

УДК 612.3: 519.413.2

**ЕНДОКАНАБІНОЇДИ РЕГУЛЮЮТЬ ПРОЦЕСИ СЛИНОВИДІЛЕННЯ  
ЧЕРЕЗ МОДУЛЯЦІЮ ПРОЦЕСІВ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ****О. Нецик, Н. Федірко***Львівський національний університет імені Івана Франка**вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна**e-mail: n\_fedirko@franko.lviv.ua*

Ендоканабіноїди, активуючи рецептори СВ1 та СВ2 типів, ефективно задіяні у фізіології слинних залоз, а також регулюють функціонування даних залоз. Ми виявили, що активація як СВ1, так і СВ2 типів канабіноїдних рецепторів призводить до пригнічення нестимульованого слиновиділення та змін електролітного складу секретованої слини. Крім того, ми показали, що *in vivo* та *in vitro* агоніст канабіноїдних рецепторів віродгамін зменшував вміст загального білка в секретованій слині ацинарними клітинами залози. Ми також виявили, що *in vitro* прикладання до ізольованих клітин підщелепної слинної залози WIN 55,212-2, віродгаміну та (R)-(+)-метанандаміду в безкальцієвому середовищі (1 мМ EGTA), а також за умови блокування роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази тапсигаргіном, супроводжується зменшенням вмісту сумарного кальцію в клітинах залози. Слід наголосити, що ендоканабіноїди потенціюють депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в ацинарні клітини. Виявлені зміни слиновиділення, викликані ендоканабіноїдами, ймовірно, обумовлені модуляцією процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР), і подальшою активацією депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Ключові слова:* ендоканабіноїди, ацинарні клітини, кальцій, депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$ , ендоплазматичний ретикулум.

Відомо, що ендогенні агоністи канабіноїдних рецепторів характеризуються численними біологічними функціями у тканинах багатьох типів, зокрема у нервовій, серцево-судинній та імунній системі [15]. Крім того, експресію канабіноїдних рецепторів було виявлено у секреторних клітинах слинних [33] та підшлункової залози [24, 36], шлунка, печінки, кишківника [для огляду див. 16]. Фізіологічні ефекти канабіноїдів включають регуляцію епітеліального росту, рухової функції, апетиту, фіброгенезису, секреції. Існують також клінічні дані щодо вкладу системи ендоканабіноїдів у розвиток запальних процесів органів шлунково-кишкового тракту, ожиріння, анорексії та ін. [16]. Крім того, доведено, що анандамід (як основний ендоканабіноїд, що продукується в живих організмах) може викликати загибель клітин печінки [5, 11, 35], клітин карциноми [29], ендотеліальних клітин [41], РС12 клітин [34], первинних нейрональних культур [23], нефроцитів [42] і дендритних сіток [7]. З іншого боку, анандамід посилює проліферацію клітин гліобластоми U373-MG та карциноми легень [14], утворення гематопоетичного фактора росту [37], а також запобігає різноманітним формам інсультів і коректує нейро-дегенеративні захворювання [6]. Таким чином, дія ендоканабіноїдів суттєво відрізняється залежно від типу клітин. Показано, що в переважній більшості випадків ефекти ендоканабіноїдів опосередковуються через активації СВ1 та СВ2 типів [30]. Проте внутрішньоклітинні сигнальні механізми, які опосередковують біологічні ефекти цих речовин, залишаються далекими від повного розуміння.

Слинні залози, особливо підщелепна слинна залоза, є основним джерелом рідкої слини, збагаченої електролітами, антимікробними й антивірусними речовинами. При

зниженні рівня ефективності функціонування клітин слинних залоз розвивається патологічний стан – ксеростомія (сухість у роті). Останній супроводжується виразковістю та запаленнями органів ротової порожнини, підвищенням ризику карієсу та іншими періодонтологічними захворюваннями [32]. Відомо, що клітини слинних залоз містять активні канабіноїдні рецептори, а їхня активація призводить до розвитку ксеростомії [20], проте який внутрішньоклітинний механізм опосередковує це явище, залишається незрозумілим. Враховуючи, що секреція рідини й електролітів ацинарними клітинами слинних залоз є виключно  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом, ми припустили, що розвиток ксеростомії при активації канабіноїдних рецепторів може бути опосередкований змінами кальцієвої сигналізації.

**Збір слини з проток підщелепної слинної залози.** Визначення показників слиновиділення підщелепною слинною залозою проводили на щурах-самцях (130–160 г). Слину, що продукувалася підщелепною слинною залозою, відбирали з використанням скляних канюль (діаметр носика 1,0–1,5 мм) за раніше описаною методикою [1]. Перевагою даного методу є можливість проводити дослідження кількісного та якісного складу слини, що продукується та виводиться підщелепною слинною залозою щурів *in vivo*, а відтак дає змогу проаналізувати функціональну активність клітин досліджуваної залози [1]. Після внутрішньом'язової ін'єкції тваринам суміші кетаміну (90 мг/кг маси) (ВАТ «Фармак», Київ) та лістенону (0,08 мл/кг) (Nycomed GmbH, Austria) тварин фіксували у дорзально-горизонтальному положенні на хірургічному столику. Слину відбирали за допомогою мікроканюлі, впритул підведеної до проток залози у ротовій порожнині, протягом 10 хв до і після ін'єкції у залозу 50 мкл агоніста за допомогою перистальтичної помпи зі змінною швидкістю.

