внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$  депо, так званий  $I_{\text{CRAC}}$  (Hoth a. Penner, 1992). Екзокринні клітини не мають потенціал-залежних кальцієвих каналів, і тому зміни концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , що регулюють секрецію ферментів травлення, генеруються завдяки складній взаємодії SOCE/ $I_{\text{CRAC}}$  та вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо (Petersen a. Tepikin, 2008).

У ссавців секреція основної частини ферментів травлення здійснюється ацинарними клітинами підшлункової залози. Відомо, що синтез і секреція цих ферментів у нормі регулюються змінами концентрації вільного кальцію в цитоплазмі та ендоплазматичному ретикулумі цих клітин (Petersen, 2015). За патологічних умов стійке підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  активує внутрішньоклітинні проферменти травлення всередині клітин, що призводить до розвитку запалення та некрозу у підшлунковій залозі. Нажаль, відомості про функціонування механізмів залучених до кальцієвої регуляції як в ацинарних, так і в клітинах інших типів екзокринній частці підшлункової залози у нормальних та патологічних умовах, є дуже неповними. Зокрема, кальцієва регуляція при взаємодії клітин різних типів у екзокринній частці підшлункової залози в їх природному оточенні є майже недослідженою. Результати таких досліджень були б вкрай важливими як для детального встановлення ролі кальцієвої сигналізації у розвитку та підтриманні різних патологічних станів, так і для розробки новітніх підходів у лікуванні гострого та хронічного панкреатиту.

Таким чином, наше дослідження мало на меті встановити, яким чином механізми буферизації іонів кальцію у цитозолі та депозалежного входу  $\text{Ca}$  залучені у кальцієву регуляцію. У електрично збудливих та незбудливих клітинах в умовах норми та патології. Ця проблема розглянута на прикладі кардіоміоцитів та клітин екзокринної частки підшлункової залози.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної біофізики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011 -

2013; номер державної реєстрації – 0110U004750), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273) та «Сигналізація нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2019 – 2013, номер державної реєстрації – 0115U003632).

**Мета дослідження:** встановити впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та аномального депозалежного входу іонів кальцію на функціонування кардіоміоцитів та клітин підшлункової залози.

**Завдання дослідження.** Згідно з цією метою були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати кальційзалежні механізми виникнення спонтанних скорочень кардіоміоцитів на ранніх стадіях їх розвитку.
2. Встановити зміни кальцієвої регуляції в кардіоміоцитах, що експресують тропонін Т з мутацією I79N, яка викликає шлуночкову аритмію.
3. Визначити механізм порушення рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуру шлуночкових міоцитів мишей, зумовленого нокаутом гену калсеквестрину (*Casq2 KO*).
4. Зареєструвати трансмембранні струми, які активуються вивільненням іонів кальцію із внутрішньоклітинних депо панкреатичних ацинарних клітин та встановити зв'язок між спустошенням ендоплазматичного ретикулуру та активацією цих струмів.
5. Встановити можливу роль кальцієвого депозалежного струму у розвитку гострого панкреатиту.
6. Визначити вплив жовчних кислот на кальцієву проникність плазматичної мембрани ацинарних клітин підшлункової залози.
7. Встановити механізми кальцієвої регуляції зірчастих клітин підшлункової залози та з'ясувати ймовірну роль цих клітин у запобіганні виникнення некрозу ацинарних клітин.
8. Визначити особливості кальцієвої регуляції в клітинах різних типів у панкреатичних лобулах екзокринної частини підшлункової залози в нормі та патології.
9. Встановити роль порушень кальцієвої регуляції в ацинарних клітинах підшлункової залози у розвитку некрозу цих клітин, викликаного аспарагіназою.
10. З'ясувати вплив галактози на кальцієву регуляцію та функціональний стан ацинарних клітин та на розвиток гострого аспарагіназаіндукованого панкреатиту.

**Об'єкт дослідження** – механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у клітинах підшлункової залози та кардіоміоцитах.

**Предмет дослідження** – впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та змін депозалежного входу іонів кальцію на функціонування електрично збудливих та незбудливих клітин в нормальних та патологічних умовах.

**Наукова новизна отриманих результатів.** За допомогою флуоресцентних та електрофізіологічних методів дослідження вперше показано, що саме спонтанні коливання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, не пов'язані з генерацією трансмембранних струмів, призводять до скорочення кардіоміоцитів на ранніх

стадіях розвитку останніх. Удосконалено методи оцінки кальцієвої буферної ємності кардіоміоцитів та їх внутрішньоклітинної перфузії у конфігурації “ціла клітина”. Вперше виявлено пряму кореляцію між рівнем буферної ємності та шлуночковою аритмією при мутаціях тропоніну, що підвищують чутливість міофіламентів до іонів кальцію.

У роботі вперше зареєстровано кальцієвий струм через плазматичну мембрану ацинарних клітин підшлункової залози, що активується вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу. Показано зв'язок між рівнем спустошення ендоплазматичного ретикулу та активацією депозалежного кальцієвого трансмембранного струму. Отримані данні свідчать про те, що саме цей струм може бути одним із основних факторів, відповідальних за підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  при розвитку гострого панкреатиту.

Вперше досліджена пряма дія жовчних кислот на механізми кальцієвої регуляції у клітинах підшлункової залози та запропоновано інтерпретацію механізму виникнення гострого панкреатиту, пов'язаного зі збільшенням  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та  $[\text{Na}^+]_i$ . Встановлено негативний вплив аспарагінази – реагента, який застосовують в клінічній практиці для лікування дитячого гострого лімфобластного лейкозу – на кальцієву сигналізацію ацинарних клітин підшлункової залози. Запропоновано використання галактози для запобігання зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та виникнення некрозу клітин підшлункової залози в моделі гострого панкреатиту, викликаного аспарагіназою.

Вперше в клітинах у структурі панкреатичних лобул були встановлені зміни кальцієвої сигналізації, що спричиняються брадикініном в концентраціях, які є типовими для панкреатиту. У зіркоподібних клітинах підшлункової залози вперше був виявлений двофазний кальцієвий сигнал у відповідь на активацію брадикінінових  $\text{V}_2$ -рецепторів плазматичної мембрани та з'ясовані механізми генерації цього сигналу. Отримані нові дані, які підтверджують панкреопротективну дію блокаторів брадикінінового рецептору  $\text{V}_2$ , та продемонстровано, що їх використання запобігає некрозу ацинарних клітин. Вперше визначені особливості кальцієвої регуляції при взаємодії клітин різних типів у екзокринній частці підшлункової залози в їх природному оточенні. Зокрема, вперше досліджена кальцієва сигналізація в нервових клітинах підшлункової залози у структурі панкреатичних лобул.

Результати дослідження є внеском у комплексне розуміння механізмів кальцієвої регуляції та сигналізації в електробудливих та незбудливих клітинах у нормі та патології.

**Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.** Результати дослідження, отримані в роботі, мають як фундаментальне, так і практичне значення. Порівняння роботи мембранних та внутрішньоклітинних кальційрегулюючих структур в умовах виникнення патологій (мутації кальційзв'язуючих білків, гіперактивація депозалежного входу  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину, індуковане різними чинниками виникнення некрозу ацинарних клітин та розвиток гострого панкреатиту підшлункової залози) істотно допомагають розумінню появи порушень регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  і збагачують інформацію щодо патогенезу відповідних захворювань.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що вони дозволяють оцінити, які саме механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у клітинах різних типів (як електрозбудливих, так і незбудливих) ушкоджуються при розвитку низки патологій. Продемонстровано, що саме зміни цитозольної кальцієвої буферної ємності призводять до виникнення серцевих аритмій при  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсibiliзуючих мутаціях тропоніну Т. Ці зміни у кальцієвій регуляції кардіоміоцитів можуть бути основою для модуляції серцевих скорочень у пацієнтів, що мають мутацію тропоніну TnT-I79N і в підсумку призводити до синдрому раптової зупинки серця. Досліджено ефект аспарагінази (речовини, яка застосовується в клінічній практиці для лікування дитячого гострого лімфобластного лейкозу) на панкреатичні клітини та запропоновано використання галактози для запобігання росту внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та виникненню некрозу клітин підшлункової залози. Крім того розширено наявні дані щодо механізму панкреопротектної дії блокаторів брадикінінового V2-рецептору, що запобігає некрозу ацинарних клітин та виникненню гострого панкреатиту.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є особистою працею здобувача. Автор поставив задачу досліджень і самостійно розробив методики приготування кластерів підшлункової залози та візуалізації зіркоподібних клітин, вніс ряд удосконалень у методику оцінки кальцієвої буферної ємності ізольованих кардіоміоцитів, а також самостійно виконав основну частину експериментів, здійснював аналіз, статистичну обробку й узагальнення результатів. Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України к.б.н. С.В. Вятченко-Карпінським, Ю.В. Герасименко та Д.О. Кришталем. Дослідження молекулярних механізмів виникнення перших спонтанних скорочень кардіоміоцитів було проведено у співпраці з Інститутом нейрофізіології (Кьольн, Німеччина) (керівник проф. І. Хешлер). Експерименти з використанням клітин екзокринної частини підшлункової залози були проведені на базі Університету міста Кардіф (Кардіф, Велика Британія; керівник проф. О.Н. Петерсен). Дослідження кальційзв'язуючих білків кардіоміоцитів було проведено на базі Університету Вандербільта (Нешвіл, США; керівник проф. Б.С. Нолман). При плануванні, організації і проведенні досліджень по всіх розділах роботи частка особистої участі автора становила не менше 80%. Особисто проведено статистичний аналіз та інтерпретацію даних; відповідні результати опубліковано в наукових міжнародних виданнях. Автор не запозичав ідеї та розробки співавторів публікацій.

Матеріали, положення та висновки кандидатської дисертації здобувача не були використані при написанні докторської дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Усі матеріали дисертації докладалися на семінарах Інституту ім. О.О.Богомольця НАН України, а також на наступних міжнародних симпозіумах і з'їздах: Американського Біофізичного Товариства (Бостон, 2001, Сан Франциско, 2002, Бостон, 2009, Сан Франциско, 2010), Українського Біофізичного Товариства (Луцьк, 2015), конференції Європейської Академії (Кардіф, Велика Британія, 2016), зустрічі Королівського Наукового

Товариства Великої Британії (Лондон, 2017), Українського Фізіологічного Товариства (Київ, 2019).

Результати дисертаційної роботи доповідалися також на наукових семінарах Інституту фізики НАН України та Українського Біофізичного Товариства.

**Публікації.** Результати дисертації викладено у 16 статтях (опублікованих у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports) та 13 тезах міжнародних конференцій та з'їздів.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

*Клітинні моделі, використані у роботі.* Кардіоміоцити отримували з плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин лінії D3 миші (Wobus et al., 1991). Недиференційовані стовбурові клітини культивували на живильних шарах і для подальшого використання диспергували за допомогою трипсина. Ембріональні тільця (ЕТ) отримували шляхом культивування клітин ЕТ спочатку протягом двох днів у краплях, що висять (400 клітин 20 мкл); потім протягом 5 діб у суспензії і нарешті, протягом 1–15 діб на склі, покритому желатином. Приблизно через 12-24 годин після посіву (посадки на скло) з'являлися скупчення клітин, що спонтанно скорочувалися. Для приготування ізольованих клітин першої, другої та четвертої стадій (диференціювання протягом 9 діб, 10-11 та 17-22 діб відповідно) 20–30 зон ЕБ, здатних до скорочення, розсікали, і кардіоміоцити ізолювали ферментативно за допомогою колагенази В (Boehringer Ingelheim, Німеччина). Розчин, що використовувався для дисоціації клітин, містив (мМ): NaCl 120; KCl 5,4; MgSO<sub>4</sub> 5; CaCl<sub>2</sub> 0,03; Na-пуріват 5; глюкоза 20; таурин 20; Нерес 10; колагеназа В 0,5–1 мкг; рН 6,9 (NaOH). Дисоційовані клітини наносили на покривне скло і зберігали в інкубаторі. Протягом перших 12 год клітини прикріплювалися до поверхні скла.

Шлуночкові зрілі міоцити виділяли з використанням модифікованого колагеназно/ протеазного методу. Вирізані серця миша вміщували в холодний інкубаційний розчин наступного складу (мМ): таурин, 30; NaCl, 90; KCl, 5,4; Нерес, 10; глюкоза, 10; MgCl<sub>2</sub>, 1; рН 7,2 (NaOH). Аорту канюлювали та перфузували протягом 5 хв інкубаційним розчином (36° С), що містив 0,5 мм EGTA. Потім розчин замінювали на ізоляційний розчин, що містив 1 мг/мл альбуміну (Sigma Chemical, США), 0,12 мг/мл протеази (тип XIV, Sigma Chemical, США) та 0,33 мг/мл колагенази (тип IV, Worthington Biochemical Corp., США; 204 од/мг) протягом 8–10 хв. Потім тканину шлуночків подрібнювали та додатково витримували в тому самому розчині для виділення протягом двох-трьох періодів (5-10 хв кожний) на водяній бані (37° С) з безперервним струшуванням. Отриману суспензію клітин збирали після кожного етапу ферментативної обробки та зберігали при кімнатній температурі в інкубаційному розчині, що містив додатково 0,2 мм CaCl<sub>2</sub>. Ця процедура давала 30–50% шлуночкових міоцитів, які використовувалися протягом 8 годин.



*Ізолювання ацинарних клітин підшлункової залози.* Ацинарні клітини готували шляхом ін'єкції в залозу миши 1мл колагенази (200 од/1 мл; Worthington Lakewood, США) і ферментативної обробки протягом 16–17 хв при 37° С при постійному перемішуванні. Після ферментативної обробки суспензію тканини підшлункової залози відсмоктували піпеткою, що дозволяло виділити поодинокі клітини або їх маленькі кластери. Клітини промивали тричі у перебігу центрифугування в стандартному буфері Na-HEPES. Всі процедури проводили при кімнатній температурі (22–25° С); клітини використовували протягом 3–4 год після виділення.

*Приготування часточок (кластерів) підшлункової залози.* Частинки підшлункової залози та великі скупчення клітин виділяли з підшлункової залози дорослих мишей. Підшлункову залозу швидко розсікали, переносили в розчин Na-Нерес з додаванням колагенази (Sigma Poole, Велика Британія) та інкубували при 37° С протягом 5-6 хв. Після ферментативної обробки зразки зберігали в позаклітинному розчині на основі Na-Нерес, що вміщував (мМ): NaCl, 140; KCl, 4,7; Нерес (KOH), 10; MgCl<sub>2</sub>, 1; глюкоза 10; CaCl<sub>2</sub>, 1; рН 7,2. Частинки підшлункової залози потім інкубували з флуоресцентним барвником протягом 20-30 хв. Для експериментів використовували свіжоприготовані часточки підшлункової залози, прикріплені до покривного скла перфузійної камери при кімнатній температурі (23° С). Проникнення різних речовин вглиб тканини підшлункової залози сильно залежало від відстані до поверхні. Тому в деяких випадках використовували значно вищі концентрації (до 5-разового збільшення), ніж це було необхідно в експериментах на ізольованих клітинах та застосовували відносно тривалі терміни інкубації.

*Імуноцитохімія.* Імуноцитохімічні визначення на часточках підшлункової залози та великих кластерах клітин проводили згідно описаною методикою (Lur et al., 2009) з деякими модифікаціями. Після додавання 1% BSA та 10% козячої сироватки виділені панкреатичні часточки інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі з первинними антитілами (ССК-AR) з наявністю 5% козячої сироватці в розчині PBS. Далі панкреатичні часточки інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі з 594-кон'югованим вторинним антитілом CruzFluor (CFL). Клітини прикріплювали до покривного скла, вкритого полі-L-лізином. Для імунохімічного забарвлення первинним антитілом панкреатичні часточки фіксували у 4%-му параформальдегіду з наступними пермобілізацією тритоном X100, блокуванням та інкубацією з первинними (десмінними), а потім із вторинними (CFL) антитілами, як описано вище.

*Одночасна реєстрація трансмембранних струмів і внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів.* Для електрофізіологічних експериментів досліджувані клітини переносили до експериментальної камери, яку перфузували зі швидкістю 0,5-1,0 мл/хв позаклітинним розчином, який мав наступний склад (мМ): NaCl, 145; KCl, 4,8; MgCl<sub>2</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 2; Нерес, 15; глюкоза, 10 (рН 7,4; осмолярність 300-310 мОсм). Електричну активність клітин відводили в режимі фіксації струму або потенціалу з використанням конфігурації «ціла клітина» за умов перфорованого або звичайного щільного контакту ( Hamill et al. 1981). У розчині, що не вміщував іонів натрію, Na<sup>+</sup> замінювали на N-метіл-D-глюкамін (NMDG<sup>+</sup>). Петч-піпетки мали опір 3-4 МОм при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (мМ): KCl, 120;

MgCl<sub>2</sub>, 1; MgATP, 2; Hepes, 15; BAPTA, 10; CaCl<sub>2</sub>, 2, або KCl, 55; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 70; MgCl<sub>2</sub>, 7; та Hepes, 10; рН 7.4 (KOH). Для вимірювання цитозольних Ca<sup>2+</sup> транз'єнтів в режимі фіксації потенціалу клітини завантажували пентакалієвою сіллю Fluo-4 (кінцева концентрація 100 мкМ), яку додавали в піпетку. Розчин у піпетці (мМ): CsCl, 125; MgATP, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1; глутатіон (GSH), 5; цАМФ 0,05; HEPES, 20, рН доводили до 7,25 за допомогою CsOH. Відведення трансмембранних струмів та подачу командних імпульсів здійснювали за допомогою підсилювача EPS-8 та програмного забезпечення Pulse (НЕКА) або підсилювача MultiClamp700B та програмного забезпечення pClamp 10 (Molecular Devices, Німеччина). Для дослідження вольтамперних характеристик іонних струмів застосовувався ramp-протокол від -100 до +40 мВ (нахил 400 мВ/с); для реєстрації депозалежних струмів потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні -50 мВ.

