

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ
СІКОРСЬКОГО»**

**ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЇ ФІЗИКИ**

«На правах рукопису»

УДК _____

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) (ініціали, прізвище)

“ ____ ” _____ 2022 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

зі спеціальності Прикладна фізика та наноматеріали

на тему: Експресія калієвих каналів в умовах гіпоксії

Виконала: студентка 6 курсу, групи ФФ-01мн

Олешко Олександра Василівна

Науковий керівник

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Консультант

(назва розділу) (науковий ступінь, вчене звання, , прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент

(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2022 р

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація складається зі вступу, трьох розділів та висновків, що включені до третього розділу. Загальний об'єм становить 43 сторінки, з них 32 основного тексту, 11 рисунків, 3 таблиць, перелік використаних джерел на 5 сторінках.

Робота присвячена дослідженню впливу умов гіпоксії на експресію калієвих каналів.

Було зроблено огляд літератури в даній області, ознайомлення з методикою ПЛР та електрофорезом. Методи ПЛР та в подальшому електрофорез були використані для дослідження змін експресії гену потенціалкерованих калієвих каналів Kv1.2 у лінії клітин феохромоцитоми щура PC12. В ході експериментів було встановлено, що гіпоксія збільшує відносну експресію гена каналу Kv1.2 у недиференційованих (інтактних) клітин PC12 на 28% у порівнянні з аналогічними клітинами за нормальних умов, що пояснюється тим, що в клітинах в умовах стресу вмикаються компенсаторні механізми, оскільки збільшення експресії Kv1.2-каналів призводить до збільшення гіперполяризації мембрани, а отже до зменшення її збудливості. У той самий час, у NGF-диференційованих клітин, що зазнали впливу гіпоксії, експресія Kv1.2 зменшувалася на 33%. Отже збудливість клітин збільшувалася і вони ставали більш чутливими до факторів впливу (іони кальцію, ексайтотоксичність) які призводять до процесів апоптозу та некрозу. Експресія гену каналів Kv1.2 у зразках, що були диференційовані за допомогою фактору росту нейритів NGF, зменшилася на 27,9% під дією гіпоксії.

Такий результат свідчить про чітку відповідь генетичного апарату клітини на гіпоксію через активацію факторів транскрипції калієвих каналів та, відповідно, збільшенню або зменшенню вмісту продуктів транскрипції у цитозолі клітин.

ABSTRACT

The master's dissertation consists of an introduction, three chapters and conclusions that included in chapter three. The total volume is 43 pages, including 32 main text, 11 figures, 3 tables, list of sources used on 5 pages.

The work is devoted to the study of the influence of hypoxia conditions on the expression of potassium channels.

A review of the literature in this area, acquaintance with PCR and electrophoresis were done. PCR methods and subsequent electrophoresis were used to study the expression of the gene for potential-directed potassium channels Kv1.2 in the pheochromocytoma cell line of rat PC12. In experiments, it was found that hypoxia increases the relative gene of the Kv1.2 channel in undifferentiated (intact) PC12 cells by 28% compared to similar cells under normal conditions, due to the fact that in cells under stress, compensatory expressions are activated due to increased expression of Kv1.2 channels leads to increased hyperpolarization of membranes, and thus reduces its excitability. At the same time, in NGF-differentiated cells exposed to hypoxia, Kv1.2% expression decreased by 33%. Thus, the excitability of cells increased and became more sensitive to factors (calcium ion, exatotoxicity), which lead to apoptosis and necrosis. The expression of the Kv1.2 channel gene in samples differentiated by NGF neurite outgrowth decreased by 27.9% under hypoxia.

This result indicates a clear response of the genetic apparatus of the cell to hypoxia due to the activation of transcription factors of potassium channels and, accordingly, increase or decrease the content of transcription products in the cytosol of cells.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Калієві канали.....	6
1.2. Kv-канали.....	8
1.2.1. СтруктураKv-каналів.	10
1.2.2. Функції та локалізація Kv-каналів	12
1.2.3. Ворітні механізми та селективність Kv-каналів	14
1.2.4. Kv-канали і гіпоксичний стан.....	16
1.3. HIF-1.....	18
1.4. Клітинна лінія PC12	19
1.4.1. PC12 як модель нервової тканини.....	19
1.4.2. Механізм диференціації клітин PC12.....	21
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	22
2.1. Об'єкт дослідження.....	22
2.2. Матеріали, реактиви та обладнання.....	22
2.3. Методи дослідження.....	25
2.3.1. Індукція хімічної гіпоксії клітинної лінії PC12.....	25
2.3.2. Диференціація клітин лінії PC12 у модель симпатичних нейронів.....	25
2.3.3. Конфокальна мікроскопія.....	27
2.3.4. Проведення ПЛР.....	27
2.3.5. Електрофорез.....	28
2.3.6. Обробка результатів.....	29
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– а ктивні ф орми к исню
кДНК	– к омплементарна д изоксирибон н уклеїгова к ислота
РНК	– р ибон н уклеїнова к ислота
НАДФ•Н	– н ікотинаміда д енін д инуклеотид ф осфат відновлений
ФАР	– ф актор а соційований з р остом
цАМФ	– ц иклічний а денозин м оно ф осфат
цГМФ	– ц иклічний г уанозин м оно ф осфат
NO	– n itric o xide
NGF	– n erve g rowth f actor
PCR	– p olymerase c hain r eaction
PD	– p ore d omain
VSD	– v oltage s ensing d omain

ВСТУП

Для виживання клітин людини та ссавців здатність реагувати на зниження концентрації кисню є надважливою. Хеморецепторні клітини – спеціальні клітини організму, основною функцією яких є сприйняття та реагування на зниження рівню вмісту O_2 . Такі клітини присутні у тканинах та органах, каротидних тільцях, судинних мережах легень, легневих нейроепітеліальних органах [1-5]. Вчасна реакція хеморецепторних клітин на зниження концентрації кисню призводить до нормалізації та оптимізації роботи серцево-судинної системи та легеневої реакції, яка запобігає локальному або глобальному дефіциту кисню, що може викликати незворотні пошкодження клітин та у подальшому – загибель організму [6, 7].

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Калієві канали

29% від усіх білків організму складають іонні канали та білки транспортери, а калієві канали є найрозповсюдженішим серед них класом. Калієві канали відіграють важливу роль у розвитку паталогій та мембранній фізіології, задіяні у багатьох біологічних функціях і представлені в діапазоні організмів від вірусів і бактерій до рослин і ссавців. K^+ -канали грають важливу роль у рості клітин та виживанні прокаріот, а для вищих організмів ці канали є основним засобом міжклітинної сигналізації. Головною функцією усіх K^+ -каналів є формування трансмембранного “шляху”, високо специфічного для іонів K^+ [8].

Іонні канали є інтегральними мембранними білками, які пронизують ліпідний бішар з утворенням центральної пори, через яку іони проходять згідно з принципом обмеженої дифузії, також дані канали впливають на електричні властивості мембрани збудливих клітин [42].

За останні двадцять років спостерігається значний прогрес у вивченні K^+ -каналів, наприклад з'ясовано велику гетерогенність типів калієвих каналів, визначено та вивчено характеристики. За допомогою методів клонування K^+ -каналів встановлено, що геноми усіх бактерій та еукаріот містять щонайменше один ген калієвих каналів, та що ці канали присутні у різних клітинах усіх організмів [25].

K^+ -канали містять різні типи молекул, наприклад поліаміни, G-протеїни, іони Ca^{2+} , які контролюють роботу поки каналу.

Основні класи, на які поділять ефектори, що моделюють роботу калієвих каналів:

1. Вхідні калієві канали. Цей тип каналів пропускає іони калію всередину клітини.

2. Кальцій-активовані калієві канали. Тип каналів, який відкривається при детектуванні кальцію.

3. Потенціал-активовані калієві канали. Канали відкриваються або закриваються в залежності від зміни трансмембранного потенціалу клітини.

4. Двопорові калієві канали. Канали, що встановлюють негативний мембранний потенціал в клітині та є постійно відкритими.

K^+ -канали можна поділити на потенціал-чутливі та потенціал-нечутливі.

Потенціал-чутливі K^+ -канали створюють електрохімічну рушійну силу для активації систем клітинного транспорту, формують потенціал дії змінюючи потенціали мембрани, виконують модуляцію електричної збудливості, яка пов'язана з генерацією частоти потенціалів дії. Для виділення гормонів, нейротрансмітерів, забезпечення нормального функціонування серцево-судинної системи необхідне правильне функціонування K^+ -каналів.

Потенціал-нечутливі канали визначають збудливість і величину потенціалу спокою, відіграють важливу роль у сигнальній трансдукції і регуляції об'єму клітини. Вони є гетерогенним класом по відношенню до регуляції, фармакології, кінетичних властивостей та структури. Дана різноманітність обумовлюється понад 75 генами, які кодують субодиниці каналів, формуванням мультимерної структури каналів, альтернативним сплайсингом, модуляцією каналів посттрансляційної модифікації, участю допоміжних субодиниць.

HIF-1 – це транскрипційний фактор, який забезпечує підвищення експресії VEGF і рецепторів VEGF у відповідь на гіпоксію (зменшення вмісту кисню). Також

HIF-1 змінює експресію генів, які контролюють гліколіз та транспорт глюкози, що забезпечує адаптацію клітини до умов зменшення вмісту кисню.

1.2. Kv-канали

Потенціал-залежні K^+ -канали були відкриті Л. Кловісом та С. Вехіна у дендритах нервових клітин каракатиці, а також Ранв'є у мієлінізованих нервових волокон молюсків [3].

У дендритах нервових клітин, які вилучили з нервової системи каракатиці, було помічено, що деполяризація викликає швидке і короткочасне зростання натрієвої провідності мембрани і повільне стійке зростання калієвої провідності [10, 16]. Вченими-дослідниками було зроблено припущення, що у клітинах містяться білкові молекули, які мають вплив на коливання іонів.