Виділення слини підщелепною слинною залозою оцінювали за такими параметрами: швидкість слиновиділення, концентрація білка та кальцію. Швидкість слиновиділення розраховували як об'єм слини, що виділяється залозою за 1 год у перерахунку на 1 кг маси тварини. Концентрацію білка у слині визначали за методом Лоурі, концентрацію кальцію – з використанням металохромного барвника арсеназо III.

**Ізолювання ацинарних клітин підщелепної слинної залози.** *In vitro* дослідження впливу агоністів канабіноїдних рецепторів на внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію та секреторну активність залози проводили на ізолюваних ацинарних клітинах підщелепної слинної залози самців щурів лінії Wistar віком 2 місяці. Ацинуси ізолювали з тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині, який містив колагеназу (тип I, 320 mU/mg), за методикою, описаною раніше [9]. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7,  $\text{CaCl}_2$  – 1,3,  $\text{MgCl}_2$  – 1,0, гідрокси-етилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота (HEPES) – 10, глюкоза – 10, pH=7,4.

**Вимірювання вмісту сумарного  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах та секретії загального білка.** Вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині ізолюваних ацинарних клітин визначали спектрофотометрично з використанням металохромного барвника арсеназо III за методикою, описаною раніше [9]. Секрецію загального білка виражали у процентах від сумарного вмісту білка у гомогенаті та супернатанті.

Для порівняння та визначення достовірності відмінностей між отриманими даними використовували t-тест Стьюдента.

Згідно з даними літератури, два типи канабіноїдних рецепторів (CB1 та CB2) експресуються у підщелепній слинній залозі щурів. Причому з використанням імуногісто-

хімічних методів виявлено, що CB1 рецептори в основному локалізовані в протоковій системі залози, а CB2 – в ацинарних клітинах [33]. Попередніми нашими дослідженнями показано, що введення у тканину залози *in vivo* синтетичного агоніста канабіноїдних рецепторів обох типів WIN 55,212-2 викликає пригнічення нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів і модулює електролітний склад секретованої слини [3]. На основі одержаних даних було зроблено висновок про роль ендоканабіноїдних рецепторів у регуляції фізіологічних відповідей клітин досліджуваних залоз.

У даній роботі нами досліджено вплив селективних агоністів CB1 та CB2 типів на параметри нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою *in vivo* та внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз, оскільки секреція є виключно кальційзалежним процесом.

Нами показано, що введення у залозу агоніста CB1 канабіноїдних рецепторів (R)-(+)-метанандаміду (5  $\mu\text{M}$ ) призводило до достовірного зниження швидкості нестимульованого слиновиділення та концентрації кальцію в секретованій слині в середньому на  $22\pm 8\%$  ( $P<0,05$ ,  $n=6$ ) та  $25\pm 2\%$  ( $P<0,05$ ,  $n=4$ ) відповідно порівняно з контролем (рис. 1). Одержані дані свідчать на користь того, що у клітинах підщелепної слинної залози присутні функціонально активні CB1 рецептори.

Відомо, що ендоканабіноїд віродгамін, який є нативним агоністом CB2 рецепторів, присутній у 2–9 разів вищих концентраціях в периферичних тканинах, ніж класичний ендоканабіноїд анандамід [31]. Нами показано, що за умов ін'єкції у залозу віродгаміну (30  $\mu\text{M}$ ) достовірно знижувалася швидкість нестимульованого слиновиділення, концентрація кальцію та білка у слині на  $31\pm 6\%$  ( $P<0,01$ ,  $n=7$ ),  $12\pm 3\%$  ( $P<0,05$ ,  $n=5$ ) та  $14\pm 4\%$  ( $P<0,05$ ,  $n=5$ ) відповідно порівняно з контролем (рис. 1). Таким чином, нами показано наявність у клітинах досліджуваної залози і CB2 канабіноїдних рецепторів і їхня роль у регуляції слиновиділення.