Для завантаження флуоресцентного барвника Fluo-4 або Fura-2 клітини інкубували протягом 20-40 хвилин при кімнатній температурі у базовому розчині, який вміщував 5 мкМ АМ-форми барвника, після чого відмивали базовим розчином протягом 20 хв для повної деетерифікації барвника. Клітини візуалізували за допомогою двофотонного конфокального мікроскопа Leica SP5 МРІІ (Німеччина) з об'єктивом 63 × 1,2 NA. Fluo-4 збуджували аргонним (Ar) 48-нм лазером з потужністю 1-4%, а світло збирали при 510-580 нм. Як правило, серію зображень записували з роздільною здатністю 512 × 512 пікселів (зі швидкістю 0,3 кадра/с) та аналізували за допомогою програмного забезпечення Leica Confocal (Leica, Мангейм, Німеччина). Сигнали флуоресценції були представлені як відношення F/F<sub>0</sub> (де F<sub>0</sub> - початковий рівень флуоресценції).

*Статистичний аналіз* проводили за допомогою ANOVA та t-тесту Стьюдента. Критерієм достовірності міжгрупових відмінностей для всіх статистичних тестів було значення  $p < 0,05$ . У всіх випадках вказано також значення числа експериментів ( $n$ ); у електрофізіологічних дослідах це дорівнювало кількості клітин.

## Результати досліджень та їх обговорення

### Кальцієва регуляція в електробудливих клітинах.

*Спонтанні скорочення незрілих кардіоміоцитів опосередковуються коливаннями внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію.* Постульовано, що серце скорочується завдяки електромеханічному спряженню, яке реалізується наступним чином. Спочатку у кардіоміоцитах розвивається потенціал дії (ПД), що призводить до відкриття потенціалзалежних Ca<sup>2+</sup>-каналів L-типу. Потім Ca<sup>2+</sup>, що надходить у кардіоміоцити через VDCC, ініціює вивільнення Ca<sup>2+</sup> з чутливих до реанодіну кальцієвих депо (CICR), а це призводить до значного підвищення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Nabauer et al., 1989). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> зростає до рівня, достатнього, щоб ініціювати взаємодію кальція зі скоротливими білками що і викликає скорочення кардіоміоцитів. Ритмічні ПД, CICR і скорочення кардіоміоцитів миші виникають завдяки функційній експресії різноманітних мембранних іонних каналів та внутрішньоклітинних систем вивільнення та виведення Ca<sup>2+</sup>. Відомо, однак, що в ембріональних кардіоміоцитах не експресується повний набір іонних каналів, а деякі канали експресовані з меншою

щільністю, ніж у зрілих клітинах (Gryshchenko O. et al., 1999). Тому ми вирішили дослідити механізми скорочення в таких незрілих клітинах та з'ясувати чи мають вони спонтанну електричну активність та CICR. Наше дослідження було ініційоване спостереженням, що кардіоміоцити на стадіях розвитку 1 та 2 стабільно скорочувалися протягом кількох годин за умов, коли їх мембрана була деполяризована завдяки суперфузії розчином із 140 мМ  $K^+$ . Ця особливість не спостерігалася в кардіоміоцитах на стадії розвитку 4; ці клітини, як і дорослі кардіоміоцити, демонстрували гіперскорочення після додавання розчину з високою концентрацією  $K^+$ , і це призводило до загибелі подібних клітин протягом кількох секунд. Було також встановлено, що вилучення позаклітинного  $Ca^{2+}$  не припиняло вказаних вище скорочень. Тому ми дослідили, чи були скорочення кардіоміоцитів стадій 1 та 2 обумовлені ритмічними змінами  $[Ca^{2+}]_i$ . Застосування розчину із 140 мМ  $K^+$  призводило до тимчасового підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ , імовірно, через активацію VDCC (рис. 1A). Під час фази спаду таких транз'єнтів виникали ритмічні високоамплітудні коливання  $[Ca^{2+}]_i$ . Вони збігалися у часі зі спонтанною скорочуваною активністю ( $n=3$ ). Це вказувало, що дані скорочування могли бути обумовлені коливаннями  $[Ca^{2+}]_i$ . Однак відносні зміни флуоресценції ( $F/F_0$ , рис. 1A), що інтерпретувалися нами як коливання  $[Ca^{2+}]_i$  могли бути і артефактом, зумовленим самими скороченнями. Тому кардіоміоцити стадій 1 та 2, що спонтанно скорочувались, завантажували двохвильовим кальцієвим барвником Фура-2. Досліди з Фура-2 продемонстрували, що збудження супроводжується відхиленням флуоресцентних сигналів у протилежних напрямках на довжинах хвиль 340 та 380 нм. Цей факт підтверджував, що зміни флуоресцентних сигналів виникали саме завдяки змінам  $[Ca^{2+}]_i$ , а не були викликані артефактами руху. Стійкість скорочень та коливань  $[Ca^{2+}]_i$  в умовах високої концентрації  $K^+$  робила залучення VDCC до цих процесів малоімовірним завдяки їх інактивації останнього процесу. Такий висновок також підтверджувався тим, що коливання  $[Ca^{2+}]_i$  тривали у присутності селективного блокатора VDCC нісолдіпіну (2 мкМ,  $n=5$ ; рис. 1B). Значно швидше зниження співвідношення 340/380 у нормальних позаклітинних розчинах порівняно із таким у розчині з високою концентрацією  $K^+$  (замість  $Na^+$ ) вказувало на функційну експресію  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника в кардіоміоцитах стадій 1 та 2 ( $n=11$ ). Однак навряд чи  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник забезпечував коливання  $[Ca^{2+}]_i$  через його реверсний режим або зниження його активності у розчині з високою концентрацією  $K^+$ , оскільки коливання зберігалися навіть після додавання 2 мМ  $Ni^{2+}$ , добро відомого блокатора  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника (рис. 1C). В той же час прикладання тапсигаргіну (інгібітора саркоплазматичної  $Ca^{2+}$ -АТФази) призводило до зростання  $[Ca^{2+}]_i$  та різкого припинення і коливань  $[Ca^{2+}]_i$ , і скорочень. Це вказувало, що саме внутрішньоклітинні коливання  $[Ca^{2+}]_i$  керують спонтанними скороченнями кардіоміоцитів стадій 1 і 2 (рис. 1D).

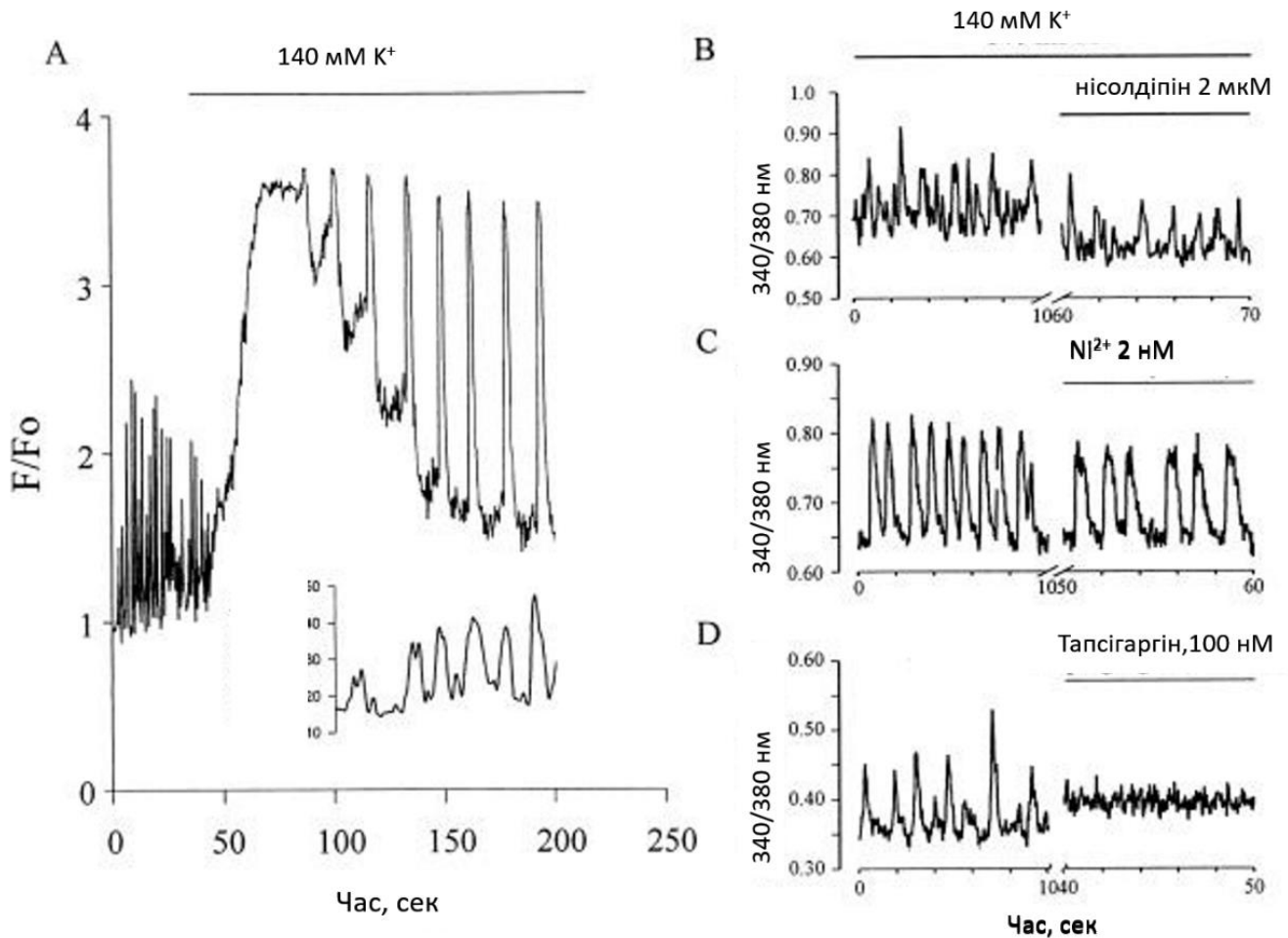


Рис.1. Коливання  $[Ca^{2+}]_i$  в ізольованих кардіоміоцитах стадії розвитку 2. А) Вплив високої концентрації  $K^+$  на коливання  $[Ca^{2+}]_i$ . Калієва деполяризація призводить до тимчасового підйому  $[Ca^{2+}]_i$  (імовірно через активацію VDCC-каналів) та зміни амплітуд та частоти коливань. Деполяризація клітинної мембрани призводила до початкового припинення скорочень, які відновлювалися зі зниженням  $[Ca^{2+}]_i$ .  $F/F_0$  – співвідношення між фактичною та початковою інтенсивністю флуоресценції барвника. Криві на вкладці відображають інтенсивність пропускового світла, яка змінювалася за рахунок скорочення клітини; В – D) Вплив різних фармакологічних агентів на співвідношення 340/380 у клітинах, стадії 2, здатних до спонтанних скорочувань та завантажених барвником Fura-2AM. В) Додавання блокатора кальцієвих каналів нісолдіпіну (2 мМ) не припиняло коливання  $[Ca^{2+}]_i$ , але призводило до зниження рівня  $[Ca^{2+}]_i$  у стані спокою. С) Аналогічно,  $Ni^{2+}$  (2 мМ, відомий блокатор  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  обмінника) не переривав коливання  $[Ca^{2+}]_i$ . D) Прикладання інгібітора  $Ca^{2+}$ -АТФази тапсігаргину (100 нМ) призводило до повного припинення коливань  $[Ca^{2+}]_i$  та збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в спокої.

Оскільки в ранніх незрілих кардіоміоцитах ПД не є обов'язковими факторами, що зумовлюють генерацію скорочень, вони вірогідно повинні виконувати якусь іншу функцію в серці на ранньому етапі ембріонального розвитку. Відомо, що кардіоміоцити, отримані із ембріональних тілець, експресують коннексин, утворюючи функціональні щілинні контакти. Отже, ми вирішили дослідити чи

потрібні ПД для синхронізації скорочень у незрілих кардіоміоцитах. Ми зареєстрували хвилі  $[Ca^{2+}]_i$ , що поширювалися в кластерах зі швидкістю 300–400 мкм/с ( $n=3$ ). Синхронні хвилі та скорочення спостерігалися і в поодиноких клітинах, а також у кластерах, ізольованих з ембріональних тілець. Велика швидкість поширення кальцієвих хвиль в контрольних умовах, вказувала на наявність електричного сполучення між кардіоміоцитами через щілинні переходи, а не на дифузію іонів кальцію. Місце ініціації та напрямок розповсюдження хвиль залишалися незмінними в перебігу експерименту. У розчині з високою концентрацією  $K^+$  коливання  $[Ca^{2+}]_i$  зберігалися, але відбувалися десинхронізовано. Ідентифікувати місце ініціації та напрямок розповсюдження кальцієвих хвиль було неможливо. Крім того, частота та амплітуда коливань  $[Ca^{2+}]_i$  в окремих клітинах помітно розрізнялися. Таким чином, висока концентрація  $K^+$  зумовлювала десинхронізацію скорочень клітин та перехід контролю за скороченнями саме до осциляцій  $[Ca^{2+}]_i$ .

Отже, описані вище результати свідчать про те, що спонтанні скорочення незрілих кардіоміоцитів генеруються не завдяки трансмембранним струмам, а зумовлені коливаннями  $[Ca^{2+}]_i$ . Ця рання активність не опосередковувалася VDCC L-типу та взаємодією між останніми та ріанодиноними кальцієвими депо. Було також показано, що електричне сполучення між кардіоміоцитами через щілинні контакти опосередковує синхронізацію скорочень цих клітин на стадіях їх незрілості.

**Роль мутацій кальційзв'язуючих білків на кальцієву сигналізацію в кардіоміоцитах.**

*Мутації тропоніну, асоційовані зі синдромом раптової зупинки серця, призводять до значних змін кальцієвій сигналізації у кардіоміоцитах.* Кальцієва буферна ємність цитозолу визначається як відношення концентрації  $Ca^{2+}$ , що надійшла до нього, до концентрації  $Ca^{2+}$  після встановлення термодинамічної рівноваги у взаємодії цитозольного кальцієвого буфера та  $Ca^{2+}$ . Для вимірювання кальцієвої буферної ємності цитозолу кардіоміоцитів ми викликали вивільнення  $Ca^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуму до цитозолу, індуковане швидким прикладанням кофеїну. Після такого вивільнення  $Ca^{2+}$  починав виводитися з цитозолу за допомогою натрій-кальцієвого обмінника (НКО). У відповідних експериментах ми одночасно вимірювали зміни внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  (за допомогою кальцієвого барвника Fluo-4) та інтеграл струму через НКО, що визначає загальну кількість  $Ca^{2+}$ , вивільненого з ретикулуму ( $\Delta[Ca]_{\text{сум}} = I_{\text{НКО}}/V_k$ , де  $V_k$  – об'єм клітини) (Berlin, 1994). Струм через НКО що вимірювали з використанням методики фіксації потенціалу. Об'єм клітини розраховували згідно з її електричною ємністю, виміряною в електрофізіологічному експерименті, беручи до уваги відношення ємності до об'єму (6,76 pF/pl), як це описано для міоцитів шлуночків 3-місячних мишей (Bers, 2001). Кальцієву ємність міоцита оцінювали як відношення величини  $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$  до амплітуди  $[Ca^{2+}]_i$  транзйєнта. Ми не блокували видалення цитозольного  $Ca^{2+}$  мітохондріями та  $Ca^{2+}$ -АТФазами сарколеми; тому величина  $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$  була дещо заниженою. Слід зауважити, що швидкість видалення  $Ca^{2+}$ , що не опосередкована НКО, не відрізнялася від такої в клітинах при мутаціях тропоніну (TnT); тому подібне заниження не впливало на кінцевий результат. Вміст кальцію у ретикулумі знижувався завдяки

попередній обробці клітин кофеїном у низькій концентрації. Це забезпечувало в подальших реєстраціях амплітуди кофеїнндукованих кальцієвих транз'єнтів рiвнi амплітудам таких транз'єнтів під час типового скорочення мiоцитiв. Був також використаний iнший метод оцiнки кальцiєвої буферної ємностi клiтин (без використання кофеїну). У цьому методі збiльшення  $[Ca^{2+}]_i$  було забезпечене за рахунок входу  $Ca^{2+}$  через потенцiалзалежнi кальцiєвi канали L-типу. Загальну кiлькiсть  $Ca^{2+}$  ( $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$ ), що зайшла до клiтини під час деполяризацiї плазматичної мембрани та призводила до виникнення транз'єнту  $[Ca^{2+}]_i$ , вимiрювали як iнтеграл кальцiєвого струму. Кальцiєву ємнiсть мiоцита оцiнювали як вiдношення величини  $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$  до амплітуди  $[Ca^{2+}]_i$  транз'єнту, як i при використаннi попереднього методу.

