

## АТФ-АЗНА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН ЗОВНІШНЬООРБІТАЛЬНОЇ СЛЪЗОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРА ЗА УМОВ *IN SITU*

А. Котлярова, В. Манько

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: annkotliarova@gmail.com

Виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу є енергозалежним процесом, і основну роль у цьому процесі відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулу. Одним із експериментальних підходів для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -помп різних клітин є визначення  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності її очищених препаратів або везикул плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулу. Але важливим аспектом фізіологічних досліджень є вивчення внутрішньоклітинних процесів за умов, максимально наближених до природних, не розриваючи взаємозв'язків між транспортувальними системами різних органел. Метою цієї роботи було оцінити можливість використання ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин слъзових залоз для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності. Дослідження проведено на пермеабілізованих дигітоніном секреторних клітинах зовнішньорбітальної слъзової залози щура.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азну активність оцінювали на основі змін вмісту неорганічного фосфату в середовищах, який визначали методом УФ-детекції. Встановлено, що оптимальний час інкубації для дослідження АТФ-азної активності секреторних клітин зовнішньорбітальної слъзової залози за умов *in situ* становить 15 хв. Максимум  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності спостерігається за 2 ммоль/л екзогенного АТФ, а еозин Y-чутливої – за 3 ммоль/л.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що слугує підтвердженням функціонування у досліджуваних клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулу. На основі отриманих нами результатів можна стверджувати про адекватність запропонованого методу дослідження АТФ-азної активності в умовах *in situ*.

**Ключові слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азна активність, еозин Y, тапсигаргін, пермеабілізація, секреторні клітини, слъзова залоза, катіони  $\text{Ca}^{2+}$ .

Важливу роль у підтриманні внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу секреторних клітин, що було доведено для ацинарних клітин підшлункової залози [23, 25], слинних залоз ссавців [1, 23], шлункових залоз [6], секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* [7, 11], відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулу.

$\text{Ca}^{2+}$ -помпи є системами енергозалежного транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , роль яких виконує  $\text{Ca}^{2+}$ -активована,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна АТФ-аза. Тому їх здебільшого досліджують, визначаючи  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність очищених препаратів або везикул клітинних мембран. Але важливим аспектом фізіологічних досліджень є з'ясування внутрішньоклітинних процесів в умовах, максимально наближених до природних, з незруйнованими взаємозв'язками між органелами.

Пермеабілізовані клітини є зручним об'єктом для дослідження функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулу, оскільки в цьому випадку зберігаються такі умови. Нашими попередніми дослідженнями з використанням методу визначення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах [10] було ідентифіковано та з'ясовано деякі властивості

Ca<sup>2+</sup>-помп пермеабілізованих секреторних клітин слинних залоз зовнішньоорбітальної слинної залози щура. Але кожен метод має свої обмеження, і для об'єктивної інтерпретації отриманих даних необхідне застосування різних експериментальних підходів. Тому мета цієї роботи – оцінити можливість використання ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин цих залоз для дослідження Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності.

Для досягнення мети було поставлено завдання підібрати оптимальні умови для дослідження Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура за умов *in situ*. Спочатку необхідно виокремити Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азну активність із сумарної АТФ-азної активності досліджуваних клітин. Для цього ми апробували два методичні підходи: 1) зменшили концентрацію Ca<sup>2+</sup> у середовищі інкубації за допомогою ЕГТА; 2) додали до середовища інгібітор Ca<sup>2+</sup>-помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу еозин Y.

Залежність від концентрації Ca<sup>2+</sup> у середовищі серед усіх транспортувальних АТФ-аз найбільш притаманна Ca<sup>2+</sup>-активованим, Mg<sup>2+</sup>-залежним АТФ-азам плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулулу. Правда, катіони Ca<sup>2+</sup> можуть стимулювати і Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-азу плазматичної мембрани [7], але її легко заінгібувати, додавши до середовища інкубації оубаїн (строфантин G) або строфантин K. Тому можна припустити, що ЕГТА-чутливою частиною АТФ-азної активності можна характеризувати ферментативну активність клітинних Ca<sup>2+</sup>-помп.

Еозин Y є інгібітором Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз багатьох типів клітин (Ca<sup>2+</sup>-помпи плазматичної мембрани еритроцитів [20], Ca<sup>2+</sup>-помп гладеньком'язових клітин [8], слинних залоз личинки дзвінця [11–13], Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулулу клітин міометрія [9]). Він інгібує функціонування транспортних АТФ-аз за рахунок адсорбції з АТФ-зв'язуючим центром цих ферментів. Використання еозину Y допомагає оцінити активність власне транспортних АТФ-аз.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на нелінійних щурах масою 170–240 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

##### *Ізолювання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура*

Після наркотизації тварини хлороформом і декапітації швидко виділяли зовнішньоорбітальну слюзову залозу (*glandula orbitalis externa*) й очищали її від сполучної тканини.

Для ізолювання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура використали модифікований нами метод В. Герцога, Г. Сайдеса і Ф. Міллера [21]. Підібравши умови ізолювання, ми встановили, що оптимальним є використання дворазової почергової інкубації у позаклітинному Ca<sup>2+</sup>-вмісному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та лідази, і позаклітинному середовищі, яке містить ЕГТА (2 ммоль/л). Спочатку у відпрепаровану залозу ін'єкцією вводили суміш колагенази (690 од./мл) з лідазою (400 од./мл), розчинених на основі позаклітинного середовища такого складу (ммоль/л): NaCl – 119, KCl – 6, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 10, NaHCO<sub>3</sub> – 25; pH 7,4. Після цього залозу інкубували 25 хв у водяному термостаті при температурі 37°C та помірному струшуванні. Після завершення інкубації змінювали розчин на позаклітинний, що містить ЕГТА (2 ммоль/л), та інкубували у ньому протягом 5 хв. Повторно інкубували у Ca<sup>2+</sup>-вмісному позаклітинному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та

лідази (15 хв), піпетували наконечниками з отвором різного діаметра у безкальцієвому ЕГТА-вмісному позаклітинному середовищі, після чого промивали у  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному розчині.