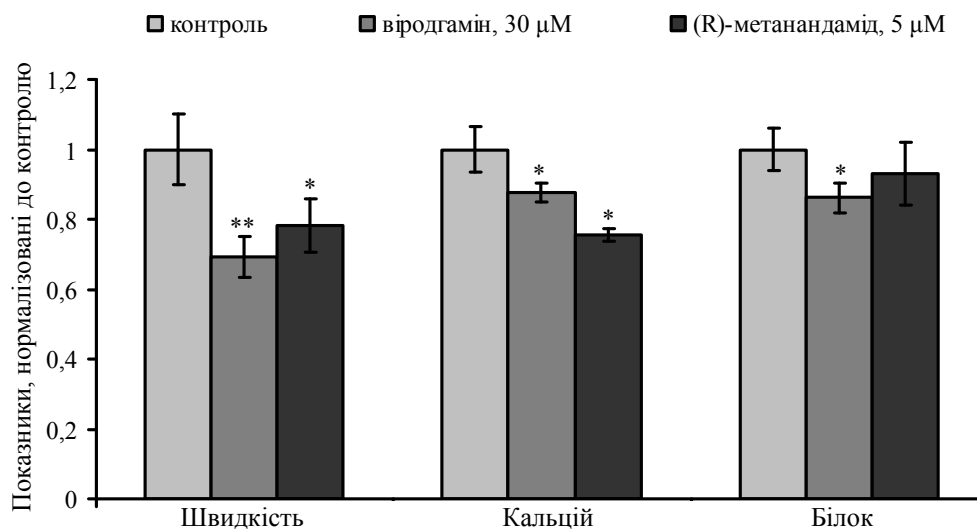


Рис. 1. Параметри нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів за умов дії агоністів канабіноїдних рецепторів типу CB1 -(R)-(+)-метанандаміду (5  $\mu\text{M}$ ) та CB2 – віродгаміну (30  $\mu\text{M}$ ). \* –  $P<0,05$  порівняно з контролем; \*\* –  $P<0,01$  порівняно з контролем.

Оскільки секреція рідкої компоненти слини підщелепною залозою є кальційзалежним процесом [21], ми досліджували зміни сумарного вмісту кальцію *in vitro* при активації канабіноїдних рецепторів.

Нами показано, що *in vitro* прикладання до ізольованих ацинусів WIN 55,212-2 (5  $\mu\text{M}$ ) у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі (1 mM EGTA, 5 хв) викликало достовірне зниження сумарного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  на  $39\pm 6\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ , рис. 2).

Нами також показано, що агоніст канабіноїдних рецепторів CB2 типу віродгамін (30  $\mu\text{M}$ ) при його додаванні до безкальцієвого зовнішньоклітинного розчину (1 mM EGTA) спричинював достовірне зниження сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози на  $28\pm 4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ). Причому за умов прикладання агоніста CB1 типу (R)-(+)-метанандаміду (5  $\mu\text{M}$ ) сумарний вміст кальцію зменшувався на  $21\pm 4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) (рис. 2). Одержані результати свідчать про те, що агоністи як CB1, так і CB2 рецепторів, а також одночасна активація обох рецепторів призводить до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулу. Щоб перевірити, чи опосередкований ефект активації канабіноїдних рецепторів на вміст кальцію в ЕПР змінами у функціонуванні  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, у наступній серії експериментів ми вивчали ефект цих же агоністів за умов незворотного блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази.

Ми показали, що WIN 55,212-2 (5  $\mu\text{M}$ ) та віродгамін (30  $\mu\text{M}$ ) при їх окремому прикладанні до ізольованих ацинусів за умов блокування роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулу тапсигаргіном (0,1  $\mu\text{M}$ ) у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі (1 mM EGTA, 10 хв.) призводили до достовірного зниження сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах на  $30\pm 6\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=8$ ) та  $19\pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ) відповідно порівняно з ефектом тільки тапсигаргіну (рис. 3). Однак додавання до середовища інкубації ацинарних клітин (R)-(+)-метанандаміду (5  $\mu\text{M}$ ) не призводило до достовірних змін досліджуваного показника (рис. 3).

Одержані дані свідчать про те, що виявлене нами зниження вмісту кальцію в ендоплазматичному ретикулумі при активації канабіноїдних рецепторів не зумовлений зміною активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, а прямо пов'язаний зі сигнальними системами, які активуються при дії ендоканабіноїдів. Ймовірними причинами виявлених явищ можуть бути підвищення рівня сАМФ, яке, як показано, спостерігається при дії ендоканабіноїдів на клітини інших типів [27] і подальшим фосфорилуванням рецепторних систем

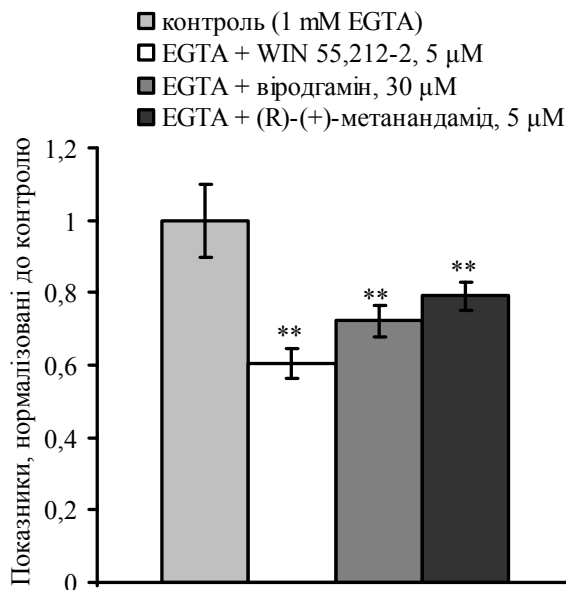


Рис. 2. Вплив агоністів канабіноїдних рецепторів типу CB1 та CB2 на сумарний вміст кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози внаслідок їх інкубації у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі; \*\* –  $P < 0,01$  порівняно до контролю.