У проведених дослiдах було вивчено вплив пiдвищення чутливостi мiофiламентiв кардiомiоцитiв до  $Ca^{2+}$  на буферну ємнiсть та кальцiєвi транз'єнти у цих клiтинах. Як зразок клiтин з пiдвищеною чутливістю мiофiламентiв до  $Ca^{2+}$  було використано мiоцити трансгенних мишей, що експресують  $Ca^{2+}$ -сенсiбiлізуючий мутант тропонiну Т (TnT) людини (TnT-I79N). Ця мутацiя у людей асоцiюється з синдромом раптової зупинки серця, що спостерiгається у людей у молодому вiцi. Мiоцити трансгенних TnT-I79N-мишей порiвнювали з мiоцитами, в яких експресується людський природний тип тропонiну (WT), або з клiтинами, в котрих експресується TnT-R278C (мутацiя, яка не збiльшує чутливість мiофiламентiв до  $Ca^{2+}$ ). Ми також використовували мишей з мутацiєю TnT (TnT-F110I), яка зумовлювала промiжну збiльшену чутливість до  $Ca^{2+}$  (мiж TnT-I79N та WT). Пiдвищення рiвня вiльного цитозольного кальцiю, викликане прикладанням кофеїну, у мiоцитах iз збiльшеною чутливістю до  $Ca^{2+}$  (TnT-I79N) було значно меншим нiж таке в контролi, хоча загальна кiлькiсть iонiв кальцiю, що видiляється iз CP ( $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$ ), була однаковою (Рис. 2). Кальцiєва буферна ємнiсть мiоцитiв, яка є вiдношенням  $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$  до рiзниці мiж пiковим та базальним значенням концентрацiй вiльного кальцiю ( $\Delta [Ca^{2+}]_i$  що дорiвнює  $[Ca^{2+}]_{\text{сум}} / \Delta [Ca^{2+}]_i$ ), в клiтинах TnT-I79N була значно вищою; таким чином, зв'язування  $Ca^{2+}$  в цих клiтинах було значно iнтенсивнiшим у порiвняннi з такими у мiоцитах контрольних тварин (WT) (рис. 2 В-D). Аналогiчний що до WT результат був отриманий i для мiоцитiв, у котрих експресується несенсiбiлізуючий мутантний тропонiн TnT-R278C (рис. 2 В-D). Мiоцити, що експресують мутантний тропонiн TnT-F110I i мають промiжну чутливість до  $Ca^{2+}$  (див. вище), демонстрували також промiжне значення кальцiєвої буферної ємностi. Аналогiчнi результати було отримано i при використаннi методу, у якому збiльшення  $[Ca^{2+}]_i$  було забезпечене за рахунок входу  $Ca^{2+}$  через потенцiалзалежнi кальцiєвi канали L-типу (Schober et al., 2012). У той же час концентрацiї ключових  $Ca^{2+}$ -зв'язуючих бiлкiв (SERCA, кальсеквестрину, фосфоламбану, НКО та кальмодуліну) в кардiомiоцитах, видiлених з контрольних та мутантних тварин, суттєво не розрiзнялися. Таким чином, ми встановили, що значення кальцiєвої буферної ємностi при збiльшеннi  $[Ca^{2+}]_i$  до рiвня, спостережуваного під час типового скорочення мiоцитiв, є суттєво (статистично достовiрно) бiльшим у кардiомiоцитах, у котрих експресований  $Ca^{2+}$ -сенсiбiлізуючий мутант тропонiну TnT-I79N. Це збiльшення могло виникати завдяки збiльшенню максимальної буферної кальцiєвої ємностi цитозолу ( $V_{\text{max}}$ ) та/або афiнностi зв'язування цитозольного  $Ca^{2+}$ , що

характеризується видимою константою дисоціації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі ( $K_d$ ). Величина  $V_{\max}$  детермінує загальну кількість місць зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі, характеризуючи, таким чином, загальну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків, у той час  $K_d$  характеризує усереднену спорідненість цих білків щодо  $\text{Ca}^{2+}$ .

В наступних експериментах ми вивчали, завдяки чому (змінам  $V_{\max}$  та/або  $K_d$ ) у клітинах із сенсibiliзуючими мутантними молекулами тропоніну Т (TnT-I79N та TnT-F110I) зв'язування цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  збільшено. Для цього криві буферизації було побудовано згідно з експериментальними даними (функції  $\Delta[\text{Ca}]_{\text{сум}}$  як залежності від  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; рис. 2 А). Величини  $K_d$  і  $V_{\max}$  були обчислені із цих кривих для кожного окремого міоцита з використанням модифікованого рівняння Міхаелеса-Ментена,  $[\text{Ca}]_{\text{total}} = C + (V_{\max} * ([\text{Ca}]_i - x_{\text{off}}) / (k_d + ([\text{Ca}]_i - x_{\text{off}})))$  (рис. 2; Schober et al., 2012) за допомогою протоколу Траффорда (Trafford et al., 1999). Обидві  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсibiliзуючі мутації (TnT-I79N та TnT-F110I) зумовлювали значне зниження середнього значення  $K_d$ , але не змінювали максимальну цитозольну буферну ємність клітин  $V_{\max}$ . Значення  $K_d$ , обчислені для несенсibiliзуючого мутанта (TnT-R278C) несуттєво відрізнялись від значень у контрольних міоцитах. У сукупності ці дані демонструють, що мутації у молекулах тропоніну, що збільшують чутливість міофіламентів до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , збільшують кальцієву буферну ємність клітини, знижуючи  $K_d$  для зв'язування цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  (імовірно, через взаємодію TnT, що не зв'язує  $\text{Ca}^{2+}$ , з кальційзв'язуючим тропоніном С).

Потенційне обмеження наведеного вище експериментального підходу полягає в тому, що цитозольне буферування  $\text{Ca}^{2+}$  можливо було експериментально вимірювати у кардіоміоцитах лише в стані спокою, без урахування змін діастолічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , що виникають при зміні частоти їх скорочень цих клітин. Щоб визначити вплив мутацій TnT на цитозольну буферизацію  $\text{Ca}^{2+}$  при різних діастолічних рівнях  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ми спочатку будували повні буферні криві (залежність  $\Delta[\text{Ca}]_{\text{сум}}$  від  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) для всіх груп кардіоміоцитів на основі середніх значень  $K_d$  та  $V_{\max}$ , отриманих експериментально. Зазначимо, що при низьких значеннях  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  буферні криві міоцитів, високочутливих до кальцію (TnT-I79N та TnT-F110I), наростали значно швидше порівняно з кривими для контрольних (WT) та мутантних (TnT-R278C) міоцитів (Schober et al., 2012). Отже, коли концентрація вільного кальцію наприкінці діастолі відносно низька, більша кількість  $\text{Ca}^{2+}$  може бути буферизована. Але, оскільки загальна кількість сайтів зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_{\max}$ ) не змінюється, зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  швидше зазнає насичення в клітинах із збільшеною чутливістю до кальцію (порівняно з несенсibiliзованими міоцитами). В результаті слід очікувати, що кількість іонів кальцію, яка може бути зв'язана сенсibiliзованими міофіламентами, зменшиться швидше, ніж така у несенсibiliзованих міофіламентах (в міру зростання вільного стаціонарного діастолічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Для кількісного визначення цього феномена для кожного генотипу ми розраховували здатність клітин до буферизації систолічних кальцієвих транз'єнтів під час скорочення міоцитів як функцію кінцевої кількості діастолічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Відповідно до експериментальних результатів, цитозольна  $\text{Ca}^{2+}$  буферна ємність у міоцитах TnT-I79N та TnT-F110I є більшою при значеннях діастолічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , що є типовими для стану спокою. Однак під час швидкої стимуляції різниця у потужності буферизації кальцію між групами прогресивно

зменшується і може навіть стати більшою за таку у контрольній групі при високому кінцевому рівні діастолічного  $[Ca^{2+}]_i$ . У сукупності результати проведеного моделювання говорять про те, що сумарний вплив змін афінності зв'язування міофіламентів щодо  $Ca^{2+}$  (Kd) на амплітуду кальцієвих транзйєнтів під час скорочення залежатиме від рівня діастолічного  $[Ca^{2+}]_i$ .

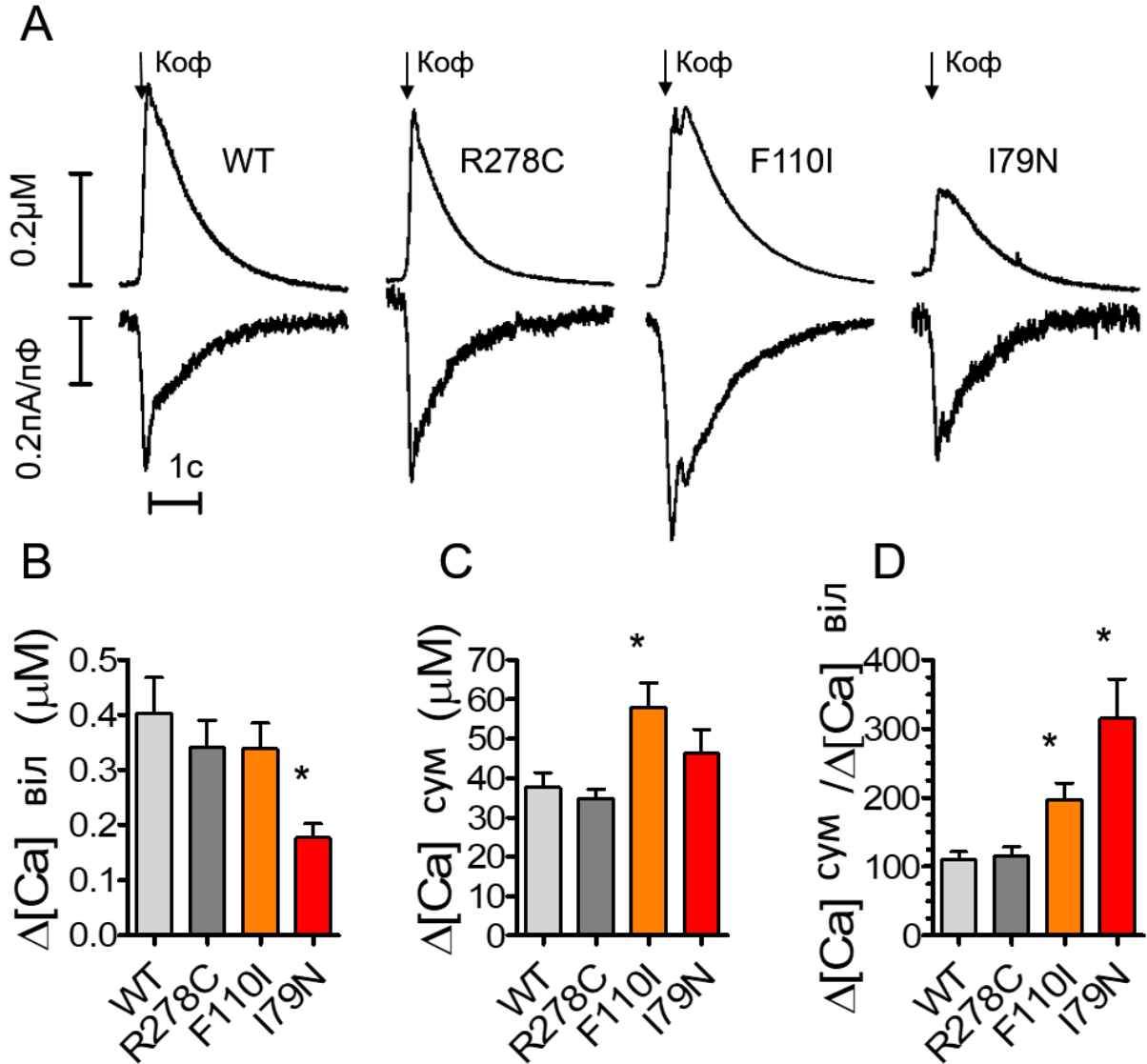


Рис. 2. Мутації тропоніну T (TnT), що зумовлюють збільшення чутливості міофіламентів до  $Ca^{2+}$ , підвищують цитозольне зв'язування  $Ca^{2+}$ . М умовах фіксації потенціалу флуоресценцію цитозольного  $Ca^{2+}$  реєстрували в міоцитах, завантажених флуоресцентним барвником Fluo-4 (25 мкМ). А) Типові реакції кардіоміоцитів мишей, у котрих був експресований тропонін природного типу (WT) або мутантна форма тропоніну (TnT-R278C, TnT-F110I, TnT-I79N). Чутливість міофіламентів до  $Ca^{2+}$  в мутантних клітинах змінювалася у такому порядку: TnT-R278C  $\leq$  TnT-WT < TnT-F110I < TnT-I79N. Верхні криві – транзйєнти  $[Ca^{2+}]_i$ , викликані швидким прикладанням кофеїну, що призводить до вивільненні  $Ca^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуму. Нижні криві – струми  $Na^+-Ca^{2+}$ -обмінника; їх інтеграли відповідають загальній кількості  $Ca^{2+}$ , що вивільняється із СР. В – D) Міоцити, у котрих експресуються  $Ca^{2+}$ -сенсйбілізуючі мутантні форми тропоніну



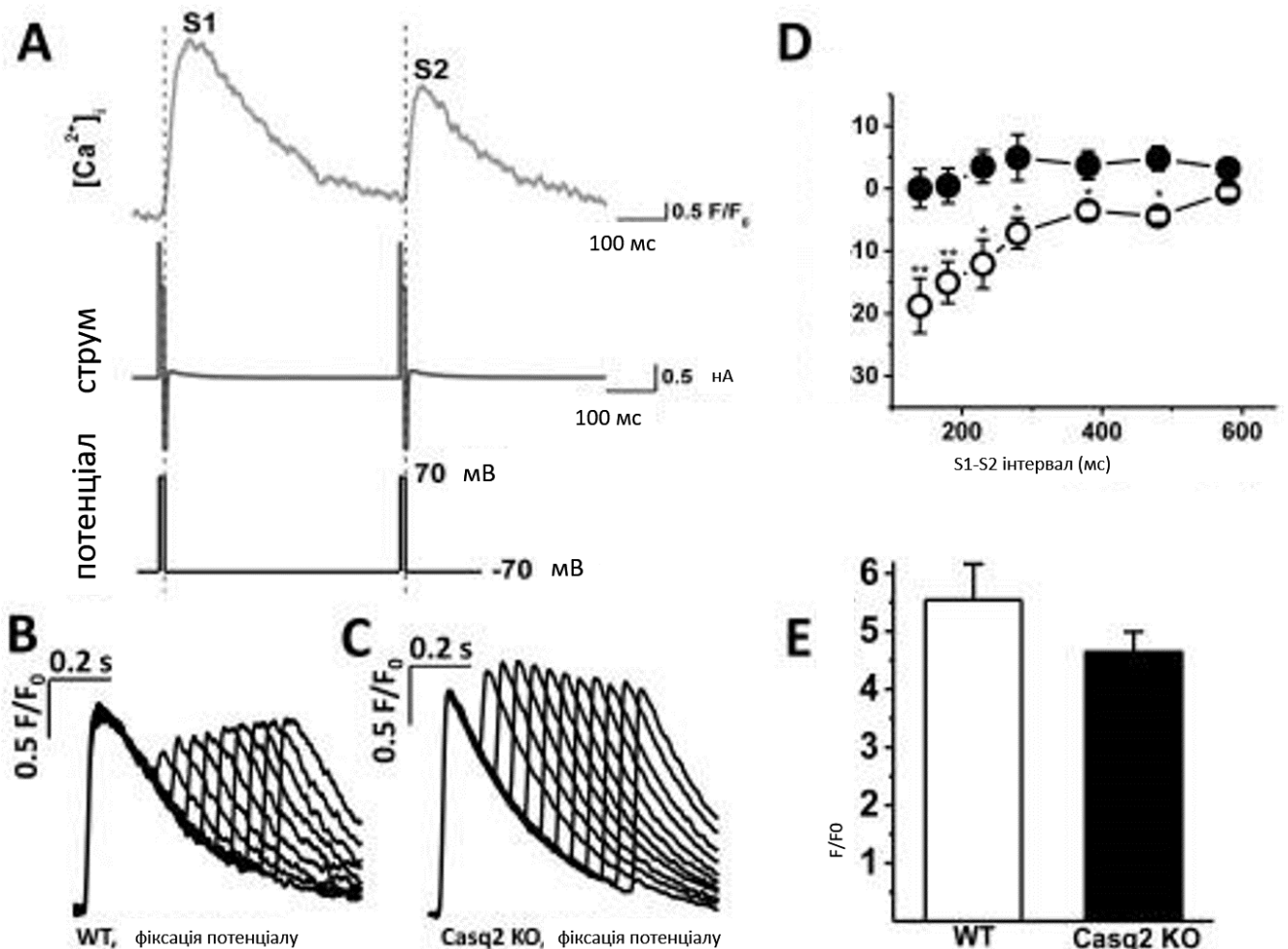
(TnT-F110I, TnT-I79N), демонструють більший рівень зв'язування цитозольного  $Ca^{2+}$  (D) в міоцитах, в порівнянні з контрольними клітинами (WT). Значний рівень зв'язування (вища буферна ємність цитозолу) обчислений як відношення збільшеного сумарного вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР,  $\Delta[Ca]_{\text{сум}}$  (С), до зменшеного зростання рівня вільного  $Ca^{2+}$ ,  $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{віль}}$  (В).  $n = 11-13$  міоцитів у кожній групі. \*\*  $P < 0,01$  проти груп WT і TnT-R278C.