Згодом були відкриті нові типи калієвих каналів. У нейронах нервових клітин жаби виявили “швидкі” потенціал-керовані K^+ -канали, або А-канали, які пізніше було виявлено у нервових клітинах хребетних тварин. Ці канали активуються при більш негативних значеннях мембранного потенціалу, ніж звичайні K^+ -канали та відіграють важливу роль у регуляції частоти ритмічної генерації потенціалів дії [21].

На сьогоднішній день класифіковано 4 типи потенціал-залежних K^+ -каналів:

1. Shaker / Kv1 (KCNA).
2. Shab / Kv2 (KCNB).
3. Shaw / Kv3 (KCNC).
4. Shal / Kv4 (KCND).

Kv-канали можуть інактивуватися з різною швидкістю (швидка - N-тип інактивація і повільна - С-тип інактивація). Обидва типи присутні в нервових та м'язових клітинах, клітинах підшлункової залози, лімфоцитах [42, 26].

Найпоширеніший метод класифікації Kv-каналів є групування за альфа субодиницею, яка є їх центральною структурою. Потенціал-залежні калієві канали розподілено на 12 класів, базуючись на гомології гідрофобних трансмембранних послідовностей (Рис.1.1). На сьогодні відомо 40 молекул Kv-каналів.

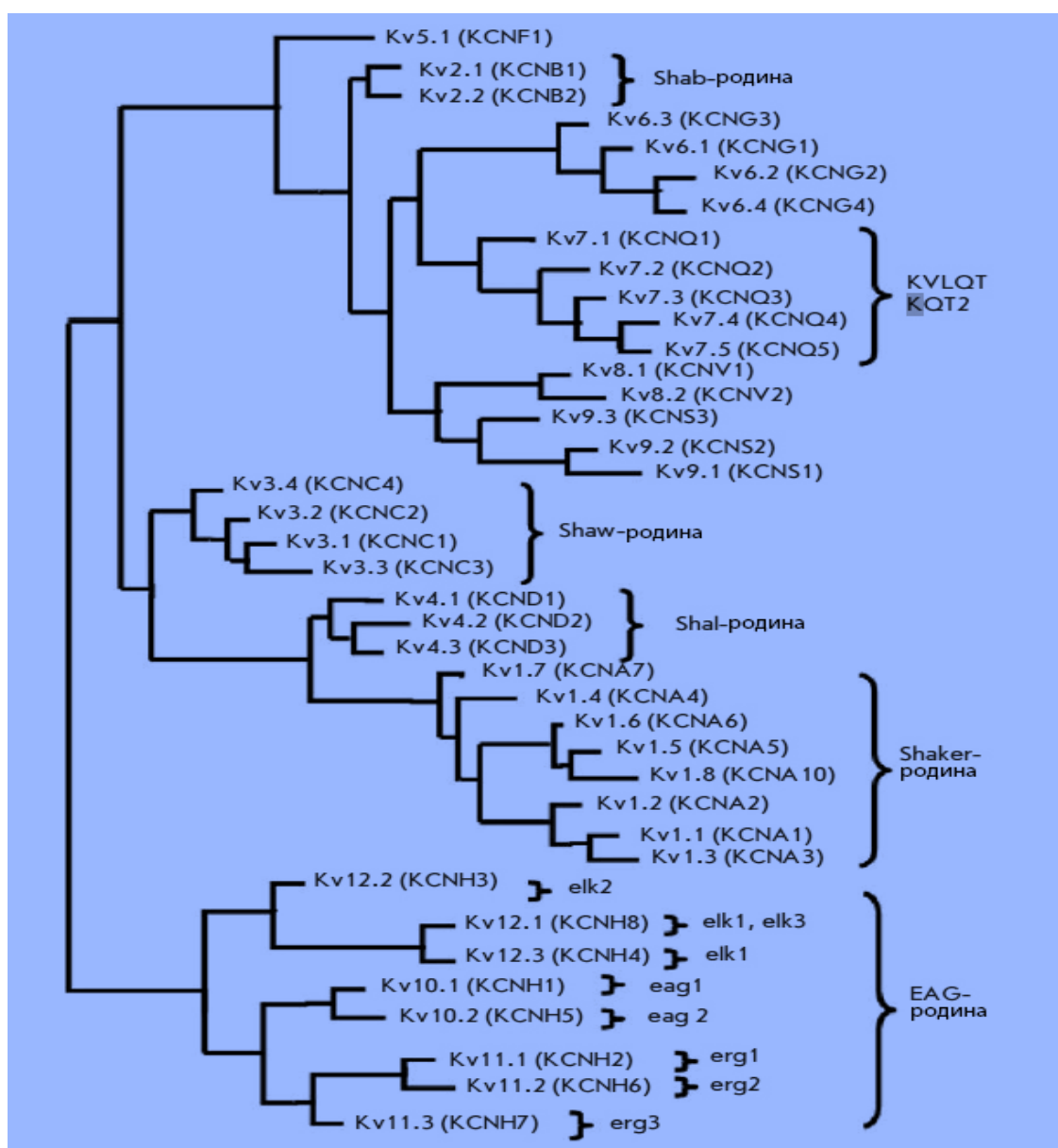


Рис. 1.1. Філогенетичне дерево потенціал-залежних каналів, на основі порівняння амінокислотних послідовностей [6].

1.2.1. Структура Kv-каналів.

Kv-канали мають близькі філогенетичні зв'язки та високий рівень спорідненості. У кожному гені Kv-каналу заковано альфа субодиницю, яка після синтезу об'єднується з трьома іншими альфа субодиницями, утворюючи тетрамер.

Кожну альфа субодиницю Kv-каналу утворюють шість спіралей (S1-S6), сегменти S1, S2, S3, S5 і S6 є гідрофобними і кожен з них у вигляді спіралі перетинає мембрану. Четвертий трансмембранний сегмент S4 формує потенціал-чутливий елемент цих каналів [34]. Така S4-послідовність спостерігається у різних класах іонних каналів, в яких або існує незначне потенціал-залежне керування, або його не існує взагалі, це кальцій-активовані K^+ -канали і канали, що керуються циклічними нуклеотидами (рис. 1.2).

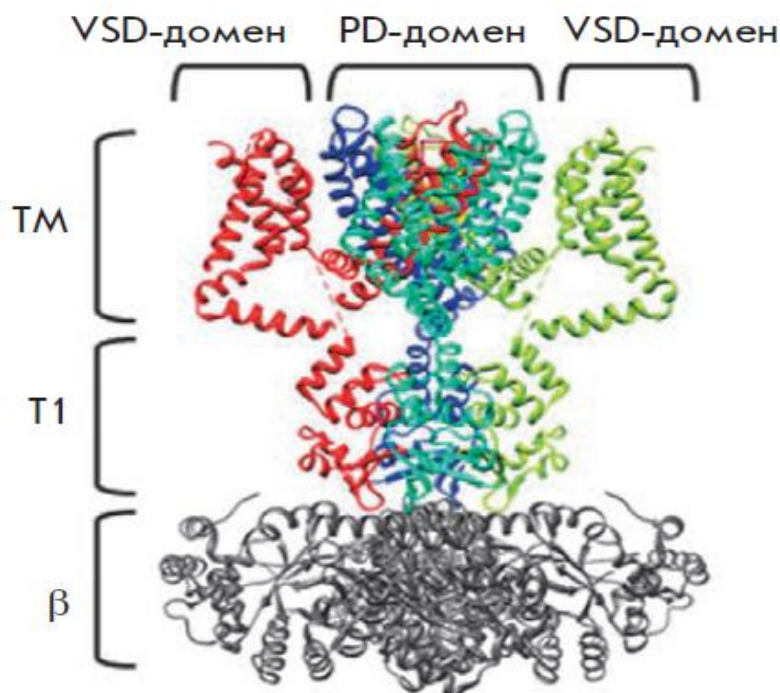


Рис. 1.2. Модель Kv-каналу: VSD-домен – чутливий домен, спіралі S1-S4; PD-домен – поровий домен, спіралі S5-S6; TM – трансмембранний домен; T1 – лінкерна частина; β - допоміжні субодиниці [10].

У шестисегментних Kv-каналах перші чотири трансмембранні сегменти S1-S4 формують модуль, який контролює відкривання і закривання пори. Перші три сегменти локалізовані на огорнутій ліпідами периферії всього вбудованого в мембрану комплексу.

VSD та PD мають ковалентний зв'язок, який утворено частинами спіралей S4-S5, які, у свою чергу, контактують з кінцем спіралі S6. Одна з частин спіралі S6 бере участь у відкритті та закритті каналу і здатна згинатися у місці розташування амінокислотних залишків Pro та Val [42].

Kv-канали мають нижні ворота з внутрішньоклітинної боку, що утворені спіралями S6, і верхні ворота з позаклітинного боку, утворені Р-петлею селективного фільтра (рис 1.3). Нижні ворота контролюються зовнішнім стимулом (мембранним потенціалом) та є головними воротами.

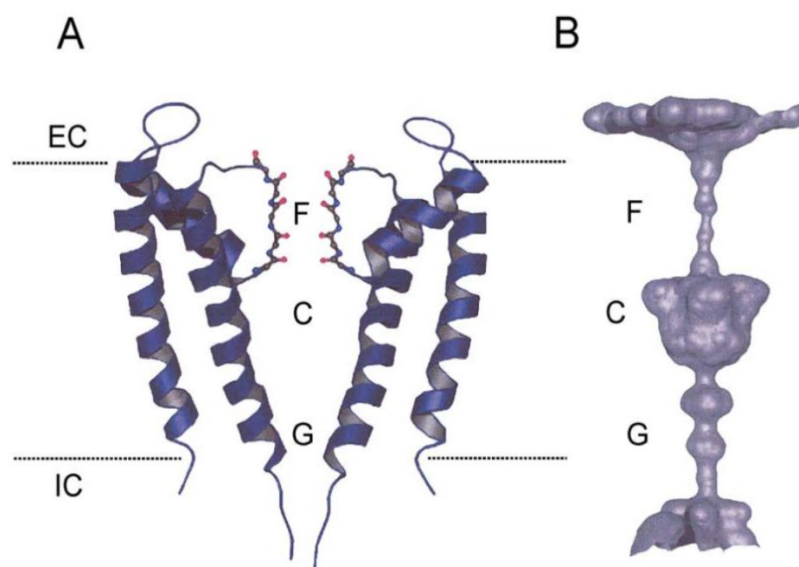


Рис. 1.3. Модель Kv-каналу: А – дві з чотирьох субодиниць Kv-каналу, розташовані перпендикулярно мембрані; ІС – внутрішньоклітинний простір; ЕС – зовнішньоклітинний простір; F – селективний фільтр; С - центральна порожнина каналу; G – ворітний механізм каналу [42] .