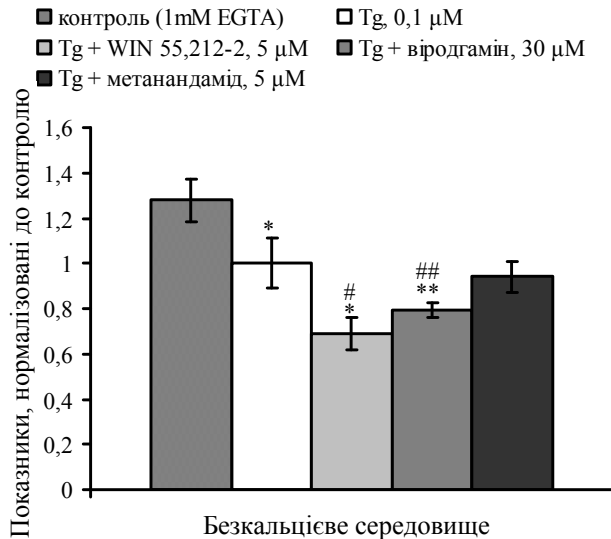


Рис. 3. Вплив агоністів канабіноїдних рецепторів на сумарний вміст кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози внаслідок їх інкубації у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі та блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном (Tg, 0,1 μM). \* –  $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем; # –  $P < 0,05$  порівняно з ефектом тапсигаргіну; ## –  $P < 0,01$  порівняно з ефектом тапсигаргіну.

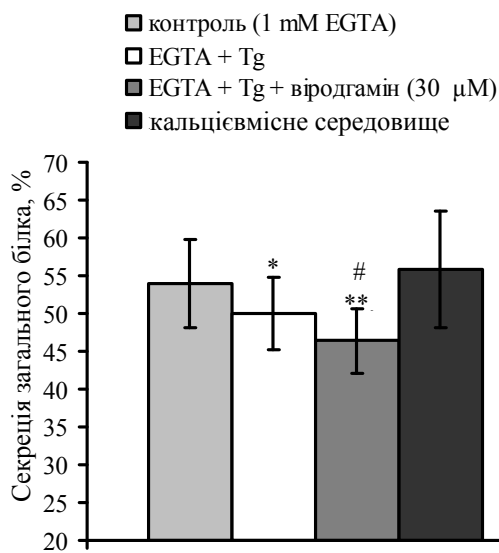


Рис. 4. Вплив агоністів канабіноїдних рецепторів на секрецію загального білка. \* –  $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем; # –  $P < 0,05$  порівняно з ефектом тапсигаргіну.

мембрани ендоплазматичного ретикулуму. Крім того, активація CB1 рецепторів активує деякі з внутрішньоклітинних кіназ, зокрема фосфатидил інозитол-3-кіназу (PI3-K) та її ефектор протеїнкіназу B [для огляду див. 27]. Причому активація цитоплазматичних кіназ також може опосередковувати CB1-індуковану експресію таких раних генів (IEG), як c-fos, c-jun, та zif268 [27]. Беручи до уваги те, що експресія раних генів посилюється при підвищенні  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , яке досягається першопочатково при спустошенні депо ЕПР, а потім підтримується завдяки посиленню депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  в ацинарні клітини [8], то виявлені нами явища прямо пов'язані з вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  із ЕПР. Таке вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ЕПР може бути опосередковане посиленням пасивного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР. Ймовірними шляхами пасивного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  є  $\text{IP}_3$  рецептори, ріанодинові рецептори та транслоконовий комплекс мембрани ЕПР. Однак для досліджуваних нами клітин було показано, що пасивне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  опосередковується саме транслоконовим комплексом, а  $\text{IP}_3$ - та ріанодинові канали не задіяні в цей процес [2, 4]. Підтвердженням того, що за умов активації канабіноїдних рецепторів відбувається спустошення депо ЕПР, є також виявлене нами за даних умов зниження інтенсивності й секреції білка досліджуваними клітинами (рис. 4).

Таке зниження рівня секреції при активації канабіноїдних рецепторів було виявлено і на інших об'єктах. Зокрема, показано, що анандамід, який зв'язується з високою афінністю до CB1 та CB2 типів канабіноїдних рецепторів, значно знижує форсколін-індуковане зростання вмісту цАМФ *in vitro* у підщелепній слинній залозі щурів (анандамід не показав впливу на базальні рівні цАМФ) [33]. У панкреатичних часточках мурчаків і щурів WIN55,212 значно пригнічує вивільнення амілази, стимульоване деполаризацією KCl через пригнічення пресинаптичного вивільнення ацетилхоліну [19]. Також відомо, що у відповідь на дію ендоканабіноїду віродгаміну та синтетичного канабіноїду CP55,940 в бронхіальних епітеліальних клітинах людини переважає CB2-рецепторний сигнальний шлях і пригнічується активність аденілатциклази і вивільнення з клітин інтерлейкіну-8 [13].