Кількість клітин підраховували за допомогою камери Горяєва. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально, з використанням світлового мікроскопа. Для цього 0,2% розчин трипанового синього, виготовленого на основі номінально безкальцієвого позаклітинного середовища, змішували зі суспензією клітин в однакових об'ємах і через 2–3 хв розглядали під мікроскопом. Відсутність забарвлення ядра свідчить про цілісність плазматичних мембран клітин.

#### *Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин*

Метод пермеабілізації плазматичної мембрани за допомогою дигітоніну часто застосовують для різних клітин [2, 14, 16, 22, 24].

Для сльозової зовнішньоорбітальної залози оптимальну концентрацію дигітоніну (50 мкг/мл у розрахунку на 0,5 млн клітин) ми підібрали експериментально. Спочатку клітини інкубували з дигітоніном протягом 10 хв при  $37^{\circ}\text{C}$  у середовищі, наближеному за іонним складом до внутрішньоклітинного (ммоль/л):  $\text{KCl}$  – 140,  $\text{MgCl}_2$  – 1,5,  $\text{CaCl}_2$  – 0,0274, ЕГТА – 0,1 ( $[\text{Ca}^{2+}] \approx 10^{-7}$  моль/л),  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,2. Концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  розраховували за допомогою програми *MaxChelator* (<http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>). Після пермеабілізації клітини двічі промивали наближеним за складом до внутрішньоклітинного розчином без дигітоніну. Ступінь пермеабілізації оцінювали візуально, шляхом фарбування трипановим синім.

#### *Визначення концентрації неорганічного фосфату і оцінка АТФ-азної активності*

Після відмивання клітин від дигітоніну суспензію розділяли на аліквоти й інкубували у відповідних середовищах протягом 15 хв. З метою блокування  $\text{Na}^+$ – $\text{K}^+$ -помпи до всіх середовищ додавали строфантин К (100 мкмоль/л) або оубаїн (25 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – азид натрію (10 ммоль/л). АТФазну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л). Після інкубації центрифугували протягом 5 с при 1600 g і швидко відбирали проби для визначення концентрації неорганічного фосфату ( $P_n$ ) методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу. Для серій встановлення часової та концентраційної залежності АТФ-азну реакцію зупиняли додаванням до середовища інкубації 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Вміст  $P_n$ , який визначали у середовищах із різними концентраціями АТФ, був постійним протягом часу інкубації, і прямо пропорційно залежав від концентрації АТФ. За умов інкубації клітин без АТФ рівень  $P_n$  відображав його базовий вміст у клітинах, а також той фосфат, який вивільнявся внаслідок гідролізу ендогенного АТФ.

Концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі моделювали шляхом застосування  $\text{Ca}^{2+}$ -ЕГТА-буферу (100 мкмоль/л ЕГТА). Різницю між вмістом  $P_n$  у середовищі з низькою концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$  моль/л) і середовищем, котре містило 2 ммоль/л ЕГТА (безкальцієве), вважали показником  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності, а зі середовищем, котре містило еозин Y, – показником еозин Y-чутливої АТФ-азної активності.

#### *Статистичний аналіз результатів досліджень*

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом, за статистично достовірні приймали зміни з  $P < 0,05$  [5].

#### **Результати і їхнє обговорення**

Для експериментального обґрунтування методу визначення АТФ-азної активності в умовах *in situ* спочатку визначили вміст  $P_n$  у середовищах, що містили (1) клітини, (2)

АТФ чи (3) клітини і АТФ після 15 хв інкубації при температурі 37°C. З'ясувалося, що рівень  $P_n$ , визначений як методом Фіске-Суббароу, так і методом УФ-детекції, був найнижчим у середовищі, котре містило лише пермеабілізовані клітини (табл. 1). Досить високою виявилася концентрація  $P_n$  у середовищі, що містило лише АТФ. Але у середовищі, яке містило і клітини, і АТФ, концентрація  $P_n$  була найвищою (табл. 1). При цьому його вміст у середовищі, що містило суміш АТФ і клітин, визначеного методом Фіске-Суббароу, був у  $21,07 \pm 4,33$  рази вищим, ніж у середовищі, котре містило лише клітини, а методом УФ-детекції – у  $16,93 \pm 2,46$  рази (табл. 1).

Алгебраїчна сума вмісту  $P_n$  в 1 мл середовища, що містило лише АТФ, і в середовищі, до якого додавали клітини, є суттєво нижчою, ніж його вміст у середовищі з клітинами та АТФ. Так, зокрема, вміст  $P_n$ , визначений методом Фіске-Суббароу, був на  $34,57 \pm 4,07\%$  нижчим, а методом УФ-детекції – на  $25,16 \pm 4,38\%$  (див. табл. 1). Отримані результати свідчать про функціонування за таких умов АТФ-аз у секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слъзової залози щура.

Отже, обома методами (Фіске-Суббароу та УФ-детекції) отримано подібні результати. Проте визначення  $P_n$  методом УФ-детекції є значно швидшим, за чутливістю не поступається методу Фіске-Суббароу, тому в усіх подальших серіях експериментів було застосовано цей метод.