Таким чином, підвищення чутливості кардіоміофіламентів до  $Ca^{2+}$  за рахунок мутації TnT-I79N викликало посилення зв'язування цитозольного вільного кальцію у міоцитах при низькому рівні  $[Ca^{2+}]_i$ . Основною причиною цього було збільшення афінності зв'язування (Kd) цитозольного  $Ca^{2+}$ , тоді як максимальна здатність зв'язування  $Ca^{2+}$  (Vmax) залишалася незмінною. Ефект збільшення афінності за рахунок мутації TnT-I79N суттєво модифікував кальцієву регуляцію в інтактних міоцитах серця миші при фізіологічних частотах серцевих скорочень (5 Hz), в результаті чого збільшувалася кінцева діастолічна  $[Ca^{2+}]_i$ , а також підвищувалися вміст  $Ca^{2+}$  у СР та вивільнення  $Ca^{2+}$  з цієї органели після діастолічної паузи. Такі значні зміни у кальцієвій регуляції кардіоміоцитів можуть бути основою для модуляції патерна серцевих скорочень у пацієнтів з мутацією тропоніну TnT-I79N і в підсумку призводити до синдрому раптової зупинки серця.

**Роль кальсеквестрину2 (Casq2) у регуляції рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуму шлуночкових міоцитів.** Шлуночкові міоцити, виділені з мишей з нокаутом гена Casq2 (Casq2 KO), демонструють підвищену частоту передчасних спонтанних викидів  $Ca^{2+}$ , затриману післядеполяризацію, а також індуковану катехоламіном шлуночкову аритмію *in vivo* (Knollmann, 2006). Кальційзв'язуючий білок ретикулуму Casq2 зв'язується з RyR2 ретикулуму або безпосередньо, або через два інші СР-білки - кондентін і тріадін. Останні разом утворюють одиницю вивільнення  $Ca^{2+}$  із СР. Функційно,  $Ca^{2+}$ , що надходить через потенціалзалежні кальцієві канали Cav1.2 під час потенціалу дії, викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  з ретикулуму. У разі генерації двох послідовних ПД амплітуда другого  $Ca^{2+}$  транзйенту залежить від діастолічного інтервалу, який передував другому стимулу; саме це явище кваліфікується як рефрактерність вивільнення  $Ca^{2+}$ . Оскільки кальцієвий струм через іонні канали Cav1.2 слугує пусковим механізмом для вивільнення  $Ca^{2+}$  із ретикулуму під час потенціалу дії кардіоміоцитів, рефрактерність каналів Cav1.2 може бути одним із потенційних факторів рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  із згаданої органели. Для перевірки цієї гіпотези ми використали метод фіксації потенціалу у конфігурації ціла клітина. "Хвостові" струми (tail) через іонні канали Cav1.2 використовувались для активації вивільнення  $Ca^{2+}$  із СР (рис.3 А). Такий підхід дозволяє підтримувати кальцієвий струм по суті постійним і, таким чином, виключати можливу рефрактерність каналів Cav1.2. На фрагментах рис.3 В і С наведені реєстрації транзйентів  $[Ca^{2+}]_i$ , що спостерігалися в контрольних (WT) і нокаутних (Casq2 KO) кардіоміоцитах. Порівняння відповідних записів кальцієвих транзйентів із використанням двох різних підходів (фіксації струму та фіксації потенціалу) демонструє важливість рефрактерності іонних каналів Cav1.2 щодо рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  із ретикулуму як у контрольних, так і у Casq2

*KO* міоцитах (Рис. 2 і 3 в роботі Kryshal et al., 2015). Усереднені криві відновлення кальцієвих транзєнтів були побудовані для кожної експериментальної групи (рис. 3 D); ці графіки демонструють майже повну відсутність рефрактерності вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР у міоцитах *Casq2 KO*. У той же час вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у СР, оцінений за амплітудою  $\text{Ca}^{2+}$  транзєнтів, виниклих у відповідь на швидке прикладання кофеїну (10 мМ), був практично однаковим в обох групах клітин (Рис. 3 E). Відновлення кальцієвого струму після  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної інактивації у *Casq2 KO* міоцитах було значно швидшим порівняно із такими у контрольних клітинах (WT). І навпаки, потенціалзалежна інактивація, що вимірювалася в умовах використання  $\text{Ba}^{2+}$  як носія заряду, в контрольних міоцитах та нокаутних клітинах істотно не розрізнялася.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна інактивація *Cav1.2* в *Casq2 KO* міоцитах нормалізувалася при внутрішньоклітинному діалізі із доданням у розчин кальцій-зв'язуючого білку кальмодуліну (CaM, 20 мкМ); це також частково відновлювало фізіологічну рефрактерність вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах *Casq2 KO*.

Отже, білок саркоплазматичного ретикулулу *Casq2* відповідає значною мірою за рефрактерність вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ретикулулу шлуночкових міоцитів миші. Описані вище експерименти також вказують на новий механізм порушення CaM-залежної інактивації іонних каналів *Cav1.2*. Цей феномен сприяє втраті рефрактерності вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР миші у моделі *Casq2 KO* і, отже, може бути фактором, що додатково підвищує ризик виникнення шлуночкової аритмії *in vivo*.



*Рис. 3. Рефрактерність вивільнення  $Ca^{2+}$  із СР у міоцитах в умовах фіксації потенціалу. А) Протокол фіксації потенціалу, відповідні мембранні струми та зміни  $[Ca^{2+}]_i$  (нижня, середня та верхня криві відповідно) під час стимулів S1 і S2, що використовувалися для оцінки рефрактерності вивільнення  $Ca^{2+}$  в кардіоміоцитах. Щоб підтримувати однаковий вхід  $Ca^{2+}$ , активація вивільнення  $Ca^{2+}$  із СР була опосередкована за допомогою хвостових струмів  $I_{Ca}$ , які викликали максимальне вивільнення  $Ca^{2+}$  під час стимулу S1. В і С) Приклади  $Ca^{2+}$  транз'єнтів, зареєстрованих в міоцитах WT та Casq2 KO відповідно, при стимуляції за протоколом S1 – S2, що показаний на рис.3 А. D) Кількість  $Ca^{2+}$ , що вивільняється під час стимулу S2, змінюється внаслідок зміни інтервалу S1 – S2 ( $n = 12$ , для клітин WT – відкриті кола, Casq2 KO – чорні кола; \*\*  $P < 0,005$ , \*  $P < 0,05$ ). E, вміст  $Ca^{2+}$  у СР, виміряний за допомогою швидкого прикладання кофеїну ( $n = 8$  міоцитів у кожній групі).*

### **Кальцієва сигналізація в електрично незбудливих клітинах.**

**Депозалежні кальцієві трансмембранні струми в ацинарних клітинах підшлункової залози.** На відміну від нервових, м'язових та деяких ендокринних клітин, екзокринні клітини не мають потенціалкерованих кальцієвих каналів у їхній плазматичній мембрані, а цитозольні  $Ca^{2+}$  сигнали, що керують секрецією ацинарних клітин, в основному генеруються завдяки вивільненням  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо, головним чином ендоплазматичного ретикулуму. Механізм компенсаційного поповнення  $Ca^{2+}$  із зовнішнього розчину відомий як депокерований, або вхід  $Ca^{2+}$ , активований вивільненням  $Ca^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулуму (CRAC). В наших дослідах наявність депозалежних кальцієвих каналів в плазматичній мембрані ацинарних клітин була перевірена за допомогою фіксації потенціалу в конфігурації “ціла клітина”. В ізольованих клітинах підшлункової залози миші CRAC-канали було активовано за допомогою блокування насосів ( $Ca^{2+}$ -АТФази) ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном. Прикладання 2 мкМ тапсигаргіну призводило до повільної активації трансмембранного струму з середнім значенням максимальної амплітуди  $8,4 \pm 0,6$  пА ( $n = 35$ , або  $0,349$  пА/пФ;  $C_m = 22,3 \pm 1,7$  пФ) при потенціалі мембрани  $-50$  мВ та  $[Ca^{2+}]_o = 10$  мМ (рис. 4 А). Заміна позаклітинного  $Na^+$  на NMDG<sup>+</sup> мало впливала на струм або зовсім не змінювало його, тоді як зменшення  $[Ca^{2+}]_o$  від 10 до 1 мМ спричиняло помітне зменшення вхідного струму ( $n = 7$ ). Депозалежний вхідний струм блокувався в разі прикладання 100 мкМ 2-аміноетоксидифеніл борату (2-APB) ( $n = 7$ ; останній є відомим неспецифічним блокатором каналів CRAC). Наступним етапом дослідження було встановлення принципового зв'язку між ініціюванням цього току та спустошенням ендоплазматичного ретикулуму. За для цього депозалежний кальцієвий струм реєструвався в експериментах із паралельним відстежуванням змін концентрації  $Ca^{2+}$  всередині ендоплазматичного ретикулуму. Індукований прикладанням тапсигаргіну вхідний струм розвивався після зниження концентрації  $Ca^{2+}$  у депо ендоплазматичного ретикулуму із затримкою ( $n = 9$ ; рис. 4 С). Прикладання блокатору CRAC каналів GSK-7975A (10 мкМ) викликало зменшення (у середньому на  $83,0 \pm 4,1\%$ ) тапсигаргініндукованого струму ( $n=6$ ; рис.

4 D). Проведені експерименти вказують на наявність прямої кореляції між спустошенням ендоплазматичного ретикулуму та розвитком трансмембранного кальцієвого струму.

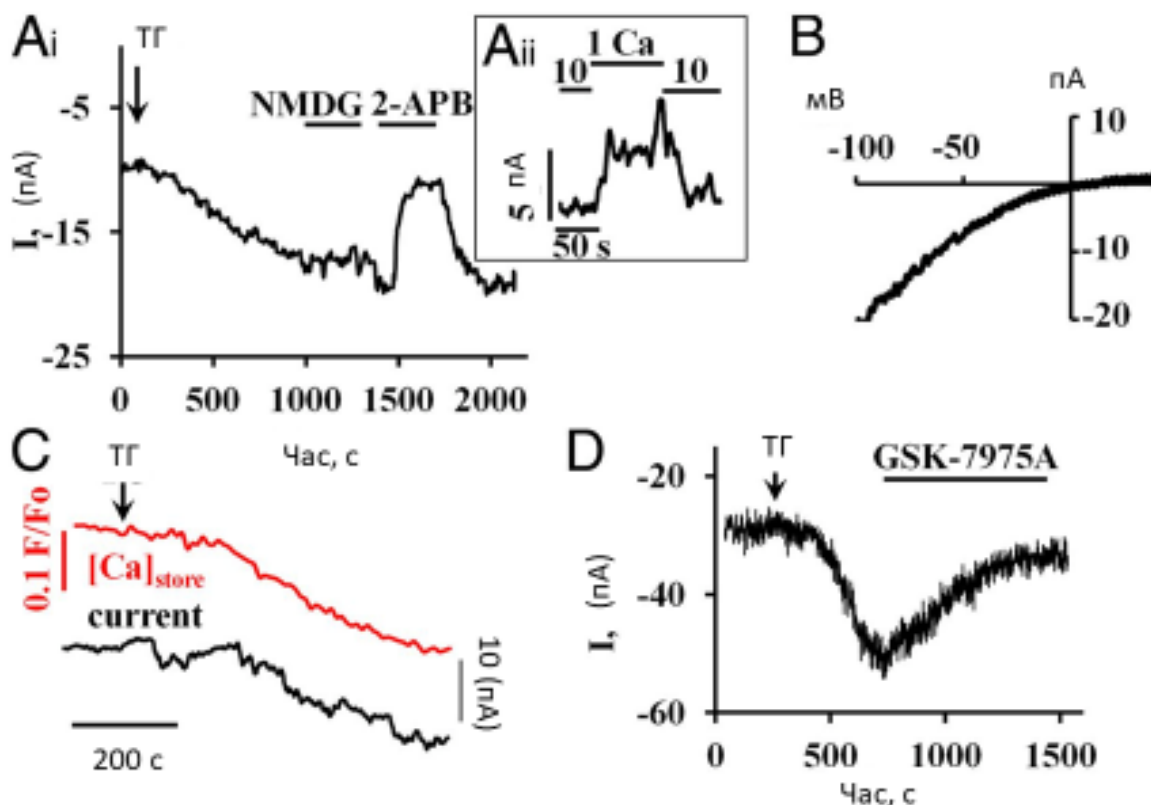


Рис. 4. Депозалежні вхідні струми, що розвивалися в ацинарних клітинах підшлункової залози після прикладання тапсигаргіну. Струми зареєстрували при підтримуваному потенціалі на мембрані  $-50$  мВ та зовнішній  $[Ca^{2+}]$   $10$  мМ. Для запобігання активації  $Ca^{2+}$ -залежних струмів електроди заповнювали розчином, що вміщував суміш  $10$  мМ ВАРТА і  $2$  мМ  $Ca^{2+}$ . А) Вхідний струм був індукований прикладанням  $2$  мкМ тапсигаргіну для спорожнення ретикулуму. Заміна  $Na^+$  на  $NMDG^+$  мало впливала на амплітуду струму, але прикладання  $100$  мкМ  $2$ -АРВ зворотно блокувало депозалежний струм. Зниження зовнішньої концентрації  $Ca^{2+}$  з  $10$  до  $1$  мМ (заміна  $CaCl_2$  на  $MgCl_2$ ) зворотно зменшувало амплітуду вхідного струму. В) Вольт-амперна крива, отримана за допомогою ремп-протоколу ( $0,4$  В/с) від  $-100$  мВ до  $40$  мВ (різниця між ремп-реєстраціями до і після застосування  $2$ -АРВ). С) Одночасне вимірювання змін  $[Ca^{2+}]$  у ретикулумі та мембранного струму при прикладанні тапсигаргіну. Верхня крива – поступове зниження концентрації  $Ca^{2+}$  у ендоплазматичному ретикулумі, що реєструвалося як зміни флуоресценції  $Fluo-5N$ ; нижня крива – розвиток вхідного струму. D)  $GSK-7975A$  ( $10$  мкМ) помітно пригнічував вхідний струм, викликаний прикладанням  $2$  мкМ тапсигаргіну.

**Вплив CRAC-каналів на зміни  $[Ca^{2+}]_i$ , викликані етиловим ефіром пальмітолеїнової кислоти.** Відомо, що стійке підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  всередині ацинарних клітин підшлункової залози може викликати некроз клітин та призводити до розвитку багатьох патологій. Серед останніх слід насамперед вказати гострий панкреатит, який може бути опосередкований впливом алкоголю та жирних кислот (Huang, 2014; Wang et al., 2009). При цьому етилові ефіри жирних кислот (РОАЕЕ) є дуже потужними агентами, що посилюють панкреатит, спричинений впливом алкоголю. Найбільш очевидним поясненням РОАЕЕ-викликаного підвищення рівня  $[Ca^{2+}]_i$  є активація струму через кальцієві канали, що активовані вивільненням кальцію із ендоплазматичного ретикулуму.

Ми висловили гіпотезу, що фармакологічна блокада CRAC може запобігти стійкому підвищенню  $[Ca^{2+}]_i$ , а отже, активації протеаз та розвитку некрозу. Для перевірки цієї гіпотези були проведені експерименти з дослідженням впливу блокування CRAC на РОАЕЕ-індуковані зміни  $[Ca^{2+}]_i$ . Прикладання РОАЕЕ викликає значне і тривале підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в ізольованих ацинарних клітинах підшлункової залози. На рис. 5А показано істотне стійке зростання  $[Ca^{2+}]_i$ , що викликається прикладанням 100 мкМ РОАЕЕ, а також зміни  $[Ca^{2+}]_i$ , що були викликані РОАЕЕ у тій же концентрації в присутності блокатора CRAC-каналів GSK-7975A. Рисунок 5 В показує середні значення даних, отриманих в цій серії експериментів; видно, що GSK-7975A значно та статистично достовірно інгібує РОАЕЕ-індуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ . Преінкубація (1 год) ацинарних клітин підшлункової залози з 100 мкМ РОАЕЕ викликала істотне підвищення активності протеази всередині клітини (з  $6,8 \pm 1,3\%$  в контролі, до  $31,2 \pm 1,6\%$ , рис. 5С), що веде до розвитку некрозу. Попередня обробка клітин 10 мкМ GSK-7975A за 10 хв до застосування РОАЕЕ знижувала активність протеази до рівнів, близьких до контрольних (рис. 5С). Оскільки GSK-7975A блокує РОАЕЕ-індуковане збільшення  $[Ca^{2+}]_i$ , а також активацію протеази, ми дослідили вплив цього блокатора на інтенсивність РОАЕЕ-індукованого некрозу ацинарних клітин. Як показано на рис. 5D і 5E, GSK-7975A дійсно запобігав розвитку некрозу, викликаного РОАЕЕ, і цей ефект був залежний від концентрації блокатора. Захисний ефект був помітний навіть при 3 мкМ GSK-7975A, а при 10 мкМ кількість некротичних клітин була близька до контрольних значень (без аплікації РОАЕЕ) (рис. 5D).

На даний час не існує ефективною специфічної терапії гострого панкреатиту, але наші дані свідчать про те, що фармакологічне блокування кальцієвого струму, що активується спустошенням кальцієвих депо, є вискооефективним засобом протидії токсичному підвищенню рівня  $[Ca^{2+}]_i$ , активності трипсину та/або протеази і некрозу ацинарних клітин. Тому подібний захід може розглядатися як новий потенційний терапевтичний підхід у лікуванні гострого панкреатиту, і можливість його застосування у клініці заслуговує подальшого спеціального дослідження.