Крім посилення пасивного вивільнення  $Ca^{2+}$  із ЕПР при дії ендоканабіноїдів, ймовірно, може відбуватись і активація рецепторних систем мембрани ЕПР. Так, було показано, що анандамід мобілізує  $Ca^{2+}$  із кофеїн-чутливого внутрішньоклітинного депо  $Ca^{2+}$  в ендотеліальних клітинах судин [22], а також стимулює ендотеліальні клітини легень телят через CB2 рецептор-опосередковану активацію фосфоліпази C, утворення інозитол-1,4,5-трифосфату, вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму [43].

Крім того, можна припустити, що при активації канабіноїдних рецепторів посилене вивільнення  $Ca^{2+}$  із ЕПР може бути зумовлене зростанням інтенсивності транслокації молекул STIM у ділянках сигнальних доменів між ПМ та ЕПР. Останнє буде призводити до формування більшої кількості STIM-Orai-TRP1 комплексів у сигнальних кальвеолах примембранних областей, що, як показано [25], спостерігається при посиленні спустошення ЕПР. Якщо висловлені нами припущення є вірними, то за даних умов ми повинні спостерігати посилення депокерованого входу  $Ca^{2+}$ , інтенсивність якого, як відомо, визначається мірою спустошення ЕПР [28].

Для дослідження впливу агоністів канабіноїдних рецепторів на депокерований вхід  $Ca^{2+}$  ізольовані ацинуси підщелепної слинної залози інкубували протягом 5 хв у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині (1 мМ EGTA) для активації каналів входу, а потім додавали  $Ca^{2+}$  до зовнішньоклітинного розчину для візуалізації вхідного потоку  $Ca^{2+}$ . Внаслідок додавання до інкубаційного середовища 2 мМ  $CaCl_2$  (5 хв) за умов активації канабіноїдних рецепторів ацинарних клітин віродгаміном ми спостерігали значне достовірне зростання сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози в середньому на  $130 \pm 22\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=6$ ), тоді як за умов відсутності агоніста таке зростання становило в середньому  $57 \pm 15\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=6$ , рис. 5). За цих же умов WIN 55,212-2 (5  $\mu$ M) викликав достовірне зростання сумарного вмісту кальцію в клітинах на  $118 \pm 16\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ), тоді як за його відсутності – на  $39 \pm 11\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ); (R)-(+)-метанандамід (5  $\mu$ M) – в середньому на  $165 \pm 33\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ), тоді як за умов відсутності цього агоніста – на  $93 \pm 12\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ). Таке збільшення сумарного вмісту кальцію свідчить про активацію депокерованого надходження цього катіона в ацинарні клітини залози.

У наступній серії експериментів ми активували депокерований вхід  $Ca^{2+}$  у присутності тапсигаргіну. Через 5 хв після додавання  $CaCl_2$  за умов прикладання до ацинарних клітин WIN55,212-2 (5  $\mu$ M) та при одночасному блокуванні роботи  $Ca^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулуму ацинарних клітин тапсигаргіном (0,1 мкМ) сумарний вміст кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів статистично достовірно зростав на  $310 \pm 34\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=6$ ), тоді як за присутності лише тапсигаргіну –

на  $126 \pm 41\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=9$ ) (рис. 6). За таких же умов прикладання до ацинусів залози агоніста СВ2 типу канабіноїдних рецепторів віродгаміну ( $30 \mu\text{M}$ ) викликало достовірне зростання сумарного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  на  $213 \pm 46\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=7$ ), тоді як за присутності лише тапсигаргіну – на  $108 \pm 38\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=7$ , рис. 6). За умов такого протоколу агоніст СВ1 типу канабіноїдних рецепторів (R)-(+)-метанандамід ( $5 \mu\text{M}$ ) індукував зростання сумарного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  на  $101 \pm 16\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ), тоді як за присутності лише тапсигаргіну – на  $90 \pm 15\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=5$ ). Отже, WIN55,212-2 та віродгамін більш виражено посилюють депокероване надходження іонів кальцію в ацинарні клітини підщелепної слинної залози.

Загалом у літературі існують дані щодо здатності агоністів канабіноїдних рецепторів викликати зміни перебігу  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації, проте одержані нами дані вперше виявили таку роль ендоканабіноїдів у секреторних клітинах і зв'язок між ендоканабіноїд-індукованими змінами кальцієвого гомеостазу та функціональними відповідями клітин слинних залоз. Зокрема, іншими авторами було виявлено, що WIN55,212-2 здатний викликати підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$