Таблиця 1

Вміст  $P_n$  у середовищах (мкмоль/л), що містять пермеабілізовані секреторні клітини слъзових залоз, АТФ та їх суміш ( $M \pm m$ )

Метод визначення $P_n$	Середовище, що містить			Сумарна АТФ-азна активність (мкмоль $P_n$ /л)
	АТФ і клітини	клітини	АТФ	
За Фіске-Суббароу, (n=6)	669,22±84,39	42,01±13,65 ***	386,97±45,59 **	240,23±48,54 ***
УФ-детекції (n=8)	438,12±27,99	32,86±8,01 ***	289,02±11,58 ***	116,24±25,57 ***

**Примітки.** АТФ-азну активність розраховували як різницю між вмістом  $P_n$  у середовищі, що містило АТФ та клітини, і сумою його вмісту в середовищах, що містили лише клітини та лише АТФ;  $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[K^+] = 140$  ммоль/л,  $[строфантин К] = 100$  мкмоль/л,  $[АТФ] = 3$  ммоль/л,  $[NaN_3] = 10$  ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; кількість клітин у пробах 130–635 тис; для пермеабілізації плазматичної мембрани використано дигітонін (30 мкг/мл розрахунку на 1 млн клітин); \*\* – різниця порівняно з контролем відповідної групи достовірна з  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$

У подальших серіях експериментів підбирали оптимальний час інкубації клітин і оптимальну концентрацію АТФ у середовищі для дослідження  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активності за умов *in situ*. Для цього виділені та пермеабілізовані клітини розділяли на аліквоти й інкубували в середовищі (1) з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  без інгібітора  $Ca^{2+}$ -АТФаз, (2) з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  та еозином Y і (3) в ЕГТА-вмісному середовищі.

Встановлено, що вміст  $P_n$  у середовищі з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  без інгібітора (у контролі) достовірно зростав протягом часу інкубації клітин і на 1, 2,5, 5, 10 та 15 хв це зростання становило  $10,42 \pm 2,69$ ,  $17,47 \pm 2,89$ ,  $28,90 \pm 5,31$ ,  $47,91 \pm 8,82$  і  $59,90 \pm 13,56\%$  (табл. 2). Оскільки вміст  $P_n$  у середовищах зростав практично лінійно, ми можемо стверджувати, що субстрат (АТФ) у ході гідролісної реакції за 15 хв використовується не повністю. Це підтверджується і розрахунками. Так, із 3 мкмоль доданого АТФ (кількість АТФ за концентрації 3 ммоль/л в 1 мл розчину) може утворитися 3 мкмоль  $P_n$ . Ми ж визначили, що у контролі в 1 мл середовища інкубації вміст  $P_n$  в середньому становив 0,19 мкмоль, а, отже, за 15 хв інкубації використовується лише приблизно 6,3% доданого АТФ.

Вміст  $P_n$  у середовищах, що містили еозин Y (10 мкмоль/л) або ЕГТА (2 ммоль/л) також зростав зі збільшенням часу інкубації, проте у цьому випадку зміни були менш вираженими (табл. 2). Так, у середовищі, що містило еозин Y, вміст  $P_n$  зростав за 2,5, 5, 10 і 15 хв інкубації на  $15,87 \pm 4,37$ ,  $23,10 \pm 5,20$ ,  $38,96 \pm 8,47$  і  $47,84 \pm 11,61\%$  відповідно, а у ЕГТА-вмісному середовищі – на  $16,98 \pm 4,54$ ,  $31,44 \pm 7,96$ ,  $42,99 \pm 8,86$  і  $48,37 \pm 10,54\%$  порівняно з вмістом  $P_n$  до початку інкубації (0 хв). Правда, за наявності у середовищі еозину Y вміст  $P_n$  був достовірно менший, ніж у контролі, починаючи лише з 5 хв інкубації, а за наявності ЕГТА – лише на 15 хв (табл. 2). При дослідженні  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активності суспензії мембранних везикул інгібітори діють вже на 1–2 хв інкубації [3, 4]. Певна часова затримка при дослідженні АТФ-азної активності в умовах *in situ*, можливо, спричинена тим, що проникнення речовин до транспортувальних систем крізь плазматичну мембрану є більш тривалим, ніж за їх додавання до фракції мембранних везикул або/і більшою дисперсією отриманих даних.

Таблиця 2

Часова динаміка вмісту  $P_n$  (мкмоль/млн клітин) у середовищах, що містили пермеабілізовані клітини сльозових залоз і АТФ ( $M \pm m$ )

Середовище	Час інкубації					
	0 хв	1 хв	2,5 хв	5 хв	10 хв	15 хв
Контроль	1,05±0,03	1,16±0,06 *	1,23±0,05 **	1,35±0,07 **	1,55±0,10 **	1,72±0,14 **
Еозин Y (10 мкмоль/л)	1,06±0,03	1,12±0,04	1,22±0,05 *	1,30±0,07 **, #	1,47±0,09 **, #	1,56±0,10 **, #
ЕГТА (2 ммоль/л)	1,05±0,03	1,11±0,04 *	1,22±0,06 *	1,38±0,10 *	1,50±0,10 **	1,55±0,11 **, #

**Примітки.**  $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[K^+] = 140$  ммоль/л,  $[ouabain] = 25$  мкмоль/л,  $[АТФ] = 3$  ммоль/л,  $[NaN_3] = 10$  ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; \* – різниця порівняно з вмістом  $P_n$  до початку інкубації (0 хв) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ ; # – різниця порівняно з контролем для відповідного часу інкубації достовірна з  $P < 0,05$ ;  $n = 6-7$ .