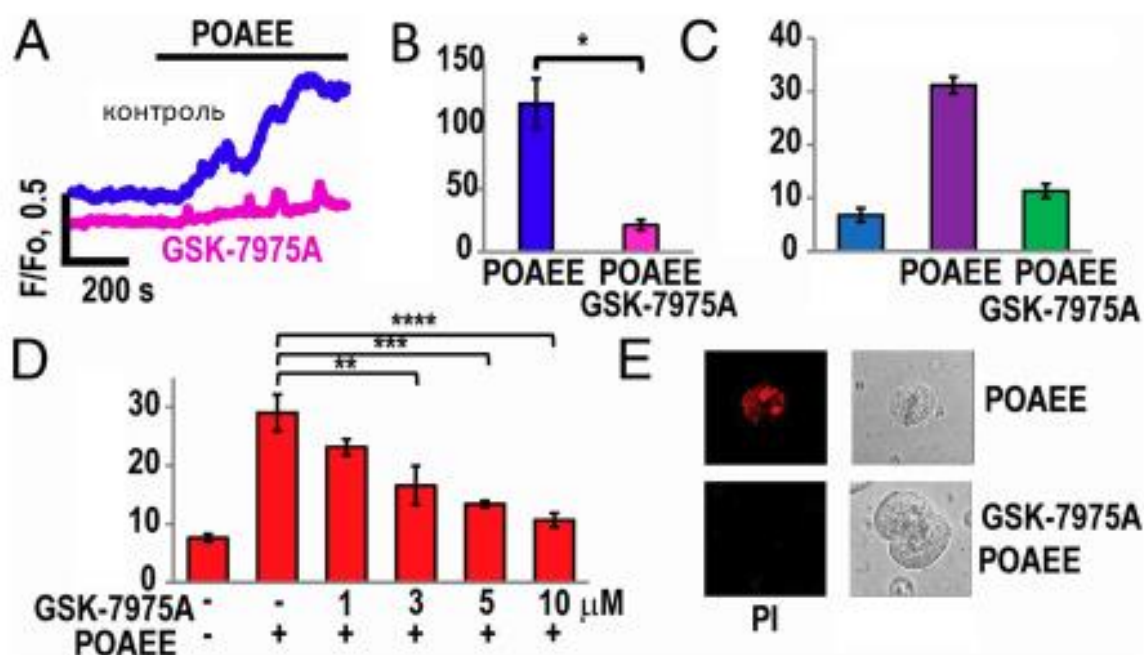


Рис. 5. GSK-7975A різко блокує підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в ацинарних клітинах та знижує їх некроз, спричинений етиловим ефіром жирних кислот POAEE. А) Криві змін  $[Ca^{2+}]_i$  у відповідь на прикладання 100 мкМ POAEE за відсутності ( $n = 8$ , верхня крива) та наявності GSK-7975A (10 мкМ) ( $n = 12$ , нижня крива). В) Кількісний аналіз результатів експериментів, показаних на А, з порівнянням інтегралу кривої  $[Ca^{2+}]_i$  над базовою лінією (площа під кривою), зареєстрованої протягом перших 10 хв прикладання POAEE. Лівий стовпчик – контроль (без додавання GSK-7975A), правий – результати тесту (клітини були попередньо оброблені 10 мкМ GSK7975A за 10 хв до нанесення POAEE; середні значення відрізнялися достовірно,  $P < 0,0002$ ). С) Попередня обробка клітин 10 мкМ GSK7975A протягом 10 хв інгібує активацію протеази (на 64%; правий стовпчик), індуковану POAEE (100 мкМ; середній стовпчик), що вимірювалася за допомогою протеазного субстрату біс-L-аспарагінової кислоти аміда родаміну 110 (D2-R110). Лівий стовпчик – активність протеаз у контрольних клітинах (без додавання POAEE). Середні значення активності протеаз у контролі та при додаванні GSK-7975A плюс POAEE розрізнялися несуттєво,  $P = 0,05$ ;  $n = 4$ ,  $> 200$  клітин у кожній групі. D) Некроз, індукований POAEE (100 мкМ), різко зменшувався в клітинах, оброблених GSK-7975A 1 мкМ, 3 мкМ, 5 мкМ та 10 мкМ протягом 10 хв. У контрольній серії експериментів (без додавання POAEE) інтенсивність некрозу була низькою ( $n = 3$  серії експериментів із кількістю досліджених клітин у кожній групі  $> 350$ ). Інгібування некрозу було значним у разі прикладання 3 мкМ GSK-7975A (\*\*  $P < 0,02$ ) та ще більшим при 5 та 10 мкМ GSK-7975A (\*\*\*)  $P < 0,003$  та \*\*\*\*  $P < 0,001$ ). Е) Некроз

клітин візуалізували шляхом забарвлення їх пропідія йодидом (PI). Всі експерименти проводили в присутності 1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

**Кальцієва сигналізація в зірчастих клітинах підшлункової залози.** На відміну від ацинарних клітин, нещодавно виявленим зірчастим клітинам підшлункової залози, що розташовані навколо основи ацинусу, поки що приділено значно меншої уваги, їх функційній властивості, були досліджені тільки в умовах культивування ізольованих клітин (Wells a. Crawford, 1998). Згідно з цими даними, в нормі зірчасті клітини підшлункової залози (ЗКПЗ) розглядаються як неактивні. Вони активуються лише при хронічному панкреатиті та раку підшлункової залози, коли підсилюється їх проліферація та секреція компонентів позаклітинного матриксу. Останній феномен відіграє важливу роль у фіброзі підшлункової залози. Для дослідження ЗКПЗ в їх природному оточенні ми вперше використовували не поодинокі ізольовані культивовані клітини, а часточки (лобули) ендогенної частини підшлункової залози. В нашому дослідженні ми порівняли кальцієву сигналізацію в ЗКПЗ та в сусідніх ацинарних клітинах. Було виявлене повне розділення кальцієвих сигналів навіть у сусідніх прилеглих одна до одної зірчастих та ацинарних клітинах, тобто кальцієві транзйенти, що виникали в ацинарних клітинах внаслідок їх стимуляції, не розповсюджувалися у ЗКПЗ. Завантаження ЗКПЗ кальційчутливим барвником Fluo-4 проходило значно швидше, ніж таке ацинарних клітин. Це зробило можливим як візуалізацію ЗКПЗ, так і відокремлення флуоресцентних сигналів у цих клітинах від сигналів у оточуючих клітинах підшлункової залози. Так, з'ясувалось, що ЗКПЗ з'єднані одна з одною і утворюють в залозі структуру, подібну до риболовної мережі. У наших експериментах з'ясувалось, що короткочасне прикладання АТФ (100 мкМ) до ЗКПЗ у звичайному мікросередовищі викликало кальцієві сигнали в багатьох аналогічних сусідніх клітинах (41 з 107 досліджених клітин). У той же час викликане АТФ зростання [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> у ЗКПЗ ніколи не передавалось сусіднім ацинарним клітинам. Крім того, прикладання брадикініну (БК, 1 нМ) у наномолярних концентраціях призводило до різкого підвищення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, за яким спостерігалась триваліша фаза (плато) підвищення цієї концентрації (рис. 6). В сусідніх ацинарних клітинах ніколи не спостерігали жодних змін у [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> під час БК-індукованих кальцієвих сигналів в ЗКПЗ (> 100 тестувань), що вказує на відсутність функційних БК-рецепторів в ацинарних клітинах та відсутність прямого зв'язку між сусідніми ЗКПЗ та ацинарними клітинами. Було висловлено припущення, що викликане холецистокініном (ССК, гормон, що стимулює секрецію ферментів травлення з ацинарних клітин) вивільнення ацетилхоліну з ЗКПЗ може, в свою чергу, активувати ацинарні клітини, і що це могло б розглядатися як нормальний механізм ССК-індукованої секреції, в ацинарних клітинах (Phillips et al, 2010). Проте ми не знайшли жодних доказів цієї гіпотези, оскільки в наших препаратах прикладання ССК ніколи не викликало помітних кальцієвих сигналів в ЗКПЗ ( $n = 17$ ; при [ССК] = 10 нМ), а кальцієві тест-сигнали в ЗКПЗ ніколи не передавалися до сусідніх ацинарних клітин. Крім того, слід підкреслити, що флуоресцентно мічені антитіла до рецепторів ССК1 чітко підтвердили наявність рецепторів цього гормону на ацинарних клітинах, але ці рецептори не були ідентифіковані на мембрані ЗКПЗ ( $n = 4$ ).

Прикладання БК у концентраціях, що відповідають підвищеному рівню БК в плазмі крові (це одна з ознак захворювання на гострий панкреатит *in vivo*), викликало значні коливання  $[Ca^{2+}]_i$  у ЗПКЗ, але цього ніколи не спостерігалось в сусідніх ацинарних клітинах. Виявилось, що БК в дуже низьких концентраціях (близьких до 100 пМ;  $n = 14$ ), здатний викликати кальцієві сигнали в ЗПКЗ. Максимальні відповіді спостерігалися при концентрації БК 1 нМ ( $n = 9$ ). Антагоніст БК рецепторів другого типу (В2) WIN64338 (WIN) блокував згадані вище кальцієві сигнали, що викликалися прикладанням БК ( $n = 27$ ), і цей ефект був зворотним (рис. 6 А). З іншого боку, блокатор В1-рецепторів R-715 не пригнічував В2-індуковані зміни  $[Ca^{2+}]_i$  в ЗПКЗ ( $n = 8$ ; рис. 6В). Крім того, специфічний агоніст В1-рецепторів Sar-des-Arg-БК не викликав жодних змін  $[Ca^{2+}]_i$  в цих клітинах ( $n = 8$ ; рис. 6 С). Можна зробити висновок, що фаза плато у відповідях на прикладання БК певною мірою залежить від тривалості активації В2-рецепторів, оскільки застосування блокатору WIN64338 відразу після початкового БК-індукованого піку  $[Ca^{2+}]_i$  істотно скорочувало тривалість фази кальцієвого плато (рис. 6 D).

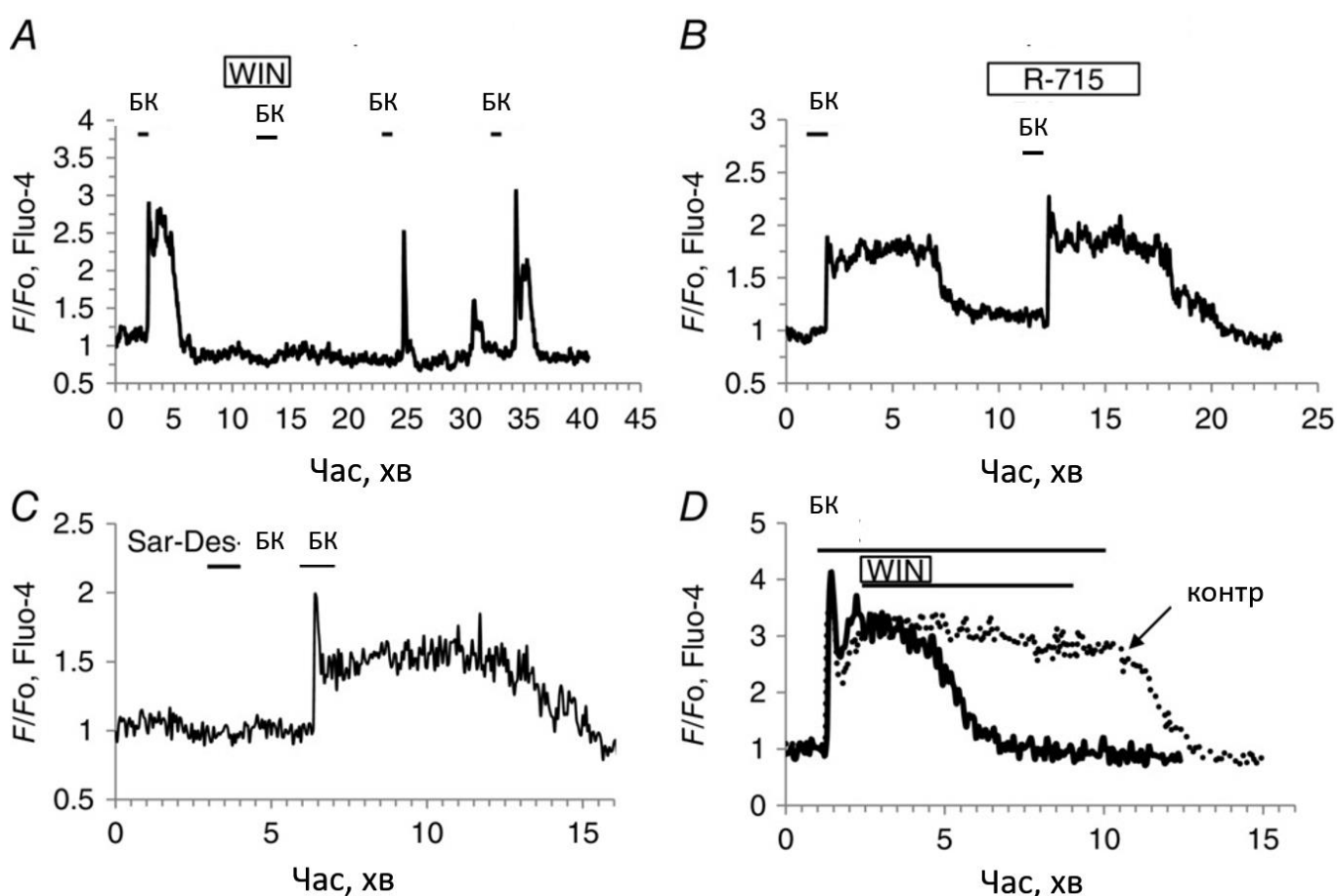


Рис. 6. Фармакологічні властивості БК-рецепторів. А) Антагоніст В2-рецептора WIN64338 (10 мкМ) цілком і зворотно блокував кальцієві відповіді ЗПКЗ, викликані прикладанням БК (1 нМ), причому блокувався як пік транзйєнту ( $P < 0,000003$ ), так і фаза плато ( $P < 0,00004$ ). В) Антагоніст В1-рецепторів R-715 (10 мкМ) не блокував кальцієві сигнали, викликані прикладанням 1 нМ БК. С) Агоніст В1-



рецепторів *Sar-des-Arg-БК* (1 мкМ) не викликав підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в ЗПКЗ, тоді як подальше застосування БК (1 нМ) викликало кальцієві відповіді. D) Антагоніст В2-рецепторів WIN64338, застосований після розвитку початкової швидкої фази кальцієвої відповіді на прикладання БК, помітно зменшував тривалість фази плато кальцієвої відповіді.

Кальцієві сигнали, індуковані прикладанням БК, складаються з короткої транзйентної фази та подальшої тривалої фази плато. Видалення позаклітинного  $Ca^{2+}$  не зменшувало початкової фази кальцієвих сигналів, викликаних БК, але усувало наступну фазу плато (рис. 7 А і 7 В). Повернення іонів  $Ca^{2+}$  в зовнішній розчин призводило до тимчасового збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  та давало змогу наступному прикладанню БК викликати нормальні кальцієві відповіді (рис. 7 А і 7 В). Ми перевірили здатність ЗПКЗ генерувати депокерований кальцієвий струм, використовуючи "класичний" протокол для оцінки цього явища (рис. 6 С), та циклопіазонову кислоту (ЦПК) для блокування кальцієвих насосів ендоплазматичного ретикулуму. Після прикладання БК в розчині, що не містив іонів кальцію, додавання  $Ca^{2+}$  в зовнішній розчин спричиняло тимчасове підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ ; якщо повторне додавання  $Ca^{2+}$  відбувалося після тривалого блокування кальцієвих насосів ендоплазматичного ретикулуму, підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  зберігалося (рис. 7 С). У цій ситуації кальцієві депокеровані канали плазматичної мембрани не здатні забезпечити перенаповнювання ендоплазматичного ретикулуму іонами  $Ca^{2+}$ .

Неспецифічний блокатор каналів CRAC 2-APB блокував генерування В2-індукованих кальцієвих сигналів (рис. 7 D), що може бути пов'язано з блокуванням  $IP_3$ -рецепторів. Ми також використали більш специфічний блокатор депозалежних каналів GSK-7975A. Останній, як було згадано вище, блокує струми CRAC в ацинарних клітинах. В подальших експериментах з'ясувалося, що GSK-7975A реверсивно усуває фазу плато у відповідях, спричинених прикладанням БК, не впливаючи при цьому на початковий пік  $[Ca^{2+}]_i$  ( $n = 9$ ; рис. 7 E). GSK-7975A також блокував вхід  $Ca^{2+}$ , який зазвичай виникає, коли зовнішній  $Ca^{2+}$  повторно додавався після періоду утримання клітин у безкальцієвому розчині ( $n = 14$ ; рис. 7 F).

Нарешті було досліджено механізм, що лежить в основі виникнення початкової швидкої фази кальцієвого сигналу у відповідь на стимуляцію БК. Встановивши, що це пов'язано з вивільненням  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо (рис. 7 А), ми припустили, що це звільнення  $Ca^{2+}$  відбувається через  $IP_3$ -рецептори. На даний час добре відомо, що кофеїн гальмує відкриття цих рецепторів (Foskett et al., 2007) ; тому ми використали кофеїн для перевірки нашого припущення. Як видно на рис. 7 G, кофеїн зворотно блокував  $Ca^{2+}$  транзйєнти у відповідь на активацію В2-рецепторів ( $n = 29$ ). БК, ймовірно, активує фосфоліпазу С, оскільки U73122 (блокатор фосфоліпази С) блокував здатність БК викликати кальцієві сигнали в зірчастих клітинах ( $n = 14$ ; рис. 7 H).