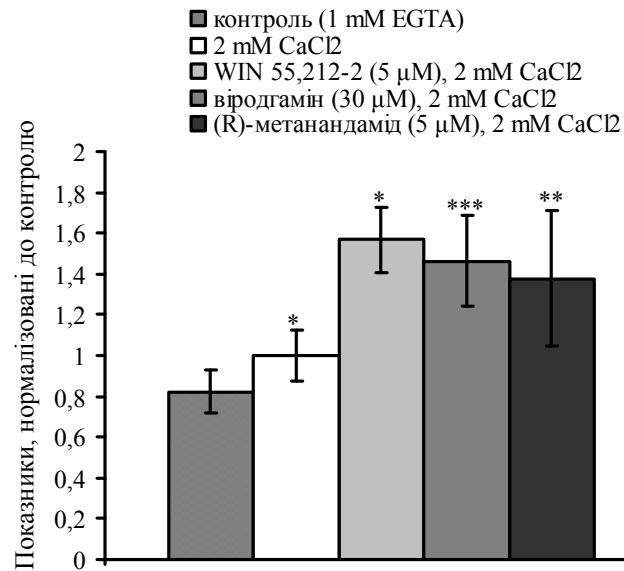


Рис. 5. Вплив агоністів канабіноїдних рецепторів на депокерований вхід кальцію в ацинарні клітини підщелепної слинної залози. \* –  $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем; \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з контролем.

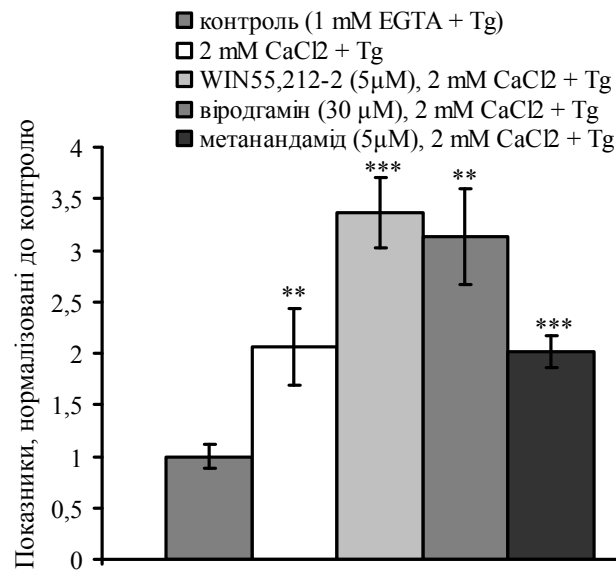


Рис. 6. Вплив агоністів канабіноїдних рецепторів на депокерований вхід кальцію в ацинарні клітини підщелепної слинної залози за умов блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном ( $0,1 \mu\text{M}$ ). \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем; \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з контролем.

у клітинах нирок [18], анандамід – у кількох типах клітин, зокрема також ниркових [42], де він потенціює вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через TRPV1 канали [38, 39]. На ендотеліальних клітинах легень виявлено, що активація CB2 рецепторів є спряжена із фосфоліпазою C та  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  [43], тоді як у нейронах Пуркінє активація канабіноїдних рецепторів пов'язана з модуляцією Р-типу  $\text{Ca}^{2+}$  струмів [10], пригніченням  $\text{Na}^+$  струмів [17], модуляцією ацетилхолінового рецептора [26], потенціалозалежних каналів та  $\text{K}^+$  каналів зворотного випрямлення [40]. Крім того, є дані про те, що віродгамін у низьких концентраціях викликає зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  в бронхіальних епітеліальних клітинах людини, включаючи мобілізацію та послідовні механізми ємнісного входу кальцію (CCE), тоді як високі концентрації віродгаміну викликають зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  переважно через неємнісні шляхи входу  $\text{Ca}^{2+}$  (не CCE), чутливі до агоніста TRPV1 каналів – капсазепіну, інгібітора TRPV1-TRPV4 каналів – рутенію червоного, інгібіторів неємнісного входу  $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{La}^{3+}$  та  $\text{Gd}^{3+}$  [12].

Таким чином, одержані дані доводять роль обох CB1 та CB2 типів канабіноїдних рецепторів клітин у фізіології підщелепної слинної залози, активація яких призводить до пригнічення базального слиновиділення та модуляції секреції електролітів. Активація ендоканабіноїдних рецепторів CB2 типу підщелепної слинної залози щурів призводить до пригнічення секреції білкової компоненти слини ацинарними клітинами. Також ендоканабіноїди здатні модулювати вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму, що, у свою чергу, активує депокероване надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в ацинарні клітини підщелепної слинної залози.

1. *Копач О., Федірко Н.* Кальцій-залежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз у разі дії агоністів холінергічної природи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Т. 37. С. 205–212.
2. *Копач О. В., Кругликов И. А., Войтенко Н. В.* и др. Механизмы утечки кальция из эндоплазматического ретикулума экзокринных клеток // *Нейрофизиология / Neurophysiology*. 2005. Т. 37. С. 339–346.
3. *Нецик О., Гричан Н., Копач О., Федірко Н.* Роль канабіноїдних рецепторів у регуляції слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Т. 50. С. 131–143.
4. *Федірко Н.В.* Механізми підтримання кальцієвого гомеостазу в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 16 с.
5. *Biswas K. K., Sarker K. P., Abeyama K.* et al. Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis // *Hepatology*. 2003. Vol. 38. P. 1167–1177.
6. *Di Marzo V., Petrosino S.* Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease // *Curr. Opin. Lipidol.* 2007. Vol. 18. P. 129–40.
7. *Do Y., McKallip R. J., Nagarkatti M., Nagarkatti P. S.* Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. P. 2373–2382.
8. *Fedirko N., Gerasimenko J. V., Tepikin A. V., Gerasimenko O. V.* Regulation of early response genes in pancreatic acinar cells: external calcium and nuclear calcium signaling aspects // *Acta Physiol.* 2008. Vol. 195. N 1. P. 51–60.
9. *Fedirko N., Klevets M., Vats Ju.* Isolated acini as an object for the investigation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting system of the secretory cell membranes // *Neurophysiol.* 2000. Vol. 32. N 3. P. 183-184.



