

Фізіологія людини і тварин

УДК 612.3: 577.413.2

РОЛЬ КАРБОАНГІДРАЗИ У РЕГУЛЯЦІЇ ФУНКЦІОНУВАННЯ ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ

Н. Гричан*, О. Копач**, Н. Войтенко**, Н. Федірко*

*Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: grychannatali@gmail.com

**Інститут фізіології імені О.Богомольця НАН України

вул. Богомольця, 4, Київ 25001, Україна

Відомо, що карбоангідраза відіграє важливу роль у процесах секреції, проте відомості про механізм її вкладу у даний процес є нечисленними. У даній роботі ми виявили, що інгібітор карбоангідрази бензоламід викликає пригнічення нестимульованої та агоніст-стимульованої секреції слини. Більш того, нами показано пригнічення агоніст-стимульованого зростання сумарного вмісту Ca^{2+} та пригнічення депокерованого входу іонів Ca^{2+} у досліджувані клітини під впливом бензоламиду. Встановлено, що за умов блокування карбоангідрази відбувається пригнічення Ca^{2+} -акумуляуючої функції мітохондрій та зменшення концентрації депонованого ними Ca^{2+} , істотне пригнічення активності Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани та мембрани ендоплазматичного ретикулулу. Таким чином, карбоангідраза регулює функціонування ацинарних клітин підщелепної слинної залози за двома механізмами: перший пов'язаний з її безпосереднім впливом на секрецію через рівень HCO_3^- та модуляцією хоча б однієї ланки холінергічної системи, а другий опосередкований через її роль у регуляції активності Ca^{2+} -транспортних систем мітохондрій та Ca^{2+} -АТФаз.

Ключові слова: підщелепна слинна залоза, ацинарні клітини, секреція, Ca^{2+} , карбоангідраза.

Карбоангідраза – це фермент, який каталізує реакцію гідратації CO_2 до бікарбонатів, чим і відіграє важливу роль у підтриманні рівня HCO_3^- у межах фізіологічної норми. У свою чергу, утворений HCO_3^- є субстратом для багатьох біосинтетичних реакцій [7–9, 27]. Відомо, що карбоангідраза є широко розповсюдженим ферментом клітин травного тракту і відіграє важливу роль у регулюванні ряду фізіологічних функцій, серед яких є секреція слини, шлункових та жовчних кислот і визначає процеси всмоктування води та солей у кишечнику. Крім того, нещодавно було показано, що мембранозв'язані ізоформи карбоангідрази IX та XII клітин дріжджів беруть участь в інвазії та розвитку пухлинних захворювань [8, 16].

Сьогодні відомо 5 типів карбоангідроз – α , β , γ , ϵ , δ . В основі такого поділу лежить структурна подібність ферменту та механізми регуляції їхньої активності [7, 14, 28, 29]. Усі карбоангідрози клітин ссавців належать до α - карбоангідроз, які поділяють на 4 підкласи, в які входять щонайменше 14 ізоформ [10, 14, 16]: цитозольні (I, II, III, VII та XIII), мітохондріальні (VA та VB), мембрано-асоційовані (IV, IX, XII, XIV та XV) та секретована карбоангідраза (VI). Серед цих ізоформ є такі, які ще називають «акаталітичними» карбоангідразами (VIII, X, та XI), функція котрих залишається невідомою [18].

За даними різних авторів [5, 6, 12, 15, 20, 22, 24, 25], у клітинах слинних залоз ссавців експресуються 8 ізоформ карбоангідроз: I, II, III, IV, VI, VII, VIII, IX, XII та VB.

Зокрема, серед цитозольних ізоформ карбоангідрози I та III характеризуються низькою ферментативною активністю, а карбоангідрози II та VII, навпаки, належать до найактивніших серед відомих на сьогоднішній день ферментів. Результатом їхнього функціонування у клітинах є накопичення HCO_3^- та H^+ , які використовуються у процесах гліюконеогенезу та синтезу деяких амінокислот (піваткарбоксилаза), ліпогенезу (піваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза), процесах утворення сечовини (карбамілфосфатсинтаза I), синтезі піримідинів (карбамілфосфатсинтаза II) [7, 8]. Окрім цього відомо, що цитоплазматична ізоформа карбоангідрози III, хоча й має дуже низьку каталітичну активність, проте забезпечує індукцію проліферації при H_2O_2 -індукованому апоптозі. Секретована карбоангідроза VI разом із вмістом секреторних гранул виводиться у позаклітинне середовище, де визначає основні властивості слини – її алкалінізацію та захист від патогенних мікроорганізмів. Ця гіпотеза функціонування карбоангідрози VI була запропонована Kivela et al. [16] на основі виявленого зростання кількості захворювань на карієс у пацієнтів зі зниженим вмістом карбоангідрози VI у слині. Мембранозв'язані ізоформи карбоангідрози VIII, IX, XII локалізовані у базолатеральній частині мембрани секреторних клітин слинних залоз та характеризуються вищою ферментативною активністю порівняно з карбоангідрозою IV, що локалізована в апікальній мембрані.