Виходячи з даних, представлених у табл. 2, розраховували середню швидкість еозин Y-чутливої і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азних реакцій досліджуваних клітин протягом часу інкубації (рис. 1). Певний максимум в обох випадках спостерігається на 1 хв інкубації, але він виявився недостовірним за рахунок значної дисперсії даних. На 2,5 хв інкубації показники еозин Y-чутливої і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азних активностей зменшувалися до нуля, після чого плавно зростали і відповідно на 5 та 15 хв інкубації виходили на плато. З наведених результатів випливає, що оптимальний час інкубації для дослідження  $Ca^{2+}$ -АТФ-азної активності пермеабілізованих секреторних клітин досліджуваних залоз в умовах *in situ* становить 15 хв, оскільки саме у цій точці результати були найбільш стабільними. Зокрема, саме на 15 хв інкубації середні швидкості еозин Y-чутливої АТФ-азної реакції і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азної реакції були однаковими і становили  $0,008 \pm 0,003$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  хв). Крім цього, значення АТФ-азної активності за такого часу інкубації виходить на плато, дисперсія даних є невеликою, що свідчить про високу відтворюваність отриманих даних.

У ході визначення оптимальної концентрації екзогенного АТФ у середовищі для дослідження  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної з'ясувалося, що вміст  $P_n$  у всіх середовищах інкубації суттєво залежить від кількості субстрату (табл. 3).

Розраховані еозин Y-чутлива та  $Ca^{2+}$ -чутлива АТФ-азні активності теж залежать від концентрації екзогенного АТФ у середовищі інкубації (рис. 2). Максимальна  $Ca^{2+}$ -чутлива АТФазна активність спостерігається при 2 ммоль/л екзогенного АТФ і становить  $0,21 \pm 0,01$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  15 хв), а еозин Y-чутлива АТФ-азна активність – при 3 ммоль/л у середовищі і становить  $0,23 \pm 0,05$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  15 хв).

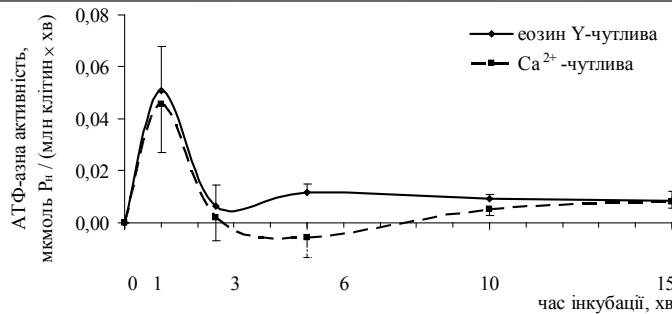


Рис. 1. Середня швидкість еозин Y-чутливої та Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азних реакцій ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 2; середню швидкість Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азної реакції розраховували відношення різниці вмісту P<sub>n</sub> у контролі ([Ca<sup>2+</sup>]=10<sup>-7</sup> моль/л) і середовищі, що містило ЕГТА (2 ммоль/л) до часу інкубації, а еозин Y-чутливої – різниці вмісту P<sub>n</sub> у контролі та його вмісту в середовищі, що містило еозин Y.

Таблиця 3

Залежність вмісту P<sub>n</sub> (мкмоль/млн клітин) від концентрації АТФ у середовищі інкубації пермеабілізованих секреторних клітин (M±m)

Середовища	АТФ				
	0 ммоль/л	1 ммоль/л	2 ммоль/л	3 ммоль/л	5 ммоль/л
Контроль	0,08±0,00	1,02±0,03 ***	1,48±0,04***	1,68±0,07 ***	2,10±0,02 ***
Еозин Y (10 мкмоль/л)	0,08±0,00	0,95±0,06 ***	1,28±0,03 ***,#	1,45±0,03***,#	1,95±0,02 ***,#
ЕГТА (2ммоль/л)	0,08±0,00	0,86±0,05 ***,#	1,27±0,03 ***,#	1,51±0,07 ***,#	2,01±0,04 ***,#

**Примітки.** [Ca<sup>2+</sup>]=10<sup>-7</sup> моль/л, [K<sup>+</sup>]=140 ммоль/л, [оуабайн]=25 мкмоль/л, [NaN<sub>3</sub>]=10 ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; \*\*\* – різниця порівняно з вмістом P<sub>n</sub> у середовищі, котре не містило АТФ для відповідної групи достовірна з P<0,001; # – різниця порівняно з контролем достовірна з P<0,05, ## – з P<0,01; n=5.

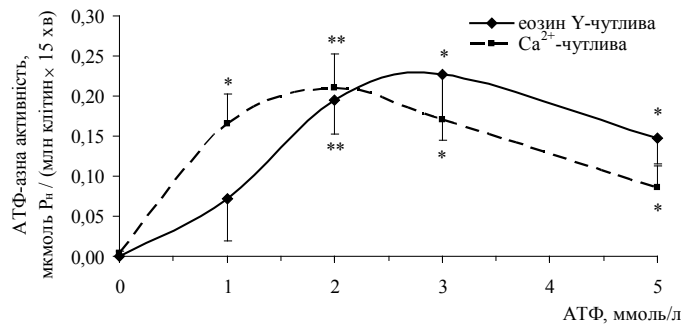


Рис. 2. Залежність еозин Y-чутливої і Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азної активностей ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура від концентрації екзогенного АТФ у середовищі інкубації: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 3; Ca<sup>2+</sup>-чутливу АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту P<sub>n</sub> у контролі (10<sup>-7</sup> моль/л Ca<sup>2+</sup>) та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищах, а еозин Y-чутливу – шляхом віднімання від вмісту P<sub>n</sub> у контролі його вмісту в середовищі з еозином Y; \* – зміна порівняно з клітинами, які інкубувалися у середовищах без екзогенного АТФ (0 ммоль/л АТФ), достовірна з P<0,05; \*\* – з P<0,05.