10. *Fisyunov A., Tsintsadze V., Min R.* et al. Cannabinoids modulate the P-type high voltageactivated calcium currents in Purkinje neurons // *J. Neurophysiol.* 2006. Vol. 96. P. 1267–1277.
11. *Giuliano M., Calvaruso G., Pellerito O.* et al. Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway // *Int. J. Mol. Med.* 2006. Vol. 17. P. 811–819.
12. *Gkoumassi E., Dekkers B. G. J., Dröge M. J.* et al. (Endo)cannabinoids mediate different  $\text{Ca}^{2+}$  entry mechanisms in human bronchial epithelial cells // *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2009. Vol. 380. N 1. P. 67–77.
13. *Gkoumassi E., Dekkers B. G., Droge M. J.* et al. Virodhamine and CP55, 940 modulate cAMP production and IL-8 release in human bronchial epithelial cells // *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 151. P. 1041–1048.
14. *Hart S., Fischer O. M., Ullrich A.* Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64. P. 1943–1950.
15. *Hillard C. J.* Endocannabinoids and vascular function // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. Vol. 294. P. 27–32.
16. *Izzo A. A., Camilleri M.* Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects // *Gut.* 2008. Vol. 57. P. 1140–1155.
17. *Kim H. I., Kim T. H., Shin Y. K.* et al. Anandamide suppression of  $\text{Na}^+$  currents in rat dorsal root ganglion neurons // *Brain Res.* 2005. Vol. 1062. P. 39–47.
18. *Lauckner J. E., Hille B., Mackie K.* The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins // *PNAS.* 2005. Vol. 102. N 52. P. 19144–19149.
19. *Linari G., Agostini S., Amadoro G.* et al. Involvement of cannabinoid CB1- and CB2-receptors in the modulation of exocrine pancreatic secretion // *Pharmacol. Res.* 2009. Vol. 59(3). P. 207–214.
20. *Mattes R. D., Shaw L. M., Engelman K.* Effects of cannabinoids (marijuana) on taste intensity and hedonic ratings and salivary flow of adults // *Chem. Senses.* 1994. Vol. 19. No.2. P. 125–40.
21. *Melvin J. E., Yule D., Shuttleworth T., Begenisich T.* Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells // *Annu. Rev. Physiol.* 2005. Vol. 67. P. 445–469.
22. *Mombouli J.-V., Schaeber G., Holzmann S.* et al. Anandamide-induced mobilization of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in endothelial cells // *Br. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 126. P. 1593–1600.
23. *Movsesyan V. A., Stoica B. A., Yakovlev A. G.* et al. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways // *Cell Death Differ.* 2004. Vol. 11. P. 1121–1132.
24. *Nakata M., Yada T.* Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation in islet  $\beta$ -cells via CB1 receptors // *Regulatory Peptides.* 2008. Vol. 145. N 1–3. P. 49–53.
25. *Ong H. L., Liu X., Tsaneva-Atanasova K.* et al. Relocalization of STIM1 for activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -store // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. N 16. P. 12176–12185.
26. *Oz M., Zhang L., Ravindran A.* et al. Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 310. P. 1152–1160.
27. *Pagotto U., Marsicano G., Cota D.* et al. The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance // *Endocannabinoid System in Endocrinology and Metabolism Endocrine Reviews.* 2006. Vol. 27(1). P. 73–100.