Внутрішньоклітинні частини спіралей S6 утворюють діафрагму та здійснюють процеси відкривання та закривання на зразок пелюсток діафрагми фотоапарату [26].

Kv-канали мають цитоплазматичну ділянку, яка утворена N- і C -кінцями. При цьому цитоплазматична частина не містить висококонсервативних ділянок, а отже відрізняється у каналів різних родин [11].

Kv-канали є макромолекулами і включають у себе не тільки α -субодиниці, а й допоміжні трансмембранні β -субодиницями та регуляторні підтримуючі протеїни. Синтез основних та допоміжних субодиниць проходить у ендоплазматичній рідині, де вони об'єднуються у стабільний комплекс. β -субодиниці сполучені з α -субодиницями та змінюють їх властивості. Така складність структурних форм визначає велике різноманіття структури і функцій потенціал-залежних калієвих каналів [40, 9].

1.2.2. Функції та локалізація Kv-каналів.

В клітинних мембранах Kv-канали утворюють калій-селективні пори, які закриваються та відкриваються у відповідь на зміни трансмембранного потенціалу та грають важливу роль у генерації потенціалів дії, а отже у функціонуванні головних систем організму: серця та мозку. Гени потенціал-залежних калієвих каналів експресуються в клітинах всіх типів, але набір калієвих каналів в кожній окремій тканині практично завжди гетерогенний [29].

Розташування калієвих каналів в плазматичній мембрані клітин не є випадковим. Вони утворюють кластери на певних ділянках клітини, наприклад, у пресинаптичних терміналях синаптичних сполучень нервових клітин існує локалізація кальцієвих каналів і кальцій-активованих калієвих каналів. Це демонструє кореляцію між роботою калієвих та кальцієвих каналів і забезпечує

більш точну їх регуляцію за менший проміжок часу, впливає на їх конформаційний стан. Крім того, таке спарене розташування каналів відіграє важливу роль в механізмах секреції нейромедіаторів [33, 37]. Неоднорідність розподілу в дендритах гіпокампу та різноманіття Kv-каналів дозволяє контролювати часові характеристики й амплітуду потенціалів дії, що поширюються до соти нейронів, амплітуду збудливих постсинаптичних потенціалів і збудливість дендритів [38].

Вибіркова експресія комбінацій генів калієвих каналів, визначає характер функцій та електричної активності нейронів різних типів. Потенціал-залежні калієві канали впливають на тривалість потенціалу дії (ініціюючи реполяризацію та забезпечуючи закінчення процесу збудження) та на підтримання потенціалу спокою у клітині. Функціонування калієвих каналів також визначає специфіку відповіді нейрона вхідні сигнали [33]. Динамічна регуляція властивостей калієвих каналів важлива для різних проявів пресинаптичної і постсинаптичної електричної активності, що призводить до посилення чи ослаблення синаптичних реакцій.

У головному мозку людини ідентифіковано приблизно 1000 різновидів нейронів та знаходиться близько 10^{11} нейронів і 10^{14} - 10^{15} синапсів. Інтегративна активність нейронів пов'язана з механізмами їх електричної збудливості, що обумовлені різними типами потенціал-керованих натрієвих, калієвих і кальцієвих каналів, які присутні у цих клітинах [1, 7].

Мутації в генах потенціал-залежних калієвих каналів призводять до різних важких спадкових захворювань, таких як глухота, епілепсія, деякі види порушень ритму серця, та розвитку розсіяного склерозу і больового синдрому. Kv-канали пов'язані також з процесами виникнення і розвитку пухлин, у тому числі злоякісних [13].

Функціонування Kv-каналів можна регулювати за допомогою активаторів і блокаторів, у наслідок чого вони є перспективними мішенями для лікарських засобів. У зв'язку з цим, важливим завданням є вивчення будови і функціонування Kv-каналів [19].

Фізіологічна роль та зв'язок Kv-каналів з патологічними станами свідчить про визначну роль потенціал-залежних калієвих каналів у гомеостазі як окремих клітин, так і цілого організму, та стимулює подальше вивчення їх структури та функцій.

1.2.3. Ворітні механізми та селективність Kv-каналів.

У результаті вивчення механізмів роботи потенціал-залежних калієвих каналів було запропоновано велику кількість їх моделей, заснованих на біологічних даних, кристалографії та мутаційному аналізі. Це дозволило визначити процеси закладені в основах активації та принципах селективності Kv-каналів.

Структура калієвих каналів складно пов'язується з їх функціями. Kv-канали мають здатність змінювати щільність свого розташування на мембрані у відповідь на сигнали, які надходять із зовнішнього середовища. Ця властивість притаманна Kv-каналам як ефекторам клітинних сигнальних шляхів, але це не може бути єдиним механізмом відповіді на сигнали навколишнього середовища.

Нехай об'єм нейрона 10^{-12} мл, а концентрація внутрішньоклітинного K^+ 100 мкмоль. Якщо іони проходять крізь канал зі швидкістю 10^7 іонів у секунду, то 10 молекул калієвих каналів можуть вичерпати весь запас калію клітини за декілька секунд. Отже, канали повинні не тільки змінювати щільність розташування на мембранах клітин, але й бути високоселективними, та аби підтримувати оптимальний рівень калію усередині клітини, мають швидко та ефективно регулювати свою роботу на рівні однієї молекули. Для цього потенціал-залежні калієві канали мають ворітні механізми та стани активації-інактивації каналу.

Kv-канали можуть перебувати в трьох функціональних станах: стані спокою (закрита конформація), активованому стані (відкрита конформація) та інактивованому стані (Рис. 1.4).

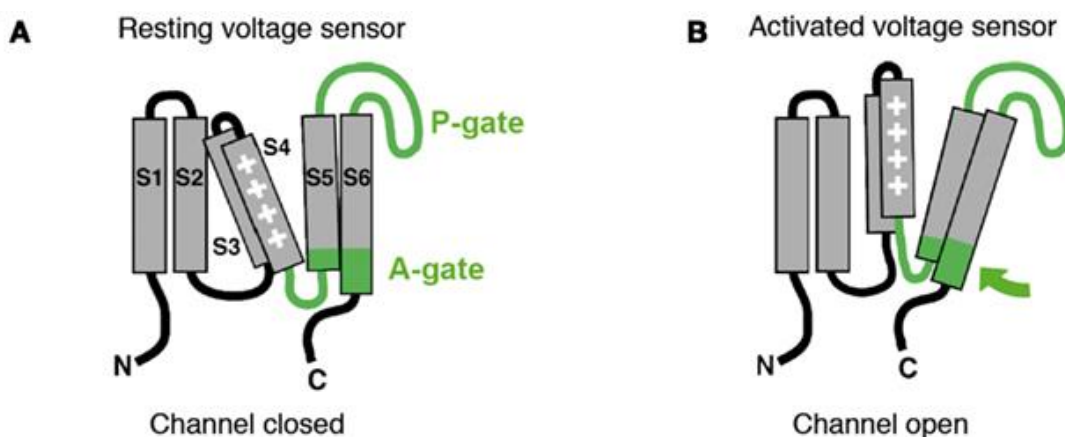


Рис. 1.4. Стани активації Kv-каналу: А – стан спокою; В – активний стан [29].

У інактивованому стані Kv-канал не пропускає K^+ . При деполяризації мембрани, коли внутрішня частина мембрани є позитивно зарядженою, відбувається електрохімічна перебудова молекули каналу і він переходить у відкриту форму, завдяки чому канал активується. Якщо клітинна мембрана і надалі несе позитивний заряд, потенціал-залежні канали знов повертаються у інактивований стан [35].

Найвужча частина каналу відповідає за фільтрацію іонів K^+ . Процес проходження крізь селективний фільтр іонів калію є серією стереохімічних контрольних точок, кожна з яких складається з чотирьох атомів кисню. Вони знаходяться у амінокислотах, що утворюють селективний фільтр. Ці контрольні точки повторюються п'ять разів кожні $\sim 3.0 \text{ \AA}$ уздовж фільтра.

Атоми кисню селективного фільтра можуть виступати в ролі замітника води для дегідратованих іонів K^+ радіусом $1,3 \text{ \AA}$, які знаходяться всередині фільтра. Кисневі ділянки повинні бути конформаційно нерухомі для запобігання стиснення фільтру до малих радіусів. У такому випадку, іони Na^+ , радіус яких складає $0,9 \text{ \AA}$, не можуть розташовуватися у селективному фільтрі калієвого каналу. Отже фактичний енергетичний бар'єр у порі повинен бути більший для фізично менших іонів [17, 4].

Принцип, за яким мембранний потенціал може регулювати відкривання каналу, простий: при відкриванні потенціал-керованого каналу заряджені амінокислоти S4 сегмента викликають рух ворітних зарядів через електричне поле мембрани, поєднуючи електричну роботу з процесом відкривання. Ворітні заряди потенціал-керованих калієвих каналів еквівалентні 14 електронам, які розташовані уздовж трансмембранної різниці потенціалів. Більшість із цих ворітних зарядів належать чотирьом залишкам аргініну в кожній з чотирьох субодиниць, загалом 16 зарядів. Кожний аргінін рахується як один електронний заряд [18, 17, 22].