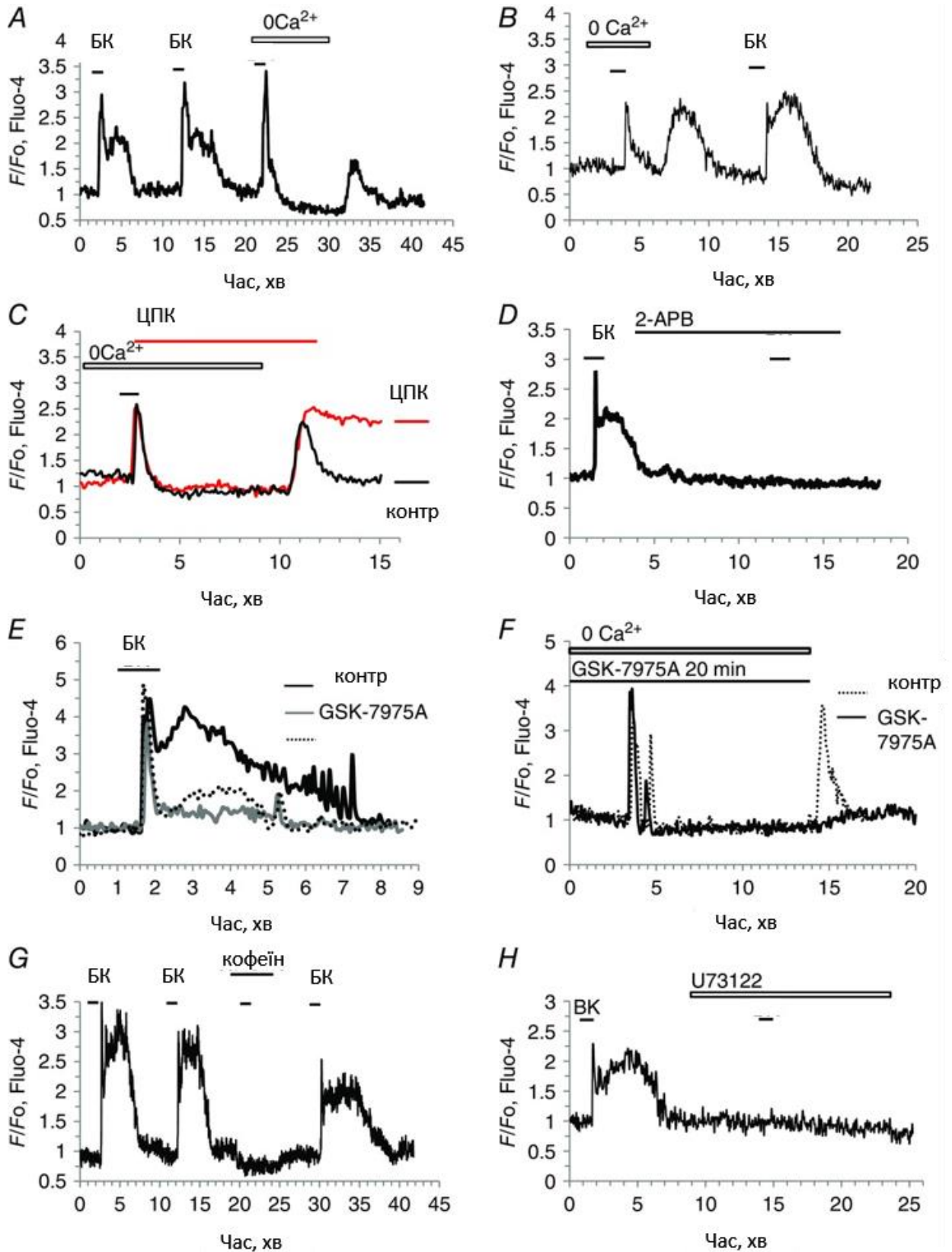


Рис. 7. Механізми генерації кальцієвих відповідей в ЗКПЗ, що викликаються прикладанням БК. А і В) Видалення зовнішнього  $Ca^{2+}$  не впливає на початковий підйом  $[Ca^{2+}]_i$ , викликаний БК (1 нМ,  $P > 0,7$ ), але усуває наступну фазу плато ( $P < 0,0003$ ). Повернення зовнішнього  $Ca^{2+}$  (за відсутності стимуляції БК) викликає тимчасове підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ . С) У присутності 20 мкМ ЦПК (інгібітору SERCA), підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  після додавання зовнішнього  $Ca^{2+}$  подовжується. D) Прикладання 100 мкМ 2-

APB (антагоніста  $IP_3$ -рецепторів та інгібітора CRAC-каналів) блокує кальцієві сигнали, що викликаються БК (1 нМ). Е) Блокатор CRAC-каналів GSK-7975A (10 мкМ) помітно зменшував амплітуду фази плато, що викликала прикладанням БК (1 нМ) ( $P < 0,0015$ ). Відмивання GSK-7975A частково відновлювало відповідь на БК ( $P < 0,009$ ). F) GSK-7975A (10 мкМ) не блокував початковий пік кальцієвого сигналу, викликаний прикладанням БК, що спостерігалось за відсутності зовнішнього  $Ca^{2+}$ . Проте цей блокатор переешкоджав підвищенню  $[Ca^{2+}]_i$ , що відбувається зазвичай при поверненні зовнішнього  $Ca^{2+}$ . G) Кофеїн (30 мМ) реверсивно блокував кальцієві відповіді, викликані прикладанням БК (1 нМ). H) 30 мкМ U73122 (інгібітор фосфоліпази C) усував появу як початкового піку ( $P < 0,0002$ ), так і фази плато ( $P < 0,00001$ ) кальцієвої відповіді, викликані прикладанням БК (1 нМ).

**Кальцієва сигналізація в інших клітинах екзокринної частини підшлункової залози.** В екзокринній тканині підшлункової залози домінують ацинарні клітини (Volender, 1974), але там є й інші важливі клітини, наприклад нейрони та ЗКПЗ. Встановлено, що ацинарні клітини електрично незбудливі; вони не здатні генерувати потенціали дії і не мають кальцієвих каналів, що активуються змінами мембранного потенціалу (Petersen, 1992). Функційна іннервація ацинарних клітин парасимпатичними нейронами є фізіологічно важливою і детально вивчена (Petersen, 1992). У той же час невідомо, чи інервуються ЗКПЗ автономною нервовою системою та яку роль відіграє кальцієва сигналізація нервових клітин, присутніх у структурі кластерів підшлункової залози, на ЗКПЗ. Кальцієва сигналізація одночасно досліджувалася в різних типах клітин в структурі кластерів, отриманих з підшлункової залози, і при цьому порівнювалися відповіді на різні подразники. Для перевірки наявності нервових клітин в кластерах та можливості того, що стимуляція подібних нейронів здатна викликати кальцієві сигнали в ацинарних або інших клітинах, до кластерів прикладався розчин з високою концентрацією іонів  $K^+$  (100 мМ). Це викликало виникнення  $[Ca^{2+}]_i$  транз'єнтів у деяких відносно великих клітинах; останні виявилися кількісно домінуючими ацинарними клітинами (рис. 8). В той же час  $[Ca^{2+}]_i$  у ЗКПЗ не збільшувалася, але в одній малій клітині кластера, частково перекритій ЗКПЗ, був зареєстрований великий кальцієвий транз'єнт. Ця клітина, скоріше за все, була саме нейроном. “Яскраві” клітини, показані на рис.8 Аii, були саме ЗКПЗ. Це додатково було підтверджено, коли такі клітини флуоресціювали значно яскравіше після стимуляції БК (1 нМ), тобто в них підвищувалася  $[Ca^{2+}]_i$ , (рис. 8 Аiv). Нарешті, досліджувані кластери стимулювали прикладанням АТФ (100 мкМ), що спричиняло збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  в ацинарних клітинах та в клітині (зелена на схемі на рис. 8 А), яка не реагувала на прикладання БК або високий рівень  $K^+$ . Як з'ясувалося в подальших дослідках, цією клітиною виявилися імунна клітина (скоріш за все макрофаг). Мало ймовірно, що будь-яка з досліджуваних нами клітин ацинарного кластеру могла б бути  $\beta$ -клітиною. Ми, проте, все-таки перевірили таку вірогідність, використовуючи стандартний протокол активації  $[Ca^{2+}]_i$  транз'єнтів у  $\beta$ -клітинах, а саме шляхом підвищення зовнішньої концентрації глюкози від 2 до 10 мМ. У жодна з досліджуваних клітин в структурі кластерів  $[Ca^{2+}]_i$  транз'єнти у відповідь на стимуляцію глюкозою не генерувалися; отже ці клітини не являли собою  $\beta$ -

клітини. Подальші дослідження з використанням імуноцитохімічних методів показали, що такі АТФ-чутливі клітини є імунними клітинами, здебільшою частиною макрофагами. Отже, в панкреатичних лобулах імунні та нечисленні нервові клітини розташовані в місцях скопичення зіркоподібних клітин. Це спостереження може вказувати на ще одну досі невідому роль зіркоподібних клітин у функціонуванні підшлункової залози.

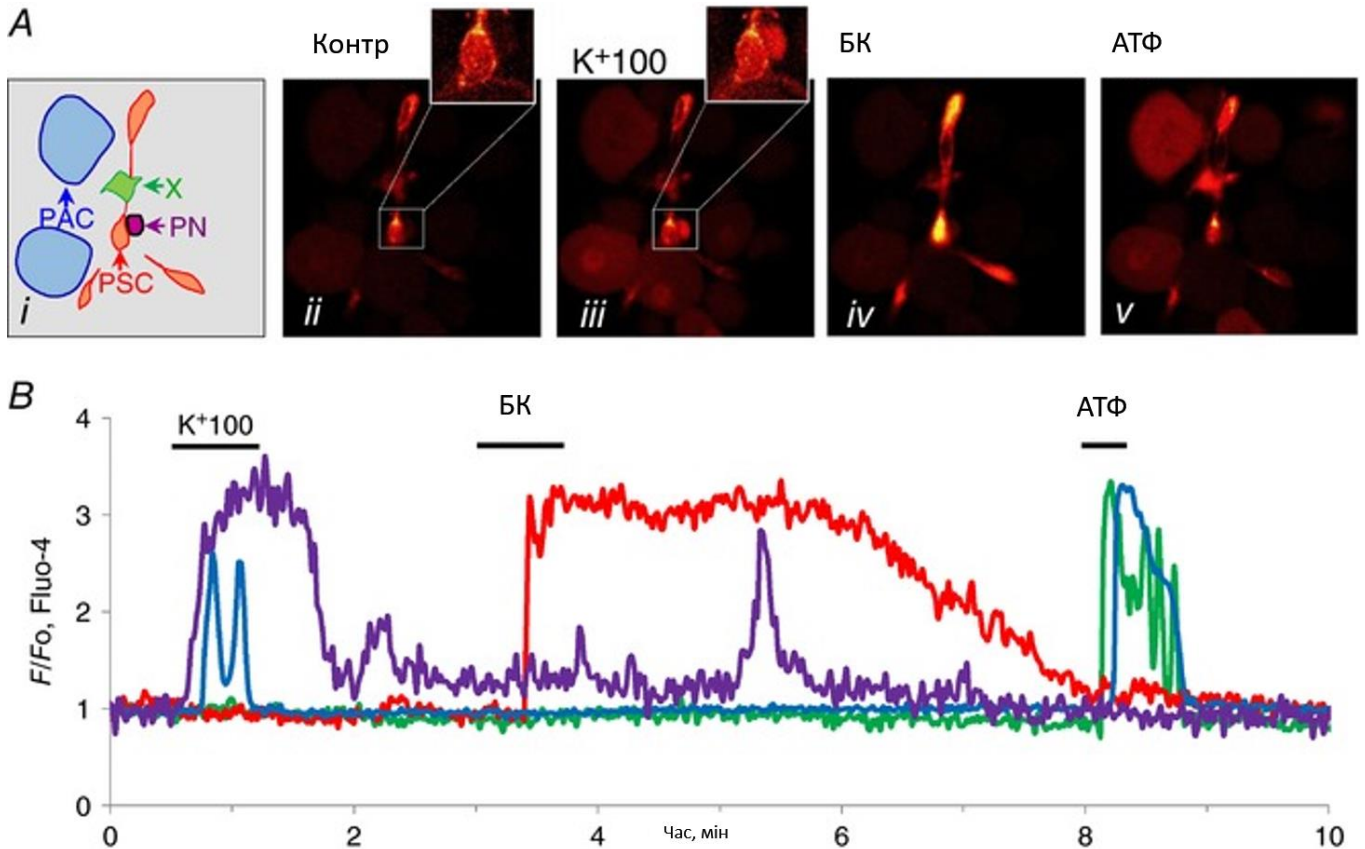


Рис. 8. Одночасні записи змін  $[Ca^{2+}]_i$ , що виникають у відповідь на різні подразники в клітинах чотирьох різних типів, присутніх в кластерах підшлункової залози миші. Аі) Ескіз розташування клітин різних типів у структурі панкреатичної лобули, що досліджувалася: сині – ацинарні клітини (PAC); помаранчеві / червоні – зірчасті клітини (PSC); фіолетовий – нейрон (PN); зелена – імунна клітина (X). Аіі – Аv, флуоресцентні зображення в контролі та під час стимуляції підвищенням концентрації  $K^+$  (100 мМ), БК (1 нМ) та АТФ (100 мкМ), відповідно. В) В нейроні та ацинарній клітині  $[Ca^{2+}]_i$  збільшується у відповідь на деполяризацію мембрани; ЗКПЗ відповідали на БК, а ацинарна та імунна клітини відповідали на прикладання АТФ. Кольори на графіках відповідають таким на схемі А.

### Зміни $[Ca^{2+}]_i$ та контроль клітинних патологій.

**Жовчні кислоти.** Дія жовчних кислоти (TLC-S) на підшлункову залозу є одним із основних чинників виникнення гострого панкреатиту. За допомогою методу перфорованого петчу ми дослідили електрофізіологічні ефекти прикладання TLC-S на ацинарні клітини. Можливий внесок дії  $Ca^{2+}$  в індукований TLC-S вхідний струм було досліджено шляхом порівняння вхідних струмів (отриманих у розчині, що

містив NMDG<sup>+</sup> замість Na<sup>+</sup>) за наявності та відсутності іонів Ca<sup>2+</sup>. В цих експериментах вдалося зареєструвати відносно невеликий додатковий вхідний трансмембранний струм (рис. 9) при використанні позаклітинного розчину з дуже високою концентрацією іонів Ca<sup>2+</sup> (40 мМ;  $n=7$ ). Для запобігання будь-якого внутрішньоклітинного підвищення [Ca<sup>2+</sup>] та активації струмів, що залежать від концентрації цих іонів, використовували ВАРГА в петч-піпетці у дуже високій концентрації (20 мМ). У випадках, коли концентрація позаклітинного кальцію становила менше 10 мМ, було неможливо зареєструвати зміни струму ( $n=6$ ). Аплікація TLC-S також призводила до появи невеликого хлоридного струму. Зміни концентрації Cl<sup>-</sup> від 5 до 145 мМ призводили лише до невеликої зміни вхідного струму, зафіксованого при потенціалі -30 мВ ( $n=14$ ). Як було показано вище, наявність навіть невеликого, але довготривалого кальцієвого струму призводить до підйому внутрішньоклітинної [Ca<sup>2+</sup>] та розвитку некротичних змін у ацинарних клітинах.