28. *Parekh A. B., Putney J. W.* Store-Operated Calcium Channels // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 757–810.
29. *Patsos H. A., Hicks D. J., Dobson R. R.* et al. The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2 // *Gut.* 2005. Vol. 54. P. 1741–1750.
30. *Pertwee R. G.* Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors: an overview. Ed. *Cannabinoid Receptors.* London: Academic Press, 1995. P. 1–34.
31. *Porter A. C., Sauer J. M., Knierman M. D.* et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. Vol. 301. P. 1020–1024.
32. *Porter S. R., Scully C., Hegarty A. A.* An update of the etiology and management of xerostomia // *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics.* 2004. Vol. 97. P. 28–46.
33. *Prestifilippo J. P., Fernandez-Solari J., de la Cal, Iribarne M.* et al. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors // *Exp. Biol. Med.* 2006. Vol. 231. P. 1421–1429.
34. *Sarker K. P., Maruyama I.* Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. Vol. 60. P. 1200–1208.
35. *Siegmund S. V., Seki E., Osawa Y.* et al. Fatty acid amide hydrolase determines anandamide-induced cell death in the liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 10431–10438.
36. *Suarez J., Bermudez-Silva F. J., Mackie K.* et al. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei // *J. Comp. Neurol.* 2008. Vol. 509. P. 400–421.
37. *Valk P., Verbakel S., von Lindern M.* et al. Enhancement of erythropoietin-stimulated cell proliferation by anandamide correlates with increased activation of the mitogenactivated protein kinases ERK1 and ERK2 // *Hematol. J.* 2000. Vol. 1. P. 254–263.
38. *van der Stelt M., Trevisani M., Vellani V.* et al. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying  $Ca^{2+}$  influx via TRPV1 channels // *EMBO J.* 2005. Vol. 24. P. 3026–3037.
39. *van der Stelt M., Di Marzo V.* Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity // *Prostag. Other Lipid Mediat.* 2005. Vol. 77. P. 111–122.
40. *Wareing M., Bai X., Seghier F.* et al. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. R437–R446.
41. *Yamaji K., Sarker K. P., Kawahara K.* et al. Anandamide induces apoptosis in human endothelial cells: its regulation system and clinical implications // *Thromb. Haemost.* 2003. Vol. 89. P. 875–884.
42. *Yeh J. H., Cheng H. H., Huang C. J.* et al. Effect of anandamide on cytosolic  $Ca^{2+}$  levels and proliferation in canine renal tubular cells // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006. Vol. 98. P. 416–422.
43. *Zoratti C., Kipmen-Korgun D., Osibow K.* et al. Anandamide initiates  $Ca^{2+}$  signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells // *Br. J. Pharmacol.* 2003. Vol. 140. P. 1351–1362.

**ENDOCANNABINOIDS REGULATE SALIVATION VIA MODULATION OF CALCIUM SIGNALING PROCESSES****O. Netsyk, N. Fedirko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: n\_fedirko@franko.lviv.ua*

Endocannabinoids via both CB1 and CB2 types of cannabinoids receptors are involved in salivary physiology and contribute to the regulation of submandibular salivary gland function. Activation of cannabinoid receptors (CB1 and CB2 type) of acinar cells of submandibular salivary gland leads to the inhibition of unstimulated salivation and alteration in electrolyte saliva content. We also found that *in vivo* and *in vitro* CB2 cannabinoid receptor's agonist virodhamine decreased total protein content in secreted saliva by acinar cells. We also showed that *in vitro* application to the isolated acinar cells of rat submandibular salivary gland of WIN 55,212-2, virodhamine and (R)-(+)-Methanandamide in  $Ca^{2+}$ -free extracellular solution (1 mM EGTA) and in the presence of SERCA inhibitor - thapsigargin decreased total calcium content. Notable, we found that endocannabinoids significantly potentiated store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) into the acinar cells. Observed changes in the salivation can be caused by endocannabinoids-induced modulation of  $Ca^{2+}$  release from from the endoplasmic reticulum and consequent store-operated  $Ca^{2+}$ -entry.

Key words: endocannabinoids, acinar cells, calcium, store-operated  $Ca^{2+}$  entry, endoplasmic reticulum.

**ЭНДОКАННАБИНОИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ПРОЦЕССЫ СЛЮНООТДЕЛЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ МОДУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ****О. Нецьк, Н. Федирко**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: n\_fedirko@franko.lviv.ua*

Эндоканнабиноиды посредством активации рецепторов CB1 и CB2 типов эффективно вовлечены в физиологию слюнных желез, а также регулируют функционирование данных желез. Мы обнаружили, что активация как CB1, так и CB2 типов каннабиноидных рецепторов приводит к угнетению нестимулированного слюноотделения и изменению электролитного состава секретируемой слюны. Кроме этого, мы показали, что *in vivo* и *in vitro* агонист CB2 каннабиноидных рецепторов виродгамин уменьшал содержание общего белка в секретируемой слюне ацинарными клетками желез. Мы также обнаружили, что *in vitro* приложение к изолированным клеткам подчелюстной слюнной железы WIN 55,212-2, виродгамина и (R)-(+)-метанандамида в бескальциевой среде (1 mM EGTA), а также при условии блокирования работы SERCA тапсигаргином сопровождается уменьшением содержания общего кальция в клетках желез. Следует подчеркнуть, что эндоканнабиноиды потенцируют депоуправляемый вход  $Ca^{2+}$  в ацинарные клетки. Обнаруженные изменения слюноотделения, вызванные эндоканнабиноидами, вероятно, обусловлены модуляцией процесса высвобождения  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума и последующей активацией депоуправляемого входа  $Ca^{2+}$ .

*Ключевые слова:* эндоканнабиноиды, ацинарные клетки, кальций, депоуправляемый вход  $Ca^{2+}$ , эндоплазматический ретикулум.

Стаття надійшла до редколегії 01.12.09

Прийнята до друку 16.02.10