1.2.4. K_v-канали і гіпоксичний стан.

Однією з причин пошкоджень нервових клітин головного мозку є неперервна та тривала гіпоксія. Вона призводить до клітинної смерті (загибелі нервових клітин). Виділяють три типи ішемічної клітинної смерті, в наслідок яких клітина не може відновити свої нормальні функції:

- Апоптоз
- Аутофагоцитотична клітинна смерть
- Некроз, або некротична клітинна смерть.

Перші дві форми клітинної смерті є нормальними клітинними функціями і включають у себе впорядковані фізіологічні процеси. Некроз же принципово відрізняється від перших двох, бо не є клітинно передбаченим та відбувається за рахунок дії зовнішніх факторів, наприклад, інсульту. Встановлено, що саме некроз викликаний нерегульованою відповіддю клітин на гіпоксію призводить до загибелі β -клітин у трансплантованій підшлунковій залозі [5, 19].

Для виживання клітин ссавців здатність сприймати і реагувати на умову гіпоксії має надважливе значення. Хеморецепторні клітини, можуть швидко

детектувати і реагувати на зниження рівню O_2 . Ці рецепторні клітини присутні в різних тканинах та органах, включаючи каротидне тільце (маленький орган, розташований поблизу біфуркації загальної сонної артерії), судинній мережі легень, і легеневиx нейроепітеліальних органах [8, 12, 14].

В наслідок реакції цих клітин на гіпоксію оптимізується робота серцево-судинної системи і продукується відповідна легенева реакція, що оптимізує доставку кисню до життєво важливих органів, запобігаючи локальному або глобальному дефіциту кисню, який може викликати незворотні пошкодження клітин та, як наслідок, загибель організму [34, 39]. O_2 -чутливі Kv-канали присутні в різних хемочутливих клітинах, наприклад, канал Kv1.2, присутній у легеневій артерії, гладеньких м'язах та пульмонарних нейроепітеліальних клітинах та грає важливу роль у відповіді клітин на гіпоксію [28]. Даний тип каналів відноситься до Shaker підродини потенціал-залежних калієвих каналів та має схожу з ними структуру та механізми активації.

Інгібування O_2 -чутливих Kv1.2 каналів є першим етапом хеморецепції O_2 . Після цього відбувається низка подій, яка призводить до загибелі клітини: деполяризації мембрани, входу Ca^{2+} до клітини, виходу нейротрансмітерів назовні, інгібуванню синтезу протеїназ та зміні експресії генів. Саме через це Kv1.2-канали є ключовими елементами детекції змін доступності O_2 [15, 20].

Аналіз досягнень у прогресі розуміння ролі каналів Kv1.2 в гострих клітинних реакціях на зниження O_2 виявив, що участь цих транспортерів у адаптивних довгострокових змінах, викликаних хронічною гіпоксією, не вивчена детально. Тривала гіпоксія впливає на гени каналу Kv1.2 в клітинах легеневої артерії.

Дослідження показали, що хронічна гіпоксія зменшує калієвий струм та збільшує щільність Na^+ - і Ca^{2+} -каналів в клітинах каротидних тіл сонної артерії, а за допомогою електрофізіологічних досліджень встановлено, що Ca^{2+} -канали модулюються гіпоксією в клітинах PC12, і, можливо, в інших тканинах. Гіпоксія призводить до п'яти-, восьмикратного збільшення рівня субодиниць T-типу Ca^{2+} -

каналів, а також збільшенню мРНК цього каналу в клітинах PC12. Можливо така сама реакція притаманна і генам каналів Kv1.2 та інших потенціал-залежних каналів [33, 25, 2].

1.3 HIF-1

HIF-1 - транскрипційний фактор, який забезпечує підвищення експресії VEGF і рецепторів VEGF у відповідь на зменшення вмісту кисню (гіпоксію) (крім цього HIF-1 змінює експресію генів, що контролюють транспорт глюкози і гліколіз, що забезпечує адаптацію клітин до умов гіпоксії).

Вперше HIF-1 був виділений з пухлинних клітин печінки людини лінії Hep3B [Wang *et al* 1995]. Він відноситься до суперсімейства білків RAS [Hogenesch *et al* 1997] і є гетеродімером, що складається з двох субодиниць - HIF-1a і HIF-1b. Обидві субодиниці містять основні домени типу α -спіраль-петля-спіраль (bHLH), необхідні для процесу димеризації і зв'язування з ДНК.

HIF-1a - універсальна субодиниця для всіх білків сімейства bHLH-PAS. Субодиниця HIF-1b специфічна саме для HIF-1 [Hogenesch *et al* 1997, Wang *et al* 1995]. Експресія і рівень HIF-1a залежать від концентрації і парціального тиску кисню (pO_2) в крові [Huang *et al* 1998, Kallio *et al* 1999 року, Salceda *et al* 1997, Sutter *et al* 2000] - в стані гіпоксії спостерігається підвищення активності HIF-1a [Sutter *et al* 2000]. Збільшення експресії HIF-1a призводить до підвищення експресії генів, через які забезпечується адаптація клітин до гіпоксії і стимулюється ангиогенез - ген еритропоєтину (EPO), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF ген), гліколитичний фермент (ген альдолази A), актатдегідрогеназ (A ген), фосфофруктокіназа (L ген), піруваткіназа (M ген) [Iyer *et al* 1998, Semenza *et al* 1996, Semenza *et al* 1994]. HIF-1a синтезується в різних тканинах, в тому числі і в нервовій тканині [Wiener *et al* 1996], виявлений у всіх клітинах головного мозку, але максимальна його експресія в нейронах [Bergeron *et al* 1999].

HIF-1 є визначним фактором гіпоксії та він підвищує експресію калієвих каналів, тому ми використали його у дослідженні.

1.4. Клітинна лінія PC12

1.4.1. PC12 як модель нервової тканини

PC12 – клітинна лінія, яку було отримано з феохромоцитоми мозкового шару наднирників щура і має ембріональне походження від нервового гребня. Вперше її було культивовано Гріном і Тішером у 1976 році відповідно до моделі хромафінних клітин наднирників. Вона має універсальні властивості для застосування у фармакологічних маніпуляціях, відносно простоту культивування, і значну кількість доступної інформації про проліферацію та диференціювання [31].

Клітинні лінії, які демонструють ознаки нейронів, є гарними моделями для вивчення нервової системи на різних рівнях: як клітинних, так і молекулярних. Використання таких клітинних ліній надає можливість уникати роботи із лабораторними тваринами та помилок, допустити які можна під час підготовки експериментального матеріалу. Підготовка експериментального матеріалу шляхом вирощування клітинних ліній зменшує ймовірність помилок майже до нуля. В той самий час при підготовці верхнього шийного ганглію щура можна допустити помилку, пошкодивши його, або недостатньо відчистивши його від сполучної тканини, що в подальшому унеможлиблює роботу з клітинами ганглію.

Отже, незважаючи на менший розмір везикул, клітинна лінія PC12 має значні переваги у лабораторному використанні.

Клітинна лінія PC12 має 40 хромосом (диплоїдний набір хромосом). Після інкубації з NGF протягом одного тижня клітини PC12 перестають розмножуватись, утворюючи аналогічні симпатичним нейронам розгалужені відростки. Через 48

годин культивування з NGF, відростки досягають 500-1000 мкм в довжину (Рис. 1.5).

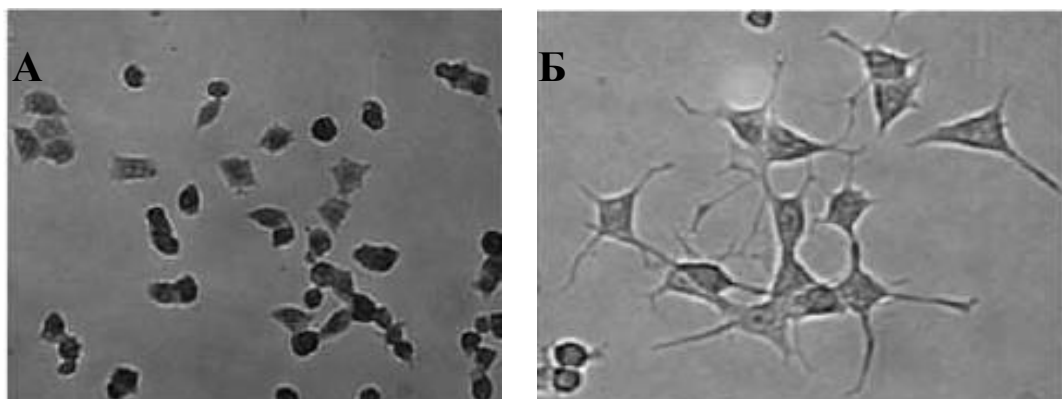


Рис. 1.5. Інтактна (А) культура клітин лінії PC12, та культура клітин інкубована з NGF (Б) 48 годин [21].

Видалення NGF призводить до відновлення поділу клітин протягом 72 годин [39]. PC12 містять щільні хромафін-подібні гранули, діаметр яких не перевищує 350нм, та везикули з нейромедіаторами, які накопичуються на кінцях відростків. Клітини PC12 синтезують і зберігають катехоламіни та нейротрансмітери - дофамін та норепінефрин, концентрації яких можуть бути навіть більшими, ніж в наднирниках.

За результатами досліджень, у складі мембран клітин PC12 було виявлено п'ять різних типів калієвих каналів, два з яких мають низьку провідність іонів, два – середню, і один - низьку. З двох каналів, які мають середню швидкість провідності іонів, один належить до субродини каналів повільної активації, а другий – до субродини швидкої активації [36].