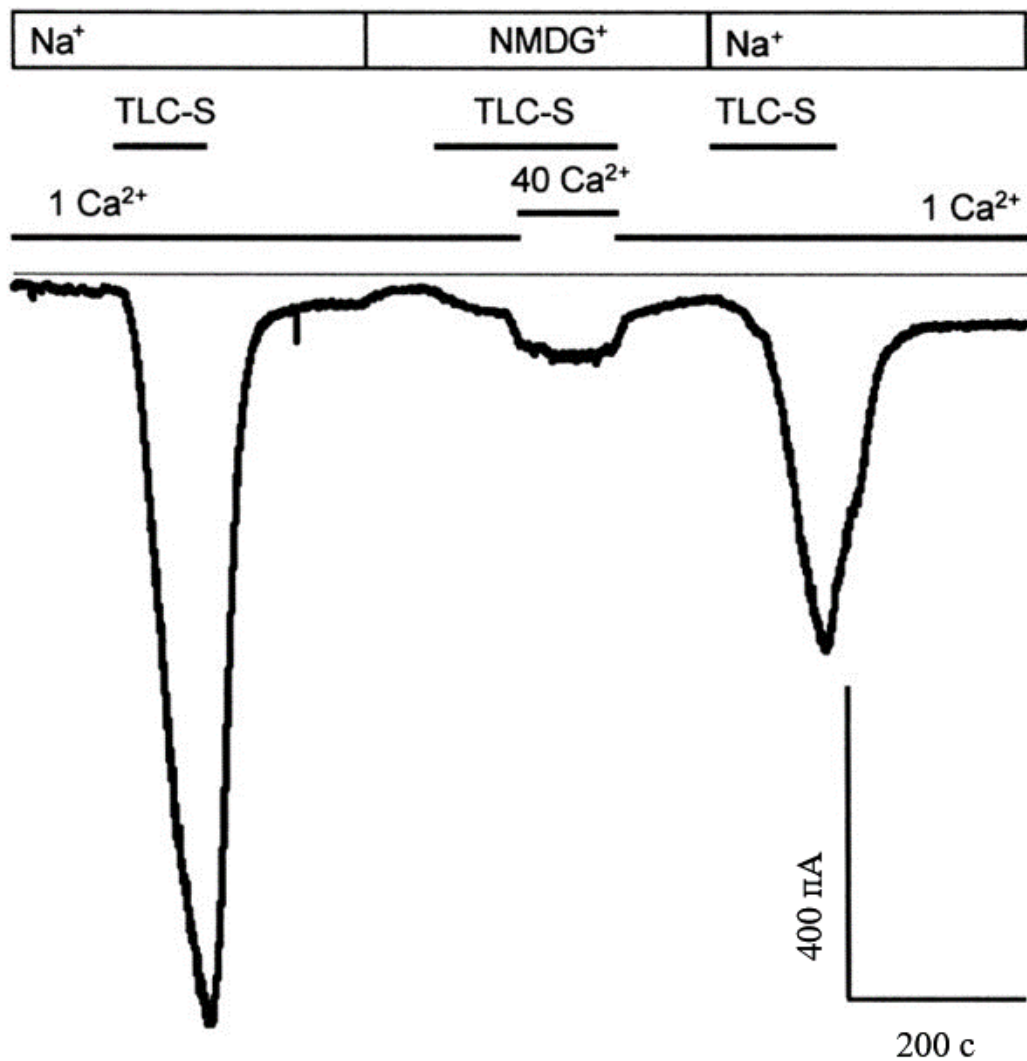


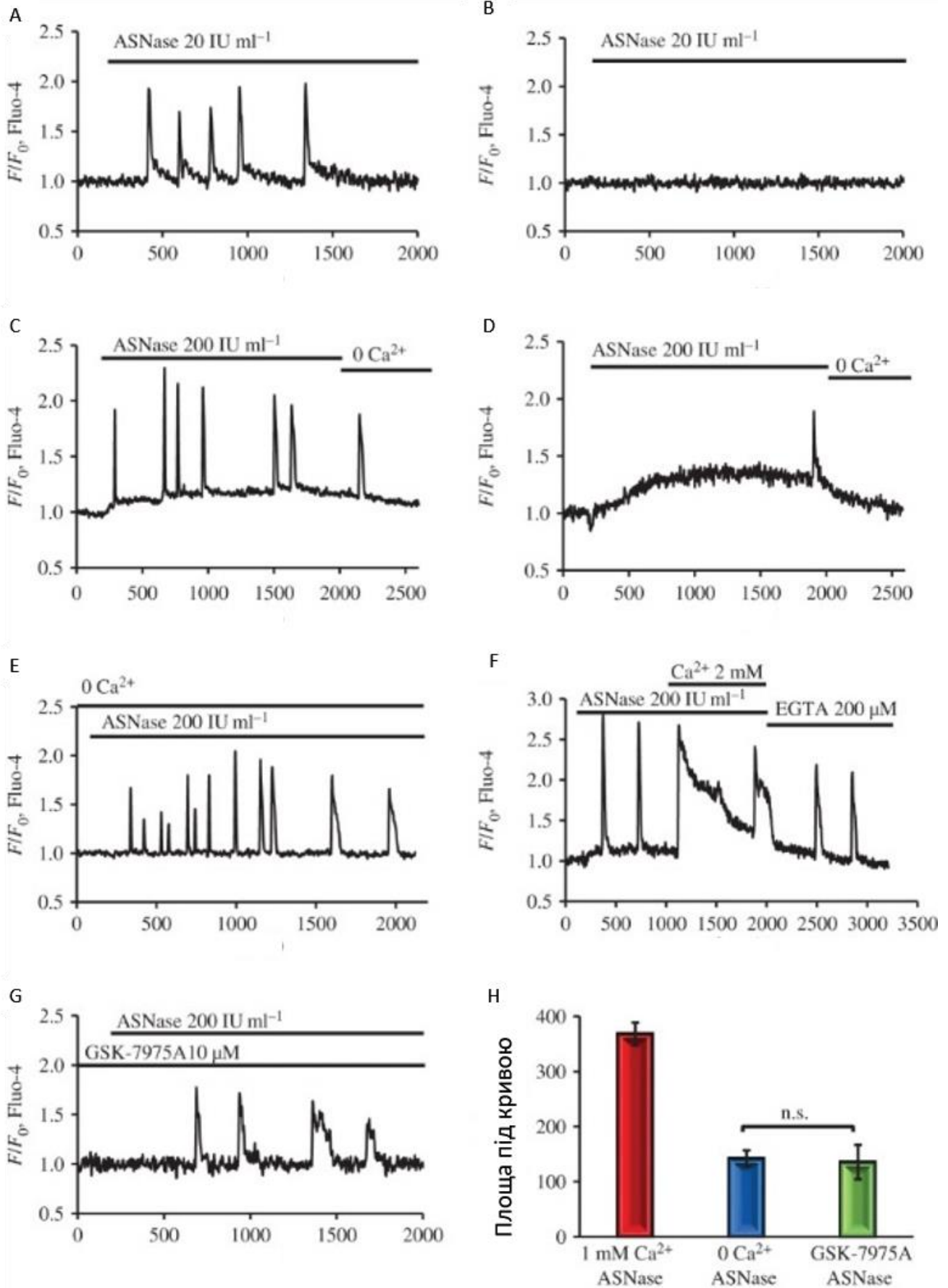
Рис. 9. Внесок кальцієвого вхідного струму в сумарний струм через плазматичну мембрану ацинарних клітин, що спричинявся дією жовчних кислот (TLC-S). Кальцієвий та натрієвий компоненти струму, викликаного прикладанням TLC-S. У

внутрішньоклітинний розчин додавали 20 мМ ВАРТА для запобігання активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних струмів. У верхній частині рисунку показані періоди застосування TLC-S (100 мкМ), заміщення  $\text{Na}^+$  на NMDG<sup>+</sup> та зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у позаклітинному розчині. У цьому експерименті у розчині петч-піпетки  $\text{K}^+$  були замінені на NMDG<sup>+</sup>. Смушка з міткою NMDG вказує період часу, коли весь  $\text{Na}^+$  в позаклітинному розчині був заміщений NMDG<sup>+</sup>. На рисунку показаний струм, записаний при потенціалі  $-30$  мВ. Амплітуду індукованого TLC-S вхідного струму порівнювали в умовах позаклітинного розчину, що містить натрій, позаклітинному розчині, що не містить натрію ( $\text{Na}^+$  заміщений NMDG<sup>+</sup>,  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  1 мМ), і позаклітинному розчині без натрію з високою концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (40 мМ).

**Аспарагіназа.** Секреція травних ферментів із ацинарних клітин підшлункової залози супроводжується фізіологічними цитозольними  $\text{Ca}^{2+}$  сигналами, котрі реєструються у вигляді повторюваних короткотривалих коливань, значною мірою обмежених ділянкою секреторних гранул, що стимулює вироблення мітохондріального аденозинтрифосфату (АТФ) (Chvanov et al, 2018). Внаслідок цього стійкі, глобальні підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі знижують рівень АТФ і спричиняють розвиток некрозу, властивого захворюванню на гострий панкреатит. Як було показано вище, “токсичні” кальцієві сигнали можуть викликатися продуктами метаболізму алкоголю та жирних кислот, а також жовчними кислотами. Аспарагіназа - важливий засіб, що використовується для успішного лікування гострого лімфобластного лейкозу (поширеного типу злоякісного захворювання крові), що вражає дітей. Щоб визначити механізм можливої дії аспарагінази на панкреатичні клітини, ми протестували вплив цього фермента в широкому діапазоні концентрацій на зміни  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Виявилось, що лише в деяких ацинарних клітинах (9 з 42), аспарагінази у низькій концентрації (20 IU/мл) викликала коливання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . На рис. 10 А показана позитивна відповідь клітини у вигляді повторюваних  $\text{Ca}^{2+}$  транз'єнтів, індукованих прикладанням 20 IU/мл аспарагінази, тоді як на рис. 10 В видно більш типову ситуацію (33 з 42 клітин), коли аспарагіназа у такій самій концентрації не викликала жодних змін  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . У разі більш високої концентрації (200 IU/мл) аспарагіназа викликала повторювані коливання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , переважно у межах фази плато  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (43 з 55 клітин; рис. 10 С). Підвищення плато  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , хоча часто і невелике, спостерігалось у переважній більшості клітин (52 з 55), стимульованих аспарагіназою (200 IU/мл). У деяких випадках (12 з 55) на підвищеному плато  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  не спостерігалось кальцієвих транз'єнтів або їх було дуже мало (рис. 10 D). Видалення позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  завжди усувало фазу плато  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (рис. 10 С, D), але суттєво ( $P > 0.27$ ) не змінювало амплітуди спричинених аспарагіназою коливань  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $n=28$ ; рис. 10 E). Вхід  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину, безумовно, відіграє важливу роль у формуванні підвищення кальцієвого плато, спричиненого дією аспарагінази. Роль входу  $\text{Ca}^{2+}$  була додатково продемонстрована збільшенням зовнішньої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 2 мМ під час стимуляції аспарагіназою; у цих випадках спостерігалось помітне та стійке збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ( $n=18$ ; рис. 10 F). Подальше видалення зовнішнього  $\text{Ca}^{2+}$  та

додавання кальцієвого хелатору EGTA (200  $\mu\text{M}$ ) усувало підвищення плато  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , тоді як коливання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  тривали ще деякий час (рис. 10 F).



*Рис. 10. Аспарагіназа (ASNase) індукує цитозольні кальцієві сигнали в ацинарних клітинах підшлункової залози. А–В) Аспарагінази в низькій концентрації (20 IU/мл) викликала повторювані  $[Ca^{2+}]_i$  транзйєнти в деяких (9 з 42) клітинах (А), але не викликала реакції у більшості (33 з 42) клітин (В). С) ASNase у вищій концентрації (200 IU/мл) викликає збільшення амплітуди плато  $[Ca^{2+}]_i$  практично у всіх випадках (52 з 55 клітин), часто з наявністю повторюваних кальцієвих (43 з 55), як показано на реєстрації. D) Збільшення величини плато  $[Ca^{2+}]_i$  було основним типом відповіді на аспарагіназу (200 IU/мл; 52 з 55), але в деяких випадках (12 з 55) без наявності транзйєнтів, або їх було дуже мало. Фаза плато  $[Ca^{2+}]_i$  залежала від постійної присутності  $Ca^{2+}$  у зовнішньому розчині. Е) У разі відсутності  $Ca^{2+}$  у зовнішньому розчині, підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  та плато були відсутніми ( $n=28$ ). F) коли зовнішня концентрація  $Ca^{2+}$  збільшувалася від 1 до 2 мМ, спостерігалось помітне збільшення кальцієвих транзйєнтів та підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  плато. Коли зовнішній  $Ca^{2+}$  видаляли і додавали хелатор цих іонів (EGTA), плато поступово зникало ( $n=18$ ). G) У присутності блокатора CRAC-каналів GSK-7975A (10 мкМ), аспарагіназа (200 IU/мл) викликала кальцієві транзйєнти без підвищення плато  $[Ca^{2+}]_i$  ( $n=32$ ). H) Порівняння інтегралів кальцієвих відповідей («площа під кривою» від початку кальцієвого сигналу і до 1800 с), за наявності 1 мМ зовнішнього  $Ca^{2+}$ , за відсутності зовнішнього  $Ca^{2+}$  і в присутності 1 мМ зовнішнього  $Ca^{2+}$  з додаванням 10 мкМ GSK-7975A відповідно. Це показує, що відсутність зовнішнього  $Ca^{2+}$  ( $n=28$ ) або додавання блокатора CRAC-каналів GSK-7975A ( $n=32$ ) суттєво ( $P < 0,0001$  в обох випадках) знижували відповіді на аспарагіназу (200 IU/мл).*

Виявилось, що підвищення рівня  $[Ca^{2+}]_i$ , спричинене аспарагіназою, усувалось у присутності інгібітора CRAC-каналів GSK-7975A (10 мкМ), хоча кальцієві транзйєнти все ще спостерігалися (рис. 10 G;  $n=32$ ). На рисунку 10 H узагальнено ступінь аспарагіназо-індукованого інгібіювання сумарного  $Ca^{2+}$  сигналу, викликаного видаленням зовнішнього  $Ca^{2+}$  або додаванням GSK-7975A. Отже, аспарагіназа, як і інші агенти, що здатні викликати панкреатит, індукувала внутрішньоклітинне вивільнення  $Ca^{2+}$  з подальшим входом  $Ca^{2+}$  ззовні, що призводило до підйому  $[Ca^{2+}]_i$  та могло вести до розвитку некрозу ацинарних клітин.

**Галактоза.** Вище було згадано, що агенти, котрі викликають гострий панкреатит (такі як алкоголь та жирні кислоти, жовч та аспарагіназа), помітно пригнічують метаболізм глюкози в ацинарних клітинах, що призводить до зниження синтезу АТФ і, отже, значного зниження внутріклітинної концентрації АТФ. Поєднання цитозольного перевантаження  $Ca^{2+}$  та виснаження АТФ призводить до розвитку глибокого клітинного некрозу, чого можна уникнути за рахунок додавання АТФ. Додавання галактози істотно зменшує пошкодження клітин, викликане усіма згаданими основними агентами, що індукують гострий панкреатит. Видалення глюкози із середовища не впливає суттєво на втрату АТФ та некроз, спричинений цими агентами; що свідчить, що метаболізм глюкози сильно гальмується. Філоретин (інгібітор транспорту глюкози), також повністю блокував позитивний ефект галактози.



В роботі були дослідженні та проаналізовані різні ланки механізму кальцієвої регуляції в електрично збудливих та незбудливих клітинах, які були недостатньо висвітлені в світовій літературі. Це вхід  $\text{Ca}$  в клітину (депозалежний вхід  $\text{Ca}$ ), зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  кальційзв'язуючими білками в цитозолі (скоротливими молекулами тропоніну) та в ретикулумі (кальсеквестрином) та їх внесок у зміни внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (кальцієву регуляцію як таку). Описано новий механізм інактивації кальцієвих каналів L-типу, що сприяє втраті рефрактерності вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулуму у мишей з мутацією *Casq2* (*Casq2 KO*).

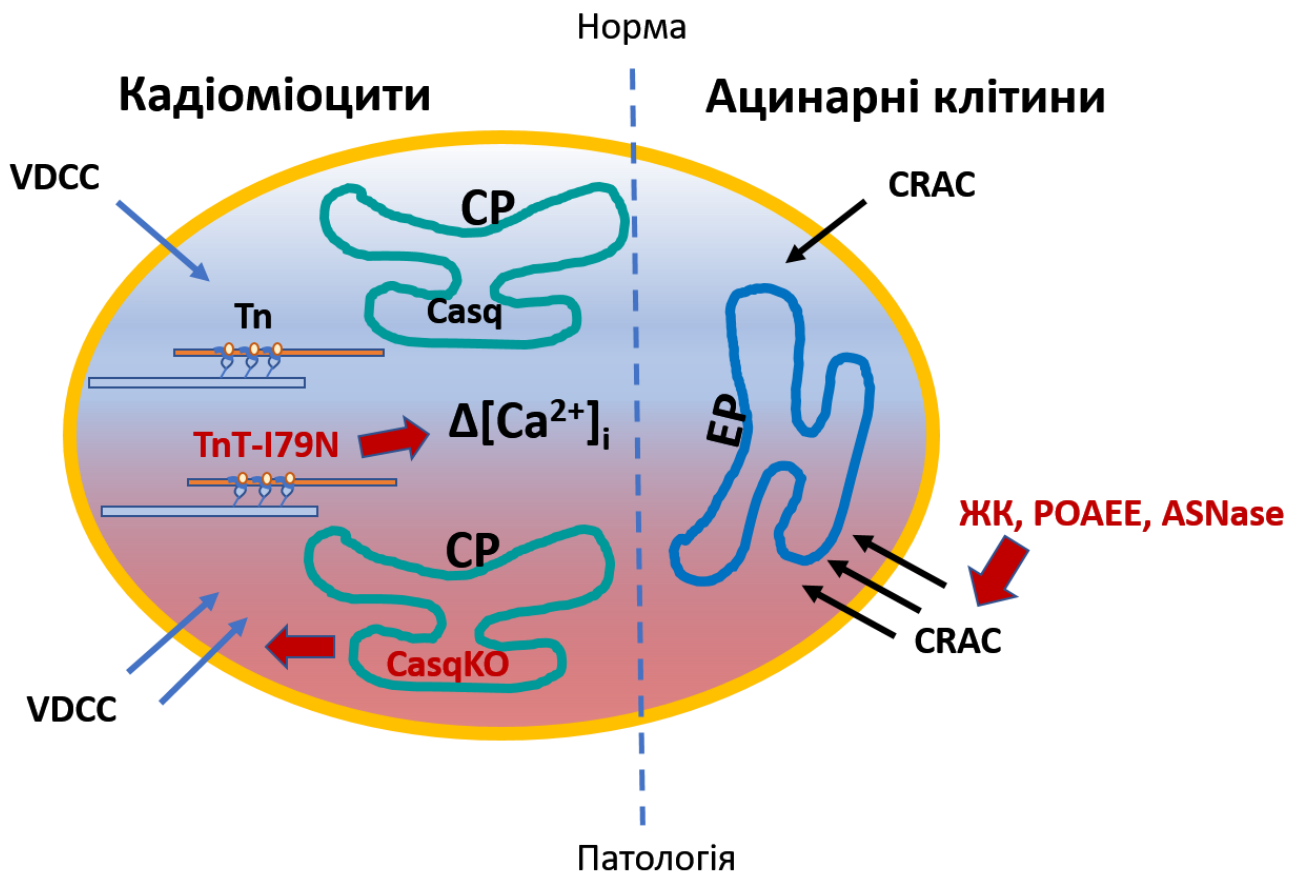


Рис.11. Схематичне зображення основних процесів, що беруть участь у контролі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі електрично збудливих та незбудливих клітин. Верхня частина схеми (блакитний фон) ілюструє принцип кальцієвої регуляції в нормі, а нижня (червоний колір фону) під час виникнення патологій. Щоб наголосити на відмінностях між збудливими та незбудливими клітинами, зображення клітинних структур кардіоміоцита розташоване ліворуч, а ацинарної клітини – праворуч від пунктирної вертикальної лінії. Як мутації, так і нокаут кальційзв'язуючих білків (*TnT-I79N* та *Casq KO*), а також гіперактивація CRAC-каналів під дією речовин, що призводять до виникнення панкреатиту (ЖК, POAEE, ASNase), викликають порушення клітинної кальцієвої регуляції (великі червоні стрілки), що веде до розвитку патологій.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати комплексного дослідження механізмів кальцієвої регуляції в кардіоміоцитах та клітинах підшлункової залози за нормальних та патологічних умов. Кальцієва регуляція в електрично збудливих та незбудливих клітинах має як загальні риси, так і певну специфіку. Первинним джерелом підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в електрозбудливих клітинах є потенціалкеровані кальцієві канали плазматичної мембрани. Ці канали здатні як запустити вивільнення іонів кальцію з ретикулуму, так і забезпечити його перезаповнення саме за рахунок входу  $Ca^{2+}$  із позаклітинного розчину. В електронезбудливих клітинах за відсутності потенціалкерованих кальцієвих каналів основну роль постачання  $Ca^{2+}$  в клітину відіграють депокеровані кальцієві канали.