При дослідженні АТФ-азної активності фракції мембранних везикул клітин підщелепних залоз щура встановлено [1], що  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азна активність змінюється двофазно, а саме стрімко зростає зі збільшенням концентрації АТФ у середовищі інкубації до 0,1 ммоль/л з подальшим виходом на плато при концентрації АТФ 0,1–0,2 ммоль/л. У діапазоні 0,7–3 ммоль/л у середовищі відбувалося подальше збільшення  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, котра досягала максимуму за 2 ммоль/л АТФ у середовищі; подальше збільшення концентрації екзогенного АТФ до 3 ммоль/л призводить до деякого зменшення як тапсигаргіннечутливої  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності плазматичної мембрани, так і тапсигаргінчутливої  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності ендоплазматичного ретикулу (на що, правда, автори уваги не звернули). Фактично, за високих концентрацій АТФ наші дані відповідають цим результатам, отриманим на мембранних везикулах слинних залоз. Про залежність АТФ-азних активностей від концентрації АТФ за низького діапазону ми, на жаль, нічого не можемо говорити, оскільки рівень ендогенного АТФ у ізольованих клітинах є, очевидно, досить високий.

З'ясувалося також, що АТФ-азна активність суспензії пермеабілізованих секреторних клітин залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Причому максимума як сумарної, так і еозин Y-нечутливої АТФ-азної активності спостерігаються при  $\text{pCa}6$  ( $10^{-6}$  моль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі; рис. 3). Інгібуючий ефект еозину Y при  $\text{pCa}7$  становив 11,37%, при  $\text{pCa}6$  – 12,22%, а при  $\text{pCa}4$  – 15,25%. Тому ми нічого не можемо стверджувати про залежність еозин Y-чутливої АТФ-азної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.

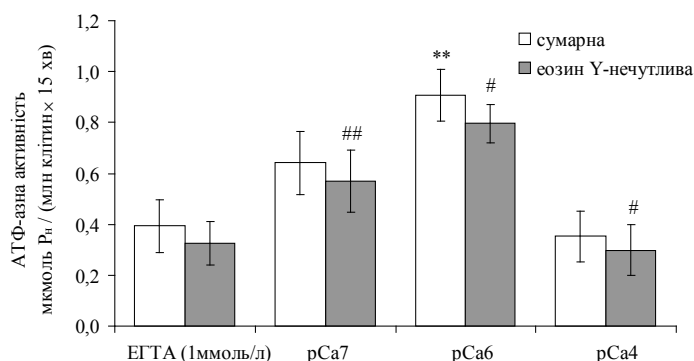


Рис. 3. Сумарна і еозин Y-нечутлива АТФ-азні активності пермеабілізованих клітин слизових залоз у середовищах із різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ :  $[\text{K}^+]=140$  ммоль/л, [строфантин К]=100 мкмоль/л, [АТФ]=3 ммоль/л,  $[\text{NaN}_3]=10$  ммоль/л; [еозин Y]=20 мкмоль/л; [EGTA]=1 ммоль/л; час інкубації 15 хв,  $37^\circ\text{C}$ ; для пермеабілізації плазматичної мембрани використано дигітонін (у концентрації 30 мкг/мл у розрахунку на 1 млн клітин); \*\* – різниця порівняно з 1 ммоль/л EGTA достовірна з  $P<0,01$ ; # – різниця порівняно з контролем для відповідної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  достовірна з  $P<0,05$ ; ## –  $P<0,01$ ;  $n=6-7$ .

Дані літератури стосовно залежності АТФ-азної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації суттєво відрізняються між собою. Зокрема, на фракції мембранних везикул підщелепної залози щура встановлено [1], що при концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації 0,007–0,020 мкмоль/л спостерігали зростання активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз як ендоплазматичного ретикулу, так і плазматичної мембрани. Подальше підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,05 мкмоль/л не викликало змін  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, а у концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,08–1,20 мкмоль/л (приблизно  $\text{pCa}8-6$ ) призводило до вираженішої

активації АТФ-азної активності й ендоплазматичного ретикулуому та плазматичної мембрани. Вищих концентрацій автори не перевіряли.

Дані інших авторів свідчать про куполоподібність залежності  $Ca^{2+}$ -АТФ-азних активностей від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі інкубації. Зокрема, дослідженнями, проведеними на слинних залозах личинки комара-дергуна, встановлено, що залежність  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активності фракції клітинних мембран від концентрації  $Ca^{2+}$  має куполоподібний характер із максимумом при  $pCa4$ . Вищі концентрації  $Ca^{2+}$  пригнічували  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азну активність мембран цих клітин [7, 11].  $Ca^{2+}$ -АТФ-азна активність плазматичної мембрани еритроцитів свиней і курей також залежить від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі, ця залежність має куполоподібний характер із максимумом при  $pCa6$  [17].

На наступному етапі нами було досліджено вплив еозину Y різної концентрації на власне  $Ca^{2+}$ -АТФ-азну активність секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура. З'ясувалося, що при концентрації еозину Y у середовищі 5, 20, 50 і 100 мкмоль/л зменшення вмісту  $P_n$  становило  $6,20 \pm 1,19$ ,  $10,14 \pm 3,52$ ,  $12,20 \pm 1,88$  і  $16,98 \pm 2,63\%$  відповідно (табл. 4).