У стандартних умовах під час культивування клітин PC12 клітинна мембрана майже не збуджується, але при культивуванні з NGF струм K^+ зростає у 5-7 разів,

в наслідок чого генерується клітинний потенціал дії [21]. Це відбувається тільки на пізніх стадіях культивування, бо в у сформованих нейронів найбільша кількість калієвих каналів знаходиться у конусі росту на нейритах, а в тілі нейрона щільність калієвих каналів на початку культивування мала і зростає з часом по мірі його формування [9].

1.4.2. Механізм диференціації клітин PC12

ФАР-43 – це протеїн, який залучений у розвитку та підтриманні пластичної нервової системи. В культурі клітин PC12 NGF - опосередкована індукція нейрон-подібного фенотипу клітин супроводжується маркерним підвищенням концентрації ФАР-43, збільшення синтезу якого сприяє підвищенню інтенсивності росту нейронів як в культурі тканин, так і *in vivo*. Також інгібування синтезу ФАР-43 зупиняє конусовий ріст аксонів і вони втрачають орієнтацію у просторі. Збільшення вмісту ФАР-43 разом зі спорідненим протеїном САР-23 веде до зростання аксонів у спинному мозку [37, 41].

ФАР-43 може асоціюватися з фосфоінозитол-(4,5)-кіназою у термінальній мембрані нейрона і регулювати полімеризацію актину. Шляхом зміни стабільності мРНК PC12 NGF стимулює ФАР-43-опосередковану диференціацію. Обробка культури PC12 NGF збільшує період напівжиття його мРНК від 5-6 до 30 годин, що дозволяє мРНК-транскрипторам накопичуватись і бути трансльованими у протеїн. NGF зв'язується з послідовностями мРНК ФАР-43 на 3'-кінці для здійснення регуляторних функцій. В цих послідовностях містяться 3'UTR ділянки, синтез великої кількості яких в мРНК ФАР-43 може блокувати індукцію ендогенних ФАР-43.

РОЗДІЛ 2.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Об'єкт дослідження

Для проведення експерименту нами було використано лінію клітин феохромоцитом PC12, яка має нейрональне походження. Дана лінія виникла шляхом клонування трансформованого утворення на мозковому шарі кори надниркової залози щура. Для цієї клітинної лінії характерна здатність до необмеженого поділу клітин *in vitro*, здатність до диференціації у результаті дії різних факторів, можливість набувати особливостей, притаманних зрілій нервовій клітині (симпатичний нейрон): утворення нейритів, синтез та секретування шляхом екзоцитозу нейротрансмітерів [31, 9].

2.2 Матеріали, реактиви та обладнання

Для наших досліджень було використано наступні матеріали:

1. Середовище для культивування RPMI (включає в себе 10% кінської та 5% ембріональної бичачої сироватки, сульфат гентаміцину/стрептоміцину (0,04 г на 500 мл середовища), глутамін (150 мг на 500 мл середовища).
2. Агароза (Fermentas RO.4911009), 50x TAE Electrophoresis Buffer, Invitrogen Improving cDNA yield (SuperScripttm 3);
3. Trizol Product, ThermoFisher Scientific, RiboLock, 10mM dNTP, транскриптаза (Invitrogen, США), хлороформ-ізоаміловий спирт 49:1, фенол;
4. rHu-NGF- β – фактор росту нейронів у вигляді порошку;

5. Пропідій-йодид, 4% Paraform (Invitrogen, США), Hoechst, Aqua PolyMount (Polysciences, Inc., США)

Також було використано наступні реактиви для поетапної екстракції РНК, зворотної транскрипції та приготування ПЛР-суміші:

Таблиця 2.1

Реактиви для поетапної екстракції РНК

Назва реактиву	Кількість реактиву
Trizol/(гуанідин+фенол)	500-1000мкл
Хлороформ ізоаміловий спирт 49:1	1/5 від Trizol
Ізопропанол	1/1 від обсягу

Таблиця 2.2

Реактиви для зворотної транскрипції

Назва реактиву	Кількість реактиву
Random H.P	1 мкл
5x Reaction Buffer	4 мкл
Ribolock	1 мкл
dNTP Mix	2 мкл
Revertase transcript (RevAid, США)	1 мкл
H ₂ O	6 мкл

ПЛР-суміш

Назва реактиву	Кількість реактиву
2x PCR master-mix	10 мкл
Forward primer	2 мкл
Reverse primer	2 мкл
кДНК	2-3 мкл
H ₂ O	4 Мкл

Було використано наступне обладнання:

1. електронні ваги («Ohaus», Китай),
2. рН-метр («Denver Instrument», США),
3. магнітний розмішувач («Hanna Instrument», Німеччина),
4. світловий мікроскоп («Carl Zeiss», Німеччина),
5. мікроскоп Nikon Eclipse TS-100F,
6. термостат,
7. центрифуга Mini Spin («Ependorf», Німеччина),
8. скляний гомогенізатор
9. конфокальний мікроскоп Olympus FluoView fv1000
10. спектрофотометр NanoDrop 1000
11. ампліфікатор Labnet MultiGene OptiMax («Biosan», Латвія, Англія)
12. прилад для електрофорезу

2.3 Методи дослідження

2.3.1. Індукція хімічної гіпоксії клітинної лінії PC12

Протягом періоду підготовки до експерименту клітини знаходились у CO₂ інкубаторі за присутності 5% CO₂, вологості у 98% і 37°C. Перед початком експерименту кількість клітин у камері Горяєва становила приблизно 10⁶мл.

Хімічна гіпоксія індукувалась дитіонітом натрію у концентрації 100 мкл протягом 1 год.

2.3.2. Диференціація клітин лінії PC12 у модель симпатичних нейронів

Клітини культивувались в моношарі розчину, який складався з RPMI-1640, 10% кінської сироватки та 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби, в скляних чашках Петрі. Поживне середовище заміняли кожні 3-4 дні у співвідношенні 1:3. Культуру вирощували в CO₂ інкубаторі з 5% CO₂ за температури +37°C.

Для диференціації клітин використовувалося «середовище голодування», куди клітини лінії PC12 переносились заздалегідь. В клітинне середовище вносили гHu-NGF-β, додавали 6мкл NGF на 3мл середовища з клітинами. При цьому концентрація NGF у вихідному розчині становила 100нг/мл. Клітини культивували протягом чотирьох- п'яти днів. Контроль перебігу диференціації проводився методами світлової мікроскопії: оцінювалася форма клітин, розташування у просторі, кількість і форма нейритів, інші культуральні характеристики.

Екстракція РНК була проведена тризолом. За допомогою зворотної транскрипції РНК переводили у кДНК. Далі проводилась ампліфікація Kv1.2 каналів у зразках. Аналіз результатів проводився за допомогою електрофорезу в 1.5% агарозному гелі. Для виявлення експресії генів, що кодують білки α -субодиниці Kv-1.2-каналів використовували праймери з послідовністю: F 5'-CCG GGA GAC AGA GGG AGA GG-3' та R 5'-TTG ATA TGG TGT GGG GGC TAT GA-3' з розміром продукту 537 пар основ.

Після екстракції РНК її концентрацію було перевірено у пробі на спектрофотометрі nano-drop 1000 (рис.2.1).

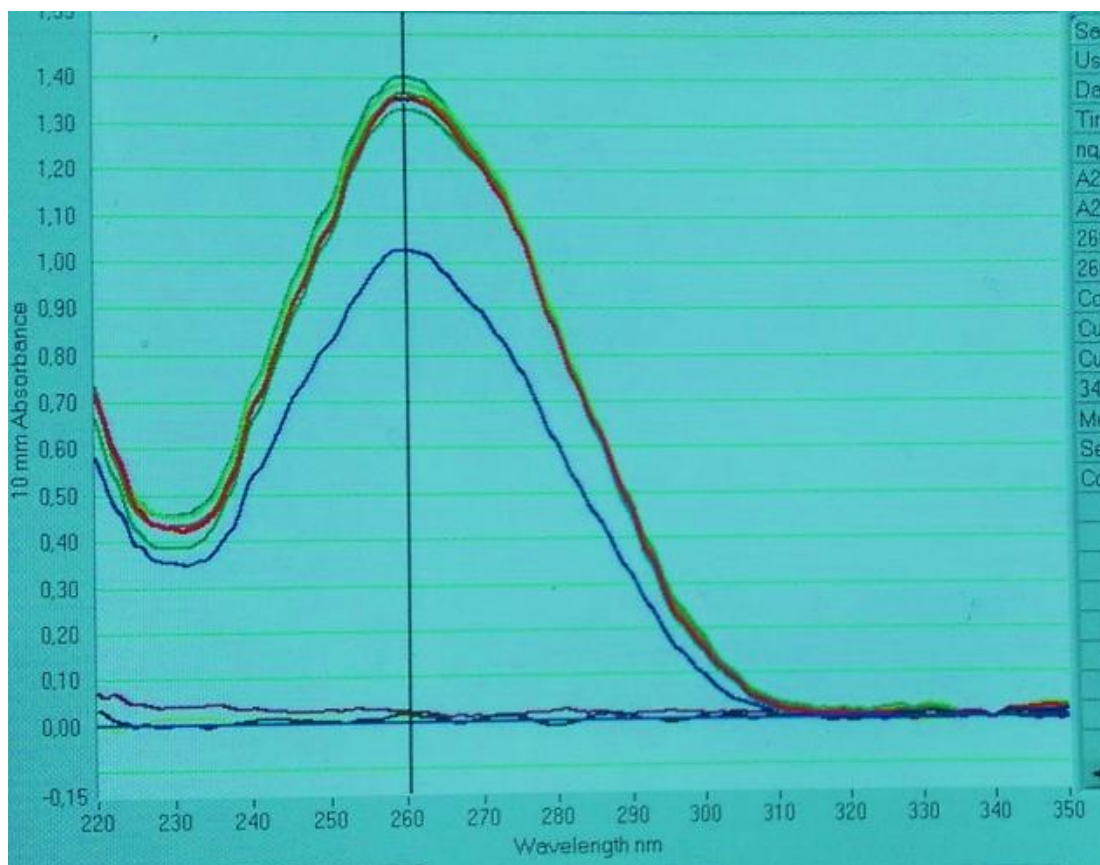


Рис. 2.1. Результати спектрофотометричного аналізу.