Зроблені наступні висновки:

1. Скорочення кардіоміоцитів на ранніх стадіях ембріонального розвитку не пов'язані з генерацією трансмембранних струмів, а обумовлені спонтанними коливаннями внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Ця активність не опосередковується кальцієвими каналами L-типу та взаємодією між ними та р'янодиновими кальцієвими депо, як це спостерігається у зрілих кардіоміоцитах. Показано, що електричне сполучення між клітинами через щільні контакти забезпечує синхронізацію скорочень окремих незрілих кардіоміоцитів.
2.  $Ca^{2+}$ -сенсителізуючі мутації тропоніну T змінюють цитозольну кальцієву буферну здатність, чого достатньо для зміни глобальних цитозольних  $[Ca^{2+}]_i$  транз'єнтів; такі мутації можуть лежати в основі успадкованих кардіоміопатій.
3. Відкрито новий залежний від експресії калсеквестрину механізм порушення кальмодулінзалежної інактивації кальцієвих каналів Cav1.2. Нокаут калсеквестрину призводить до зникнення рефрактерності вивільнення іонів кальцію із саркоплазматичного ретикулуму шлуночкових міоцитів миші.
4. Як показано вперше, спустошення кальцієвих депо активує кальцієвий трансмембранний струм ( $I_{CRAC}$ ) в клітинах підшлункової залози миші. Активація та розвиток цього кальцієвого депозалежного струму на пряму корелює із спустошенням ендоплазматичного ретикулуму внаслідок блокування кальцієвої АТФази останнього.
5. Блокування  $Ca^{2+}$ -селективних іонних депозалежних каналів ефективно перешкоджає підвищенню внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та запобігає розвиненню некрозу ацинарних клітин, що викликається ефірами жирних кислот (які, зокрема, є метаболітами етанолу).
6. Жовчні кислоти, що є одним з головних чинників розвитку гострого панкреатиту, викликають некроз ацинарних клітин в результаті активації катіонних каналів плазматичної мембрани та підвищення внутрішньоклітинних концентрацій іонів натрію та кальцію.
7. З'ясовані механізми генерації кальцієвих сигналів в зірчастих клітинах – компонентах структури панкреатичних лобул. За нормальних умов зірчасті клітини генерують двофазні кальцієві транз'єнти у відповідь на прикладання брадикініну; останній є основним фактором, що забезпечує виникнення

больових відчуттів при панкреатиті. Блокування брадикінінових рецепторів типу В2 усуває кальцієві транзєнти, спричинені БК, та запобігає розвиненню некрозу ацинарних клітин, спричиненому як етанолом і його метаболітами, так і жовчними кислотами.

8. Механізми кальцієвої сигналізації клітин в лобулах екзокринної частини підшлункової залози, зокрема в нервових та імунних клітинах мають певну специфіку. В умовах розвитку гострого панкреатиту чутливість зірчастих клітин до БК істотно зменшується. В панкреатичних лобулах нервові та імунні клітини розташовані в місцях скопичення зірчастих клітин, що вказує на вірогідність однієї досі невідомої ролі зірчастих клітин у функціонуванні підшлункової залози.
9. Аспарагіназа, як і етилові ефіри жирних кислот та жовчні кислоти, може викликати стійке підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ , в наслідку вивільнення цих іонів з внутрішньоклітинних депо та їх входу через депокеровані канали. Це підвищення може призводити до розвитку некрозу ацинарних клітин.
10. Галактоза ефективно запобігає збільшенню внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та зменшує некроз ацинарних клітин в моделі гострого панкреатиту, викликаного аспарагіназою.

#### ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Peng S, Gerasimenko JV, Tsugorka TM, **Gryshchenko O**, Samarasinghe S, Petersen OH, Gerasimenko OV. Galactose protects against cell damage in mouse models of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 2018 Aug 31; 128(9):3769-3778.
2. **Gryshchenko O**, Gerasimenko JV, Peng S, Gerasimenko OV, Petersen OH. Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: physiology and pathophysiology. *J Physiol*. 2018 Jul; 596(14):2663-2678.
3. Peng S, Gerasimenko JV, Tsugorka T, **Gryshchenko O**, Samarasinghe S, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium and adenosine triphosphate control of cellular pathology: asparaginase-induced pancreatitis elicited via protease-activated receptor 2. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016 Aug 5; 371(1700). pii: 20150423.
4. **Gryshchenko O**, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH. Calcium signalling in pancreatic stellate cells: Mechanisms and potential roles. *Cell Calcium*. 2016 Mar; 59(2-3):140-4.
5. **Gryshchenko O**, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH. Ca(2+) signals mediated by bradykinin type 2 receptors in normal pancreatic stellate cells can be inhibited by specific Ca(2+) channel blockade. *J Physiol*. 2016 Jan 15; 594(2):281-93.
6. Kryshchal DO, **Gryshchenko O**, Gomez-Hurtado N, Knollmann BC. Impaired calcium-calmodulin-dependent inactivation of Cav1.2 contributes to loss of sarcoplasmic reticulum calcium release refractoriness in mice lacking calsequestrin 2. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 May; 82:75-83.
7. Gerasimenko JV, **Gryshchenko O**, Ferdek PE, Stapleton E, Hébert TO, Bychkova S, Peng S, Begg M, Gerasimenko OV, Petersen OH. Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel

- blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 6; 110(32):13186-91.
8. Schober T, Huke S, Venkataraman R, **Gryshchenko O**, Kryshtal D, Hwang HS, Baudenbacher FJ, Knollmann BC. Myofilament Ca sensitization increases cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circ Res*. 2012 Jul 6; 111(2):170-9.
  9. Shutov L, Kruglikov I, **Gryshchenko O**, Khomula E, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, Voitenko N. The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 Oct-Nov; 26(7-8):1541-57. Epub 2006 Jul 12. PubMed PMID: 16838100.
  10. Voronina SG, **Gryshchenko OV**, Gerasimenko OV, Green AK, Petersen OH, Tepikin AV. Bile acids induce a cationic current, depolarizing pancreatic acinar cells and increasing the intracellular Na<sup>+</sup> concentration. *J Biol Chem*. 2005 Jan 21; 280(3):1764-70. Epub 2004 Nov 9.
  11. Kruglikov I, **Gryshchenko O**, Shutov L, Kostyuk E, Kostyuk P, Voitenko N. Diabetes-induced abnormalities in ER calcium mobilization in primary and secondary nociceptive neurons. *Pflugers Arch*. 2004 Jul; 448(4):395-401.
  12. **Gryshchenko O**, Qu J, Nathan RD. Ischemia alters the electrical activity of pacemaker cells isolated from the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun; 282(6):H2284-95.
  13. **Gryshchenko O**, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Böhm-Pinger MM, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J. Role of ATP-dependent K(+) channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 1999 Sep; 112 (Pt 17):2903-12.
  14. Viatchenko-Karpinski S, Fleischmann BK, Liu Q, Sauer H, **Gryshchenko O**, Ji GJ, Hescheler J. Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6; 96(14):8259-64.
  15. Igelmund P, Fleischmann BK, Fischer IR, Soest J, **Gryshchenko O**, Böhm-Pinger MM, Sauer H, Liu Q, Hescheler J. Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture. *Pflugers Arch*. 1999 Apr; 437(5):669-79.
  16. **Gryshchenko O**, Lu ZJ, Fleischmann BK, Hescheler J. Outwards currents in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Pflugers Arch*. 2000 Apr; 439(6):798-807.

#### АНОТАЦІЯ

**Грищенко О.В.** Впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та змін депозалежного входу іонів кальцію на функціонування збудливих та незбудливих клітин. – Сукупність наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

У роботі представлені результати комплексного дослідження клітинних та молекулярних механізмів, залучених до кальцієвої регуляції в клітинах різних типів.

У кардіоміоцитах як типових представниках електробудливих клітин, що здатні до скорочення, показана важлива роль кальційзв'язуючих білків у формуванні та регуляції змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Проаналізовано зміни електричних характеристик потенціалів дій та біофізичних параметрів скорочення кардіоміоцитів, викликаних мутаційними модифікаціями молекул тропоніну Т, що збільшує чутливість міофіламентів кардіоміоцитів до іонів кальцію. Показано, що з ростом чутливості міофіламентів пропорційно збільшується буферна кальцієва здатність клітин, і саме цим можуть бути пояснені зміни електричної та скорочувальної активності “мутантних” кардіоміоцитів. В електрично незбудливих клітинах одну з провідних ролей у підвищенні внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію відіграють кальцієві канали, що активуються вивільненням цих іонів із ендоплазматичного ретикулуму та його спустошенням. За допомогою методу “patch-clamp” вперше зареєстровані кальцієві струми в ацинарних клітинах, що виникають у відповідь на спустошення ретикулуму. Експериментально продемонстровано пряму кореляцію між спустошенням ендоплазматичного ретикулуму та активацією депозалежного струму. Доведено, що саме вхід іонів кальцію через депозалежні канали являє собою основний фактор, що призводить до некрозу клітин при більшості патологій, котрі призводять до виникнення гострого панкреатиту. Із застосуванням конфокальної мікроскопії з'ясовані механізми кальцієвої регуляції в клітинах лобул екзокринної частини підшлункової залози, зокрема в нервових, зірчастих та імунних клітинах. Встановлено, що зірчасті клітини в звичайних умовах (за відсутності патологій) здатні генерувати кальцієві транзйєнти у відповідь на прикладання брадикініну; описані механізми виникнення і генерації цих кальцієвих транзйєнтів. В роботі вперше описані вірогідні механізми виникнення гострого панкреатиту, спричиненого дією аспарагінази і експериментально обґрунтовано можливий новий підхід у терапії гострого панкреатиту; в основі такого підходу лежить застосування галактози, що забезпечує адекватне регулювання необхідної концентрації АТФ в ацинарних клітинах підшлункової залози.

**Ключові слова:** кардіоміоцити, кальційзв'язуючі білки, кальцієва буферна ємність клітини, клітини екзокринної частини підшлункової залози, кальцієвий депозалежний струм.

## SUMMARY

**Gryshchenko O.V. Effect of calcium-binding protein mutations and changes in the store-operated calcium entry on the function of excitable and non-excitable cells. – Collection of scientific manuscripts.**

Thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences in Human and Animal Physiology (03.00.13). – Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2020.

Using cardiomyocytes isolated from mice expressing troponin T mutants (TnT-I79N, TnT-F110I and TnT-R278C), we found that increasing myofilament Ca sensitivity produced a proportional increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> binding. The underlying cause was an increase in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> binding affinity, whereas maximal Ca<sup>2+</sup> binding capacity was unchanged. The effect was sufficiently large to alter Ca<sup>2+</sup> handling in intact mouse hearts at

physiological heart rates, resulting in increased end-diastolic  $[Ca^{2+}]$  at fast pacing rates, and enhanced sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  content and release after pauses. Basing on the observation that early stage embryonic stem cells-derived cardiomyocytes continuously contracted in high extracellular potassium solution, we provide experimental evidence that the spontaneous activity of these cells is not generated by transmembrane ion currents, but by intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. In cardiac muscle,  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum (SR) is reduced with successively shorter coupling intervals of premature stimuli, a phenomenon known as SR  $Ca^{2+}$  release refractoriness. Gene-targeted ablation of *Casq2* (*Casq2* KO) abolished SR  $Ca^{2+}$  release refractoriness in isolated mouse ventricular myocytes. Surprisingly, impaired  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca}$ ), which is responsible for triggering SR  $Ca^{2+}$  release, significantly contributed to the loss of  $Ca^{2+}$  release refractoriness in *Casq2* KO myocytes. Recovery from  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of  $I_{Ca}$  was significantly accelerated in *Casq2* KO compared to wild type (WT) myocytes.

Alcohol-related acute pancreatitis can be mediated by a combination of alcohol and fatty acids (fatty acid ethyl esters) and is initiated by a sustained elevation of the  $Ca^{2+}$  concentration inside pancreatic acinar cells ( $[Ca^{2+}]_i$ ), due to excessive release of  $Ca^{2+}$  stored inside the cells followed by  $Ca^{2+}$  entry from the interstitial fluid. Electrophysiological data show that in the pancreatic acinar cells this store-operated inward current is relatively insensitive to removing external  $Na^+$ , but sensitive to changes in the external  $Ca^{2+}$  concentration. It is therefore not a transient receptor potential (TRP) type nonselective cation current, but it is a  $Ca^{2+}$ -selective CRAC-type current consistent with the very marked current inhibition evoked by GSK-7975A. There is currently no specific treatment of pancreatitis, but the received data show that pharmacological CRAC blockade is highly effective against toxic  $[Ca^{2+}]_i$  elevation, necrosis, and trypsin/protease activity and therefore has potential to effectively treat pancreatitis. Asparaginase, an essential element in the successful treatment of acute lymphoblastic leukaemia, the most common type of cancer affecting children, evoked intracellular  $Ca^{2+}$  release followed by  $Ca^{2+}$  entry and also substantially reduced  $Ca^{2+}$  extrusion because of decreased intracellular ATP levels. In isolated mouse pancreatic acinar cells or cell clusters, removal of extracellular glucose had little effect on this ATP loss, suggesting that glucose metabolism was severely inhibited under these conditions. Surprisingly, we show that replacing glucose with galactose prevented or markedly reduced the loss of ATP and any subsequent necrosis.

$Ca^{2+}$  signalling in different cell types in exocrine pancreatic lobules was monitored simultaneously and signalling responses to various stimuli were directly compared. Normal pancreatic stellate cells (PSCs) are regarded as quiescent, only to become activated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. We have compared  $Ca^{2+}$  signalling in PSCs and their better studied neighbouring acinar cells (PACs) and found complete separation of  $Ca^{2+}$  signalling in even closely neighbouring PACs and PSCs. Bradykinin (BK), at concentrations corresponding to the slightly elevated plasma BK levels that have been shown to occur in the auto-digestive disease acute pancreatitis in vivo, consistently elicited substantial  $Ca^{2+}$  signals in PSCs, but never in neighbouring PACs, whereas the physiological PAC stimulant cholecystokinin failed to evoke  $Ca^{2+}$  signals in PSCs. The initial  $Ca^{2+}$  rise in PSCs was due to inositol trisphosphate receptor-mediated release from internal stores, whereas the

sustained phase depended on external  $\text{Ca}^{2+}$  entry through  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. We have, for the first time, recorded depolarization-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signals in pancreatic nerves and shown that, although acinar cells receive a functional cholinergic innervation, there is no evidence for functional innervation of the stellate cells.

**Keywords:**  $\text{Ca}^{2+}$  buffering, calcium release, capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry, calcium signaling, L-type calcium channel, cardiomyocytes, exocrine pancreatic cells.

### Перелік основних умовних позначень та скорочень

$\text{Ca}^{2+}$	– іони кальцію
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	– внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію
VDCC	– потенціал-залежні $\text{Ca}^{2+}$ канали L-типу
CP	– саркоплазматичний ретикулум
RyR2	– ріанодинові рецептори другого типу
CICR	– кальцій-індуковане вивільнення кальцію
РГК	– родинна гіпертрофічна кардіоміопатія
TnT	– тропонін Т
SOCE	– депо-керований вхід $\text{Ca}^{2+}$
ЕТ	– ембріональні тільця
ПД	– потенціал дії
НКО	– натрій-кальцієвий обмінник
TnT-I79N	– $\text{Ca}^{2+}$ сенсibiliзуючий мутант тропоніну Т
WT	– природний тип тропоніну
Kd	– константа дисоціації $\text{Ca}^{2+}$ в цитозолі
Vmax	– загальна кількість місць зв'язування $\text{Ca}^{2+}$ у цитозолі
Casq2	– кальсеквестрин2
Casq2 KO	– миші, нокаутовані по гену Casq2
CaM	– кальмодулін
NMDG <sup>+</sup>	– Nметіл-D-глюкамін
CRAC	– $\text{Ca}^{2+}$ канали активовані вивільненням $\text{Ca}^{2+}$
2-APB	– 2-аміноетоксидифеніл борату
POAEE	– етилові ефіри жирних кислот
ЗКПЗ	– зірчасті клітини підшлункової залози
БК	– брадикінін
ССК	– холецистокінін
WIN	– антагоніст БК рецепторів другого типу (B2) WIN64338
ЦПК	– циклопіазонова кислота
TLC-S	– жовчна кислота tauroolithocholic acid 3-sulfate
АТФ	– аденозинтрифосфат
ASNase	– аспарагіназа