Таблиця 4

Концентраційна залежність впливу еозину Y на вміст  $P_n$  (мкмоль / млн клітин) у середовищах, що містили пермеабілізовані клітини слюзових залоз і АТФ ( $M \pm m$ )

Еозин Y					ЕГТА
0 мкмоль/л	5 мкмоль/л	20 мкмоль/л	50 мкмоль/л	100 мкмоль/л	
$2,96 \pm 0,18^{**}$	$2,77 \pm 0,14^*$	$2,65 \pm 0,16^{**}$	$2,59 \pm 0,15^{**}$	$2,46 \pm 0,18^{**}$	$2,66 \pm 0,15^{**}$

**Примітки.**  $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[K^+] = 140$  моль/л, [оубаїн] = 25 мкмоль/л, [АТФ] = 3 ммоль/л,  $[NaN_3] = 10$  ммоль/л; [ЕГТА] = 1 ммоль/л; n=6; час інкубації 15 хв, 37°C; \* – різниця порівняно з контролем (0 мкмоль/л еозину Y) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .

Встановлено, що еозин Y дозозалежно зменшує  $Ca^{2+}$ -чутливу АТФ-азну активність пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: у концентрації 5 мкмоль/л – до  $31,78 \pm 11,15\%$  від контролю, а у концентрації 20 мкмоль/л показано повне інгібування  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності досліджуваних клітин в умовах *in situ* (рис. 4). За вищих концентрацій (50 і 100 мкмоль/л) еозин Y неспецифічно пригнічував, очевидно, інші АТФ-ази, які не пов'язані з функціонуванням транспортувальних систем (транспорт секреторних везикул, переміщення елементів цитоскелету, синтетичні процеси тощо).

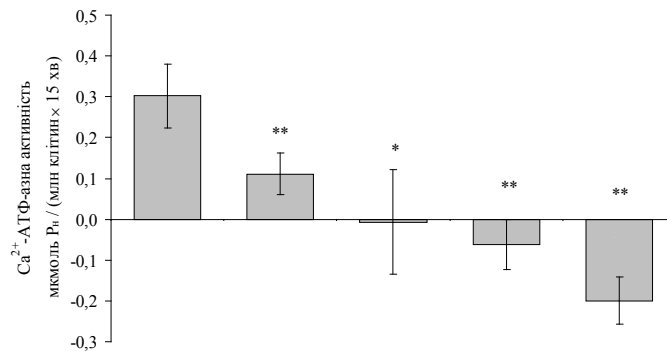


Рис. 4. Концентраційна залежність впливу еозину Y на  $Ca^{2+}$ -АТФ-азну активність ізольованих пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 3;  $Ca^{2+}$ -чутливу АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту  $P_n$  у  $Ca^{2+}$ -вмісному середовищі з відповідною концентрацією еозину Y та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищах; \* – різниця порівняно з контролем (без інгібітора) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ .



Відомо, що еозин Y інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу як плазматичної мембрани, так і ендоплазматичного ретикулуму [9, 20], а специфічним інгібітором усіх відомих ізоформ  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз ендоплазматичного ретикулуму є тапсигаргін [26]. Тому в наступній серії експериментів було порівняно вплив еозину Y і тапсигаргину на вміст  $\text{P}_n$  у середовищі після інкубації пермеабілізованих секреторних клітин слюзових залоз.

Відсоток зменшення вмісту  $\text{P}_n$  у пробах під впливом тапсигаргину (1 мкмоль/л) та еозину Y (10 мкмоль/л) був практично однаковим і становив  $7,94 \pm 2,16$  і  $8,65 \pm 2,30\%$  відповідно ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ; табл. 5).

Таблиця 5

Вміст  $\text{P}_n$  (мкмоль  $\text{P}_n$  / млн клітин) у середовищі після інкубування пермеабілізованих клітин слюзової залози за дії еозину Y і тапсигаргину ( $M \pm m$ )

Контроль	Еозин Y	Тапсигаргін	ЕГТА
$3,10 \pm 0,20$	$2,83 \pm 0,16$ *	$2,85 \pm 0,16$ *	$2,77 \pm 0,13$ *

**Примітки.**  $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[\text{K}^+] = 140$  ммоль/л, [оубаїн] = 25 мкмоль/л, [АТФ] = 3 ммоль/л,  $[\text{NaN}_3] = 10$  ммоль/л; [еозин Y] = 10 мкмоль/л; [тапсигаргін] = 1 мкмоль/л; [ЕГТА] = 2 ммоль/л; час інкубації – 15 хв; \* – різниця порівняно з контролем (без інгібіторів) достовірна з  $P < 0,05$ ;  $n=5$ .

Розрахована  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність досліджуваних клітин повністю інгібується еозином Y (10 мкмоль/л), тоді як тапсигаргін у концентрації 1 мкмоль/л зменшує її лише на  $72,02 \pm 15,44\%$  (рис. 5). Оскільки ця концентрація тапсигаргину є досить високою (відомо, наприклад, що за цієї концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів кролів інгібується повністю [27]), ми припускаємо, що тапсигаргіннечутлива  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність пов'язана із функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани. Хоча, звичайно, повністю відкидати внесок інших АТФ-аз (нетранспортних) у цей показник ми не маємо підстав. Отже,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа і плазматичної мембрани, і ендоплазматичного ретикулуму відіграє важливу роль у функціонуванні досліджуваних клітин.

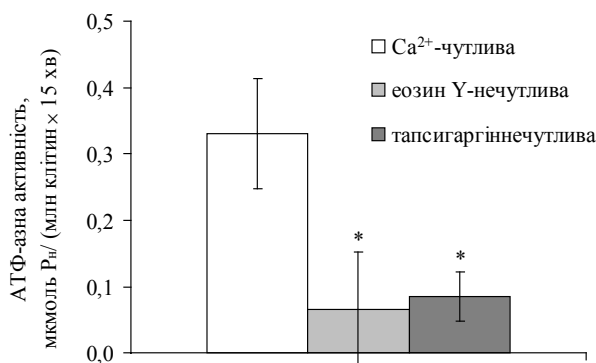


Рис. 5. Вплив еозину Y і тапсигаргину на АТФ-азну активність ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітин слюзової залози: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 5; АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту  $\text{P}_n$  у контролі або середовищі, що містить еозин Y чи тапсигаргін ( $10^{-7}$  моль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ), та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищі; \* – зміна порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,05$ .