Дана модель дозволяє отримати дані про концентрацію РНК у зразку майже миттєво, бо програмне забезпечення спектрофотометра самостійно розраховує

концентрації. При наявності розбіжностей концентрацій РНК у пробах концентрація приводилась до середніх значень шляхом розбавлення зразку.

Зворотна транскрипція була поділена на три етапи:

1. Змішували зразки та H_2O з RHP.
2. Ставили суміш у ампліфікатор на 5 хвилин при температурі $+70^{\circ}C$.
3. Додавали до суміші dNTP Mix, Ribolock та ревертазу.

2.3.3. Конфокальна мікроскопія

Конфокальна мікроскопія надає можливість використовувати два різні барвники, один з яких ідентифікував живі клітини, а другий – некротичні клітини, які загинули шляхом апоптозу. Вимірювання та спостереження проводились з допомогою конфокального мікроскопу Olympus FluoView fv1000, Japan.

Перед роботою з конфокальним мікроскопом створювались фіксовані препарати культури клітинної лінії PC12, фіксація відбувалася з використанням речовин Paraform та PolyMount. Для утворення контрасту шляхом флуорисценції використовували зразки клітин пофарбовані барвниками пропідій йодид та Hoechst.

2.3.4. Проведення ПЛР.

Ампліфікатор було налаштовано наступним чином:

1. Нагрів до $110^{\circ}C$
2. $95^{\circ}C$ на 5хв

3. 30х циклів
 - 3.1. 95°C на 30 секунд
 - 3.2. 62°C на 30 секунд
 - 3.3. 72°C на 30 секунд
4. 72°C на 5 хвилин
5. Store forever

Далі після закінчення досліджень ПЛР ампліфікони було залишено для зберігання при кімнатній температурі.

2.3.5. Електрофорез

Електрофорез – метод відокремлення одних видів молекул від інших. Для цього суміш молекул пропускається через гель, який пропускає тільки менші за розміром молекули. Рух молекул відбувається під дією електричного поля.

Для проведення електрофорезу було використано 1.5% -ий агарозний гель. До близько 100 мл попередньо розведеного у 10 разів п'ятидесяти-відсоткового ТАЕ буферу додавали агарозу, після чого нагрівали її до повного розчинення кристалів. Перед заливанням розчину у форму для електрофорезу, у нього додавали бромистий етидій ($C_{21}H_{20}BrN_3$). Через те, що етидій зв'язується з ДНК, то після електрофоретичного розділення ДНК чітко візуалізується під впливом ультрафіолетових променів довжиною 254нм або 312нм у транслюмінаторі. Незважаючи на те, що етидій має флуоресцентні властивості без зв'язування, при поєднанні з молекулами ДНК він починає флуоресцентувати у 20 разів сильніше.

До ампліфікованої кДНК додавали барвник (Loading dye) об'ємом 1 мкл, що дозволило візуально спостерігати за перебігом електрофорезу.

Для аналізу розміру одержаних продуктів маркер ДНК додавали в одну із лунок, бо він вказував на молекулярну масу розділених нуклеїнових кислот.

Електрофоретичне розділення проводилось протягом 30 хвилин за напруги 69V та потужності 7W.

2.3.6. Обробка результатів.

Статистичну обробку було проведено за допомогою мови програмування SAS. Було проведено кілька тестів на нормальність (тест Шапіро), які підтвердили нормальність для всіх рядів. За допомогою тесту на гомогенність Бартлетта було виявлено негомогенність розподілу. Тест Краскала-Уоліса було проведено для перевірки медіан на рівність.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В наших дослідженнях ми використовували щойно виготовлений розчин дітіоніту ($100\text{ }\mu\text{M}$). Реєстрація рівню кисню в середовищі де знаходилися клітини проводилася за допомогою полярографічного методу вимірювання парціального тиску кисню ($p\text{O}_2$) платиновим електродом [49, 50]. За таких умов, рівень кисню складав $15\div 20\%$ від його значень в нормальних умовах.

Використовувались клітини культури PC12 які знаходилися в недиференційованому стані (інтактні), та ті що піддавалися диференціації (диференційовані). На початку досліджень проводилися визначення оптимального часу прикладання гіпоксичного впливу на клітини PC12, для того щоб провести адекватні вимірювання. З цією метою, клітини підлягали впливу гіпоксії протягом різного часу і їх життєздатність визначалась за допомогою барвників Hoechst 33258 та PI і конфокальної мікроскопії, рис. 3.1.

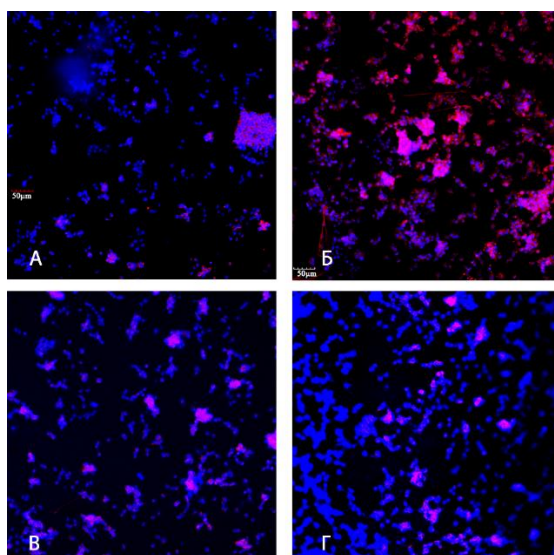


Рис. 3.1. Подвійне забарвлення клітин лінії PC12 барвниками Hoechst 33258 і PI у інтактному та NGF-диференційованому станах за умов нормоксії та гіпоксії:

інтактні клітини при нормоксії (А), гіпоксії (Б). NGF-диференційовані клітини при нормоксії (В), в умовах гіпоксії (Г). Шкала для всіх панелей – 50 мкм.

При застосуванні вказаних барвників, клітини мають блідо синє з схильністю до фіолетового забарвлення, при нормальному фізіологічному стані клітин; забарвлення у червоний колір, свідчить про порушення структури ядра та некротичні зміни. Такі клітини практично відсутні у наших зразках. Клітини, що мають різко яскраве неонове-синє забарвлення, є такими, що піддалися апоптозу. Таких клітин виявлялося небагато, що свідчило про задовільний функціональний стан контрольних зразків. Контроль стану клітин при індукції гіпоксії проводили кожні 30 хвилин з моменту початку інкубації у гіпоксичному розчині.

Таким чином, ми встановили, що при наших умовах досліджень одна година впливу гіпоксії є оптимальною величиною для проведення досліджень.

При дослідженні відносної експресії гену α -субодиниці Kv1.2 калієвих каналів у клітинах лінії PC12 був використаний метод ПЛР з подальшим електрофорезом на агарозному гелі. Для аналізу електрофореграм використовували напівкількісний метод визначення інтенсивності експресії досліджуваних генів, яка представлялась в умовних одиницях. Інтенсивність експресії отримували шляхом поділу кількості пікселів амплікону дослідного гену, зображеного на електрофореграмі, на кількість пікселів референсного гену (рибосомальна 18S РНК), експресія якого не змінюється підчас гіпоксії. Цей метод дозволяє побачити дійсну зміну експресії досліджуваних генів не залежно від кількості клітин у контрольних та дослідних зразках. Було обрано 100%-ий контроль. Кожний експеримент був проведений у 8 повторях для кожної групи.

Перш за все, було проведене порівняння експресії гену Kv1.2 у інтактних та диференційованих PC12 клітин після їх інкубації з NGF в нормоксичних умовах. Як можна бачити із рис. 3.2 експресія гену Kv1.2 при диференціюванні клітин дещо зменшувалась (на $6,5 \pm 4,0\%$, $n=8$), але статистично не достовірно, рис. 3.2.

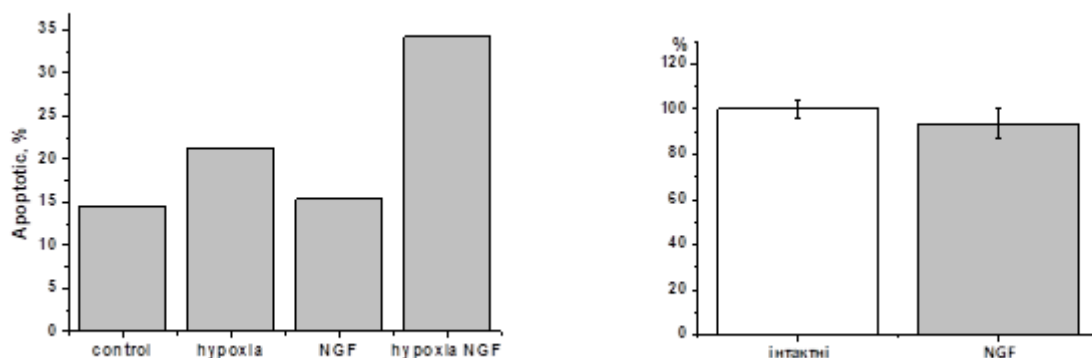


Рис 3.2. Діаграма рівня експресії гену каналів Kv1.2 у інтактних та NGF-диференційованих PC12 клітинах в умовах нормоксії. * $p < 0,05$ відносно рівню в інтактних клітинах.

В наступній серії експериментів визначалась експресія Kv1.2 каналів в умовах гіпоксії. На рис. 3.3 представлені електрофореграми отримані на недифенційованих клітинах в нормоксичних (contr) та гіпоксичних (hyp) умовах. Можна бачити, що експресія гену Kv1.2 збільшується в умовах гіпоксії на $28,0 \pm 10,0\%$ ($n=8$), $p < 0.05$. Ці дані добре корелюють з результатами інших дослідників отриманих на інших типах клітин [47, 48].