З метою з'ясування особливостей функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулуму визначають  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність на її очищених препаратах [15] або везикулах плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулуму, отриманих шляхом диференційного центрифугування [3, 4].

Використання очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази є доцільним лише у дослідженнях впливу інгібіторів/активаторів на конкретну транспортувальну систему, які, однак, не дають жодних уявлень про функціонування цієї системи у цілісній клітині. В інтактних клітинах існують складні взаємозв'язки між  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами різних органел [11, 18, 19], які руйнуються у процесі отримання не лише очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази, а й мембранних препаратів. Властивості клітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем неможливо пояснити без урахування цих складних взаємозв'язків. Крім того, слід зазначити, що при диференціальному центрифугуванні складно оцінити у кожній пробі характер везикульованості мембран (визначити тип везикул – *inside-out* чи *outside-out*), що також може суттєво впливати на інтерпретацію результатів досліджень.

Дослідження на пермеабілізованих клітинах (*in situ*) дає змогу визначати активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аз, не порушуючи внутрішньоклітинних зв'язків між органелами та їх транспортувальними системами, тобто в умовах, найбільш наближених до природних. Крім того, такий підхід значно спрощує процедуру досліду, мінімізує вплив часової складової та вплив проведення самих процедур на результат досліджень. Причому, використовуючи метод визначення АТФ-азної активності й інгібіторний аналіз, можна досліджувати властивості не лише  $\text{Ca}^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулуму, а й помп плазматичної мембрани. Звичайно, з урахуванням того, що  $\text{Ca}^{2+}$ - чи  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпа плазматичної мембрани не виконують своїх транспортних функцій.

Власне, використовуючи метод визначення АТФ-азної активності й інгібіторний аналіз, ми отримали підтвердження наявності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слізозової залози щура. Ця помпа ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що узгоджується з попередньо проведеними дослідженнями їх впливу на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у цих клітинах [10].

Зокрема, зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах слізозових залоз протягом часу їхньої інкубації найбільш чітко виражене на 1 хв [10], що збігається з піком  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої та еозин Y-чутливої АТФ-азної активності досліджуваних клітин (див. рис. 1). Причиною такого зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах є його вивільнення з внутрішньоклітинних депо. У свою чергу, вивільнений у цитозоль  $\text{Ca}^{2+}$  активує  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази і не лише ендоплазматичного ретикулуму. Але оскільки транспортна функція  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани порушена, то це не супроводжується зменшенням рівня  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Фактично, порушується механізм, що (само)обмежує перебіг  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азної реакції. Тому  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність пермеабілізованих клітин ще більше інтенсифікується, внаслідок чого рівень АТФ у цитозолі починає зменшуватися, а це призводить, у кінцевому випадку, до пригнічення функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулуму і стрімкого зменшення вмісту депонованого  $\text{Ca}^{2+}$ .

Сповільнення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  на 2,5–5 хв та його дифузія з цитозолу пермеабілізованих клітин у позаклітинне середовище, як свідчать наші попередні результати [10], спричиняє пригнічення  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, і лише на 10–15 хв інкубації система стабілізується.

Отже, оптимальний час інкубації для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азної активності пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слізозової залози щура в умовах *in situ* становить 15 хв, а оптимальна концентрація екзогенного АТФ – 2–3 ммоль/л. Ця  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що слугує підтвердженням функціонування у досліджуваних клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вац Ю. О., Клевець М. Ю., Федірко Н. В. Кінетичні характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз клітин підщелепної слинної залози щурів // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 6. С. 44–54.
2. Великопольська О. Ю., Манько Б. О., Манько В. В. Ендоплазматично-мітохондріальна  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця: залежність дихання секреторних клітин від активності ріанодин- та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів // Укр. біохім. журнал. 2012. Т. 84. № 5. С. 76–88.
3. Гричан Н., Копач О., Макаровська Р. та ін. Взаємодія  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем плазматичної мембрани та мембран внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С. 167–180.
4. Гричан Н. Я., Котлярова А. Б., Копач О. В., Федірко Н. В. Взаємодія між кальцієвим уніпортером мітохондрій та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазами плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу у клітинах підщелепної слинної залози // Біофізичні механізми функціонування живих систем : мат-ли міжнар. наук. конф. (Львів, 16–18 жовтня 2008 р). Львів, 2008. С. 39.
5. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Е. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
6. Дубицький Л. О. Енергозалежні  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз та механізми взаємодії їх з катіонами металів: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 39 с.
7. Король Т. В., Манько В. В., Клевець М. Ю. Дослідження активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. // Біологія тварин. 2000. Т. 2. № 1. С. 92–97.
8. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журнал. 1996. Т. 68. № 6. С. 50–61.
9. Костерин С. А., Бурдыга Н. В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в миомерии // Успехи современ. биологии. 1993. Т. 113. № 4. С. 485–506.
10. Котлярова А. Б., Манько В. В.  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура. I.  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. Т. 6. № 2. С. 99–114.
11. Манько В. В. Системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах екзокринних залоз: Монографія. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. 271 с.
12. Манько В. В., Бичкова С. В., Клевець М. Ю. Ідентифікація каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 1. С. 65–71.
13. Манько В. В., Клевець М. Ю., Федірко Н. В., Король Т. В. Вплив хлорпромазину на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи плазматичної мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. // Укр. біохім. журн. 2000. Т. 72. № 2. С. 36–41.
14. Мерлавський В. М., Манько Б. О., Іккерт О. В., Манько В. В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. № 3. С. 15–22.
15. Слінченко Н. М., Ченниш І. Г., Костерин С. О. Використання очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани клітин біометрія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. №. 2. С. 33–38.
16. Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А. Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикулула миомерии // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1666–1671.