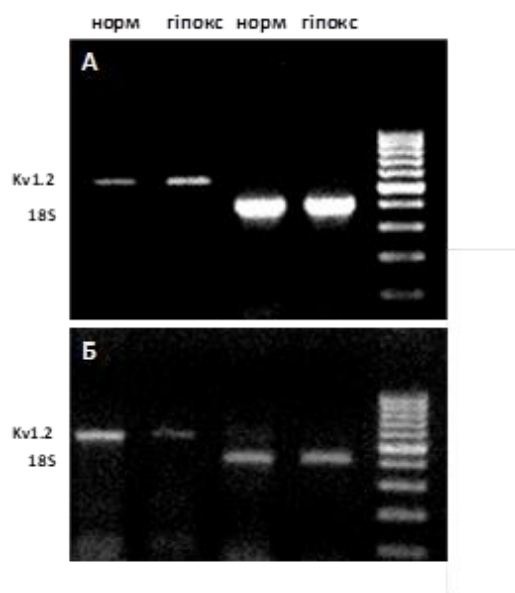


Рис. 3.3. Електрофореичний гель продуктів полімеразної ланцюгової реакції фрагментів гену калієвих каналів Kv1.2 типу у інтактних та NGF-диференційованих PC12 клітинах в умовах нормоксії (норм) та гіпоксії (гіпокс). 18S – референсний ген (рибосомальна 18S РНК).

Однак, в результаті дослідження експресії Kv1.2 у диференційованих PC12 клітин, які піддавались впливу фактору росту нейритів NGF, був зареєстрований протилежний ефект – зменшення експресії гену Kv1.2 на $27.9 \pm 12,0\%$ ($n=8$) у порівнянні з величиною, отриманою у нормоксичних умовах на цих клітинах (Рис. 3.3), або на $33,0 \pm 12,0\%$ ($n=8$) менше по відношенню до експресії даного гену у нормоксичних умовах недиференційованих клітин (Рис. 3.4). Цікаво, що пригнічення активності генів з боку NGF в умовах гіпоксії також було продемонстровано на PC12 клітинах в гіпоксичних умовах, але це стосувалося гену HIF2 α (транскрипційний фактор, який називають гіпоксія-індуцибельний фактор, hypoxia-inducible factors) [46].

Якщо ж порівняти експресію Kv1.2 у недифенційованих клітинах та тих що перебували під впливом NGF в умовах гіпоксії, то різниця складатиме $48,7 \pm 9,0\%$ (Рис. 3.4). Тобто, в гіпоксичних умовах, рівень експресії гену каналів Kv1.2 у

диференційованих клітинах PC12 майже вдвічі менше ніж у недиференційованих клітин.

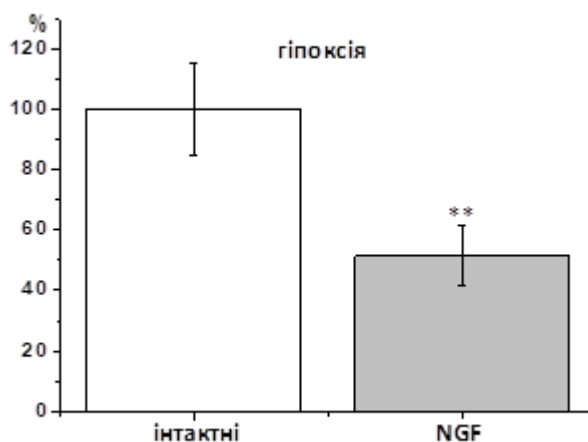


Рис. 3.4. Діаграма рівня експресії гену каналів Kv1.2 у інтактних та NGF-диференційованих клітинах в умовах гіпоксії. ** $p < 0,01$ відносно рівню в інтактних клітинах.

Сумарна кількісна оцінка експресії гену Kv1.2-каналів у клітинах PC12 феохромоцитоми представлена на рис.3.5. Представлені результати вказують на суттєві зміни на генетичному рівні (експресія мРНК) калієвих каналів Kv1.2-типу у недиференційованих та диференційованих клітин феохромоцитоми PC12 в умовах гіпоксії. Причому, напрям ефекту гіпоксії на Kv1.2-канали був протилежний – у першому випадку спостерігалось збільшення, тоді як у другому – зменшення їх експресії.

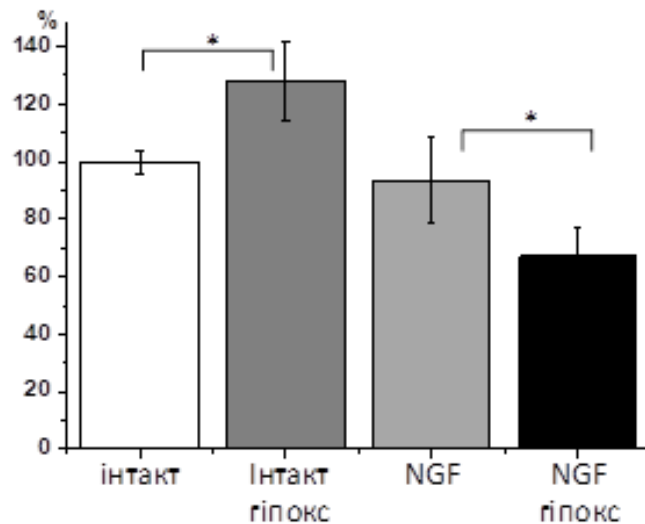


Рис. 3.5. Загальне порівняння експресії гену каналів Kv1.2 у інтактних та диференційованих PC12 клітинах в умовах нормоксії та гіпоксії. Нормовано відносно рівню в інтактних клітинах при нормоксії. * $p < 0,05$ відносно рівнів в відповідних нормоксичних умовах.

Як відомо, пухлинні клітини майже по декільком десяткам параметрів відрізняються від нормальних. Можливо, велика різниця в експресії гену α -субодиниці Kv1.2-каналу під впливом гіпоксії пояснюється саме різницею в станах експресійного апарату нормальних та пухлинних клітин. Зміни в експресії можуть свідчити про те, що клітини диференційовані фактором росту нейронів NGF на фінальній стадії максимально наближені до нервової клітини, та синтезують значно менше відповідних каналів, в порівнянні з пухлинними клітинами, що є нормою їх фізіології.

Показано, що недиференційовані клітини значно «спокійніше» реагують на гіпоксію, та здатні витримувати значно довшу її модуляцію. З іншого боку, клітини культивовані з NGF вже через годину виявляють ознаки незначних апоптозних змін. Було зроблене припущення, що диференційовані клітини мають більш розвинені механізми індукції клітинної смерті, якщо мати на увазі, що апоптоз є відповіддю на розвиток гіпоксії, а не результатом некерованого порушення більш

високої організації таких клітин. Крім того, нещодавні дослідження показали, що гіпоксія може впливати на ріст нейритів у PC12 клітин, але цей феномен не пов'язаний із залученням у цей процес фактору росту нейритів NGF [45].

В наших експериментах у інтактних клітинах за умов гіпоксії було зареєстровано збільшення росту експресії гену Kv1.2 на 28%, у порівнянні з інтактними клітинами в умовах нормоксії, що пояснюється тим, що в клітинах в умовах стресу вмикаються компенсаторні механізми, оскільки збільшення експресії Kv1.2-каналів призводить до збільшення гіперполяризації мембрани і відповідно зменшенню її збудливості. На відміну, у NGF-диференційованих клітин, що зазнали впливу гіпоксії, експресія Kv1.2 зменшувалася на 33%. Останнє свідчить про те, що збудливість клітин збільшувалася і вони ставали більш чутливими до факторів впливу (іони кальцію, ексайтотоксичність) які призводять до процесів апоптозу та некрозу.

Існують суперечливі дані щодо дії фактору NGF на виживання клітин в гіпоксичних умовах. Так, Табакман і співавтори показали, що NGF спричиняє нейпротективну дію під час киснево-глюкозного позбавлення (OGD) [30], тоді як інші автори вказують на протилежний ефект дії NGF в умовах гіпоксії. Наші дані корелюють із дослідженнями Шарлі та співав., які показали, що NGF-оброблені клітини PC12 були більше схильні до смерті у порівнянні з інтактними клітинами [44]. Також у вказаних клітин автори спостерігали пригнічення цим фактором HIF-1 α -регульованих генів, які відповідають за адаптаційні відповіді на гіпоксичні стреси. Автори припустили, що зменшення HIF-1 α -активності і підвищення чутливості до гіпоксії передбачає що NGF в умовах гіпоксії діє як сигнальна молекула, що може запускати апоптоз. Так, NGF з однієї сторони діє як трофічний фактор коли він активує рецептори тирозинкінази-A (TrkA), що впливають на виживання і диференціювання нейронів через декілька сигнальних каскадів, з другої сторони, цей фактор може зв'язуватися з рецептором p75, що може активувати програмовану смерть [43]. Таким чином можна припустити, що в

залежності від експресії в клітинах рецепторів Trk A або p75, один і той же фактор NGF може діяти або як протектор чи запускати процеси клітинної смерті.