17. *Alves-Ferreira M., da Silva E. C., Ferreira-Pereira A., Scofano H. M.* Regulatory differences between  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in plasma membranes from chicken (nucleated) and pig (enucleated) erythrocytes // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2002. Vol. 131. N 4. P. 405–415.
18. *Armstrong C. F.* ER-mitochondria communication. How privileged? // *Physiol.* 2007. N 22. P. 261–268.
19. *Frieden M., Arnaudeau S., Castelbou C., Demaurex N.* Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. N 52. P. 43198–43208.
20. *Gatto C., Milanick M. A.* Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1993. Vol. 264. N 6. P. 1577–1586.
21. *Herzog V., Sies H., Miller F.* Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation // *J. Cell Biol.* 1976. Vol. 70. P. 692–706.
22. *Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V.* et al. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma // *Cell Biol. Int.* 2012. Vol. 36. N 1. P. 71–77.
23. *Lee M. G., Xu X., Zeng W.* et al. Polarized expression of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  waves // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 25. P. 15765–15770.
24. *Manko B. O., Klevets M. Y., Manko V. V.* An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under in situ conditions // *Cell Biochem. Funct.* 2012. DOI: 10.1002/cbf.2864.
25. *Tepikin A. V., Voronina S. G., Gallacher D. V., Petersen O. H.* Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 6. P. 3569–3572.
26. *Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O.* et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage // *Agents Action.* 1989. Vol. 27. N 1–2. P. 17–23.
27. *Xu Ch., Ma H., Inesi G.* et al. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase SERCA // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 17. P. 17973–17979.

Стаття: надійшла до редакції 07.07.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 31.10.12

## ATPASE ACTIVITY OF ISOLATED CELLS OF THE RAT EXORBITAL LACRIMAL GLAND UNDER *IN SITU* CONDITION

**A. Kotliarova, V. Manko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: annkotliarova@gmail.com*

Derivation of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol is energy-dependent processes in which SERCA and PMCA play fundamental role. One of the experimental approaches for the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumps of various cells study is to determine the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of purified enzymes or vesicle of plasma membrane and endoplasmic reticulum. However, an important aspect of physiological research is the study of intracellular processes in conditions that are close to the native ones, without breaking relationships between transport systems of different

organelles as it is in *in situ* condition. The aim of this work was to evaluate the possibility of using isolated permeabilized secretory cells of lacrimal glands to study  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity. Research was carried out on permeabilized by digitonin secretory cells of rats exorbital lacrimal gland.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was evaluated based on changes in the content of inorganic phosphate in the medium, which was determined by UV detection. It was found that the optimal incubation time for ATPase activity research of exorbital lacrimal glands secretory under *in situ* condition is 15 minutes. Maximum of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive ATPase activity was observed with 2 mmol/l of exogenous ATP and maximum eosin Y-sensitive ATPase activity was observed with 3 mmol/l.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was effectively inhibited by eosin Y (10–20  $\mu\text{mol/l}$ ) and thapsigargin (1  $\mu\text{mol/l}$ ). These data proved a  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity in endoplasmic reticulum of studied cells. Thus, a determination of the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity under *in situ* condition is an adequate and sensitive method for the study of the exorbital lacrimal glands.

*Keywords:*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity, eosin Y, thapsigargin, permeabilization, secretory cells, lacrimal gland,  $\text{Ca}^{2+}$  ions.

## АТФАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ВНЕГЛАЗНИЧНОЙ СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ *IN SITU*

А. Котлярова, В. Манько

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: annkotliarova@gmail.com*

Выведение  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля представляет собой энергозависимый процесс, основную роль в котором играют  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. Одним из экспериментальных подходов для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -помп различных клеток является определение  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности ее очищенных препаратов, везикул плазматической мембраны или эндоплазматического ретикулума. Тем не менее, более ценными являются физиологические исследования внутриклеточных процессов в максимально приближенных к естественным условиям, когда не разрываются взаимосвязи между транспортными системами различных органелл. Целью настоящей работы было оценить возможность использования изолированных пермеабилizированных секреторных клеток слезных желез для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности. Исследование проведено на пермеабилizированных дигитонином секреторных клетках внеглазничной слезной железы крысы.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азную активность оценивали на основании изменений содержания неорганического фосфата в среде инкубации, который определяли методом УФ-детекции. Установлено, что оптимальное время инкубации для исследования АТФ-азной активности секреторных клеток внеглазничной слезной железы в условиях *in situ* составляет 15 мин. Максимум  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной АТФазной активности наблюдается при 2 ммоль/л экзогенного АТФ, а эозин Y-чувствительной – при 3 ммоль/л.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азная активность эффективно ингибируется эозином Y (10–20 мкмоль/л) и тапсигаргином (1 мкмоль/л), что служит подтверждением функционирования в исследуемых клетках  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы эндоплазматического ретикулума. На основании полученных нами результатов можно утверждать об адекватности предложенного метода исследования АТФ-азной активности в условиях *in situ*.

*Ключевые слова:*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азная активность, эозин Y, тапсигаргин, пермеабилзация, секреторные клетки, слезные железы, катионы  $\text{Ca}^{2+}$ .