З іншого боку, зниження експресії гену Kv1.2 у NGF-диференційованих клітин, можна пояснити зміною інтенсивності трансляції генів у відповідь на гіпоксичний стрес, або зменшенням експресії гена у зразках через некротичне зменшення популяції клітин у результаті гіпоксії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Василенко Д. А. Целенаправленные усилия, развиваемые запястьем человека: циклические компоненты в моторной команде / Д. А. Василенко, Б. Я. Пятигорский, А. Э. Иванов, Д. Д. Василенко // Нейрофизиология. — 1993. — Т. 1, № 6. — С. 455–462.
2. Wasicko M.J. Postnatal development of carotid body glomus cell response to hypoxia / M.J. Wasicko, G.E. Breitwieser, I. Kim [et al.] // Respiratory Physiology and Neurobiology – 2006. – Vol. 154. – P. 356-371.
3. Верещака И. В. Активация мышц плечевого пояса и плеча человека при различных скоростях развития предплечьем “двухсуставных” изометрических усилий / И. В. Верещака // Нейрофизиология. — 2010. — Т. 42, № 6. — С. 500–509.
4. Saito Y. The effect of acetylcholine on chloride transport across the mouse lacrimal gland acinar cell membranes / Y. Saito, T. Ozawa, H. Hayashi [et al.] // Pflugers Arch. – 1987. – Vol. 409, No. 3. – P. 280 – 288.
5. Воробьев В. П. Атлас анатомии человека / В. П. Воробьев, Р. Д. Синельников. — М. : Медгиз, 1948.
6. Гехт Б. Н. Теоретическая и клиническая электромиография / Гехт Б. Н. — Л. : Наука, 1990. — 240 с.
7. Горковенко А. В. Особенности активации мышц плеча и плечевого пояса человека при выполнении произвольных двухсуставных движений руки / А. В. Горковенко, А. Н. Тальнов, В. В. Корнеев, А. И. Костюков // Нейрофизиология. — 2009. — Т. 41, № 1. — С. 48–56.
8. Команцев В. Н. Методические основы клинической электромиографии / Владимир Николаевич Команцев. — Санкт-Петербург, 2006. — 356 с.
9. Zhang D. Diazoxide preconditioning alleviates caspase-dependent and caspase-independent apoptosis induced by anoxia-reoxygenation of PC-12 cells / H. Zhang // J. Biochem. – 2010. – Vol. 148, № 4. – P. 413-421.
10. Костюков А. И. Динамические свойства двигательной системы млекопитающих / Александр Иванович Костюков. — Киев, 2007. — 198 с.

11. Worthington K. Enzyme Manual / K. Worthington, V. Worthington // Worthington Biochemical Corporation. – 2011. – P. 1-2.
12. Пятигорский В. Я. Изометрические усилия, развиваемые запястьем руки человека: силовые траектории при наличии и отсутствии визуальной цели / В. Я. Пятигорский, А. Э. Иванов // — 1991. — Т. 23, № 1. — С. 24–34.
13. Пятигорский В. Я. Целенаправленные усилия, развиваемые запястьем человека: силовые траектории в условиях повторения и случайного чередования различных уровней усилия / В. Я. Пятигорский, Д. А. Василенко, А. Э. Иванов // Нейрофизиология. — 1993. — Т. 1, № 5. — С. 389–399.
14. Тальнов А. Н. Координация динамических фаз ЭМГ — активности сгибателей локтевого сустава человека при осуществлении точностных следящих движений / А. Н. Тальнов, С. Г. Серенко, В. Л. Черкасский // Нейрофизиология. — 1998. — Т. 30, № 3. — С. 212–225.
15. Физиология человека: Пер. с англ. — Мир. : 1996. — Т. 1. — С. 50–146.
16. Хилл А. Механика мышечного сокращения / Хилл А. — М. : Мир, 1972. — 182 с.
17. Conforti L. O₂-sensitive K⁺ channels: role of the Kv1.2 α -subunit in mediating the hypoxic response / L. Conforti, I. Bodi, J.W. Nisbet [et al.] // Journal of Physiology – 2000. – Vol. 524, № 3. – P. 783-793.
18. Клевець М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин / М.Ю. Клевець, В.В. Манько // Физиол. журн. – 1992. – Т. 38., № 3. – С. 70– 75.
19. Bernstein N. A. The co-ordination and regulation of movements / Bernstein N. A. — Oxford UK : Pergamon Press, 1967. — 193 p.
20. Berniker M. Simplified and effective motor control based on muscles synergies to exploit musculoskeletal dynamics / M. Berniker, A. Jarc, E. Bizzi, M. C. Tresch // Proceedings of the National Academy of science. USA. — 2009. — V. 109. — P. 7601–7606.
21. Buchanan T. S. Neuromusculoskeletal modeling: estimation of muscles forces and joint movements from measurements of neural command / T. S. Buchanan, D. G.

Lloyd, K. Manal, T. F. Besier / J. Appl. Biomech. — 2004. — V. 20. № 4. — P. 367–395.

22. Degreve L. The hydration structure of the Na⁺ and K⁺ ions and the selectivity of their ionic channels / L. Degreve, M. Vechi, C.Q. Junior // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1996. – Vol. 1274. – P. 149-156.

23. Chalovich J. M. Actin mediated regulation of muscle contraction / J. M. Chalovich // *Pharmacol. Theor.* — 1992. — V. 55, № 2. — P. 95–148.

24. Chez C. Trajectory control in targeted force impulses. I. Role of opposing muscles / C. Chez, J. Gordon // *Exp. Brain. Res.* — 1987. — V. 67, № 2. — P. 225–240.

25. Vasilious P. Adaptative mehanisms during chronic hypoxia in COPD / P. Vasilious, P. Ioannis // *Pneumon* – 2008. – Vol. 21, № 2. – P. 134-144.

26. Sharma T. The role of K⁺ channels in the uptake and redistribution of Potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana* / T. Sharma, I. Dreyer, J. Riedelsberger // *Frontiers in Plant Science* – 2004. – Vol. 4. – P. 1-16.

27. Dounskaia N. V. Control of human limb movements: the leading joint hypothesis and its practical applications / N. V. Dounskaia // *Exerc. Sport Sci. Rev.* — 2010. — V. 38. — P. 201–208.

28. Feldman A. G. Superposition of motor programs. I. Rhythmic forearm movements in man / A. G. Feldman // *Neurosci.* — 1980. — V. 5. — P. 81–90.

29. Feldman A. G. Referent configuration of the body: a global factor in the control of multiple skeletal muscles / A. G. Feldman // *Exp. Brain Res.* — 2004. — V. 155. — P. 579.

30. Friedman A. L. Mechanical characterization of skeletal muscles myofibrils / A. L. Friedman, Y. E. Goldman // *J. Biophysic.* — 1996. — V. 71. — P. 2774–2785.

31. Haase J. Problems of postsynaptic autogenous and recurrent inhibition in Mammalian spinal cord / J. Haase, S. Cleveland, H. G. Ross // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* — 1975. — V. 73. — P. 73–129.

32. Characterization of torque-related activity in primary motor cortex during a multijoint postural task / T. M. Herter, I. Kurtter, D. W. Cabel [et al.] // *J. Neurophysiol.* — 2007. — V. 97. — P. 2887–2899.

33. Herzog W. Force sharing among synergistic muscles: theoretical consideration and experimental approaches / W. Herzog. — Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. — P. 173–202. — (Exercise and Sport science reviews / In Holloszy J. O. ed.).

34. Huxley A. F. Structural changes in muscles during contraction. Interference microscopy in living muscle fibres / A. F Huxley, R. Nidergerke // *Nature*. — 1954. — V. 173, № 4412. — P. 971–973.

35. Glauner K. S. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel / K.S. Glauner // *Nature*. — 1999. - Vol. 402. — P.813–817.

36. Martin V. Redundancy, selfmotion, and motor control / V. Martin, J. P. Scholz, G. Schoner // *Neural Comput.* — 2009. — V. 21, № 5. — P. 371–414.

37. McKillop D. F. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment: evidence for three states of the thin filaments / D. F. McKillop, M. A. Geeves // *J. Biophys.* — 1993. — V. 65, № 2. — P. 693–701.

38. Murray W. M. The isometric functional capacity of muscles that cross the elbow / W. M. Murray, T. S. Buchanan, S. L. Delp // *J. Biomech.* — 2000. — V. 33. — P. 943–952.

39. Squire J. H. Molecular mechanism in muscular contraction / J. H Squire // *Trends Neurosci.* — 1983. —V. 6, № 2. — P. 408–413.

40. Saito Y. The effect of acetylcholine on chloride transport across the mouse lacrimal gland acinar cell membranes / Y. Saito, T. Ozawa, H. Hayashi [et al.] // *Pflugers Arch.* — 1987. — Vol. 409, No. 3. — P. 280 – 288.

41. Pellegrino M.J. An analysis of nerve growth factor-dependent differentiation and neurite outgrowth in the PC-12 cell model system / M. J. Pellegrino // *Oregon Health and Science University* — 2008. — P. 1-203.

42. Sansom M.S.P. Potassium channels: structures, models, simulations / M. S.P. Sansom, I.H. Shrivastava, J.N. Bright [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta* — 2002. — Vol. 1565. — P. 294-307.

43. T. Kume, H. Nishikawa, H. Tomioka, et al., "p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures," *Brain Res.*, 852, 279-289 (2000).

44. N. Charlier, N. Leclere, U. Felderhoff, et al., "Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor," *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 104, 21-30 (2002).
45. C. M. O'Driscoll and A. M. Gorman, "Hypoxia induces neurite outgrowth in PC12 cells that is mediated through adenosine A2A receptors," *Neuroscience*, 131, 321-329 (2005).
46. S. Naranjo-Suarez, M. C. Castellanos, M. Alvarez-Tejado, et al., "Down-regulation of hypoxia-inducible factor-2 in PC12 cells by nerve growth factor stimulation," *J. Biol. Chem.*, 278, 31895-31901 (2003).
47. Q. Dong, N. Zhao, C. K. Xia, et al., "Hypoxia induces voltage-gated K⁺ (Kv) channel expression in pulmonary arterial smooth muscle cells through hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)," *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, 12, 158-163 (2012).
48. F. Li, J. Lu, C. Y. Wu, et al., "Expression of Kv1.2 in microglia and its putative roles in modulating production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species," *J. Neurochem.*, 106, 2093-2105 (2008).
49. V. M. Shkryl and E. A. Lukyanetz, "Properties of O₂-sensitive electrodes used in patch-clamp experiments on nerve cells," *Neurophysiology*, 30, 222-225 (1998).
50. E. A. Lukyanetz and V. M. Shkryl, "Scientific and technological aspects of oxygen-sensitive electrodes for measurements of oxygen partial pressure in patch-clamp experiments," *J. Biochem. Biophys. Methods*, 55, 37-52 (2003).