Однак, незважаючи на різноманітність ізоформ карбоангідроз у секреторних клітинах слинних залоз та даних про їхню роль у секретії рідин, відсутні відомості щодо впливу карбоангідрози на гомеостаз Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз. Саме цей факт привертає особливу увагу, оскільки секретія води й електролітів – це первинно Ca^{2+} -залежний процес.

Дослідження параметрів слиновиділення підщелепною слинною залозою. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком 2 місяці. Слину відбирали з використанням скляних мікроканюль із діаметром носика 1,0–1,5 мм [2]. Виділення слини підщелепною слинною залозою оцінювали за такими параметрами: швидкість слиновиділення, концентрація білка та Ca^{2+} . 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 [19], концентрацію Ca^{2+} – з використанням металохромного барвника арсеназо-III.

Ізолювання ацинарних клітин підщелепної слинної залози. *In vitro* дослідження впливу інгібування карбоангідрози специфічним блокатором бензоламідом (BNZ) на внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} та секреторну активність залози проводили на ізольованих ацинарних клітинах підщелепної слинної залози. Клітини ізолювали з тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині, який містив колагеназу виробництва фірми “Sigma” (тип I, 320 mU/mg). Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl_2 – 1,3, MgCl_2 – 1,0, гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота (HEPES) – 10, глюкоза – 10, pH=7,4 [3].

Одержання фракцій везикул мембран секреторних клітин підщелепної слинної залози щурів. Фракцію мембранних везикул ацинарних клітин підщелепної слинної залози одержували із використанням методів препаративної біохімії. До ацинарних клітин додавали буферний розчин, який містив в ммоль/л: сахароза – 250,0; EDTA – 1,0; трис-Cl – 10,0 (pH=7,1, t=4°C); та гомогенізували її у гомогенізаторі Поттера-Ельвейга. Гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 1600 g. Пост'ядерний супернатант, збагачений мітохондріями (MX), фрагментами плазматичної мембрани (ПМ) та ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР), розчинними білками цитозолу, центрифугували при 50000 g протягом 2 год. Отриманий пост'ядерний, постмітохондріальний супернатант, збагачений везикула-

ми плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму зберігали при температурі -20°C . Із використанням детергенту дигітоніну констатовано переважну inside-out орієнтованість везикул в одержаній фракції [1].

Визначення активності Ca^{2+} -АТФаз. Перед початком експерименту аліквоти мембранних везикул переносили у розчин, наближений за складом до внутрішньоклітинного, який містив (ммоль/л): $\text{NaCl} - 50,0$; $\text{KCl} - 100,0$; трис- $\text{Cl} - 20,0$ ($\text{pH}=7,4$, $t=37^{\circ}\text{C}$); $\text{MgCl}_2 - 3,0$; $\text{CaCl}_2 - 0,01$. АТФ-гідролазну ферментативну реакцію ініціювали додаванням 3 ммоль/л АТФ. Проби інкубували протягом $1,5$ хв при $t=37^{\circ}\text{C}$, після чого відбирали аліквоти для визначення вмісту білка [19], а ферментативну реакцію зупиняли 20% трихлороцтовою кислотою. Вміст пробірок відцентрифугували 10 хв при 1600 g. У супернатанті визначали вміст неорганічного фосфору (P_i) [11].

Активність Ca^{2+} -АТФаз розраховували як різницю між активністю АТФазних систем у Ca^{2+} -вмістному та безкальцієвому середовищах і виражали у мкмоль P_i , який вивільнився в ході АТФ-гідролазної реакції в перерахунку на 1 мг білка за 1 год. Тапсигаргін (1 мкмоль/л) додавали до стандартного середовища інкубації для розділення сумарної Ca^{2+} -АТФазної активності на складові: тапсигаргін-нечутливу Ca^{2+} -АТФазу ПМ і тапсигаргін-чутливу Ca^{2+} -АТФазу ЕПР. При цьому враховували вміст ендogenous фосфору та P_i , вивільненого у ході неферментативного гідролізу АТФ.

Методика визначення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} . Для вимірювання кількісних змін концентрації іонізованого Ca^{2+} у цитоплазмі інтактних ацинарних клітин підщелепної слинної залози щурів використовували мембранно-проникну форму високоафінного Ca^{2+} -зонда фура-2 (фура-2/АМ) [4]. Для завантаження Ca^{2+} -чутливого зонда в ацинарні клітини суспензію ацинусів поміщали в базовий розчин, який містив мембранопроникну форму барвника в концентрації 5 мкмоль/л за наявності детергенту пліоронік F-127 ($0,02\%$). Для розрахунку $[\text{Ca}^{2+}]_i$ нами використано формулу Grynkiewicz et al. [13].

Методика реєстрації концентрації іонізованого Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} . Для моніторингу концентрації катіонів Ca^{2+} , депонованого в ЕПР та МХ, ацинарні клітини завантажували мембранно-проникною формою Ca^{2+} -барвника маг-фура 2/АМ та род-2/АМ, відповідно, у концентрації 5 мкмоль/л. Інкубування проводили протягом $45-60$ хв при 37°C за наявності детергенту пліоронік F-127 ($0,02\%$). Такі умови зафарбовування забезпечують компартменталізацію барвників у внутрішньоклітинних органелах [30].

Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакету Microsoft Excel, вибірку даних з критерієм $P < 0,05$ приймали за статистично достовірні.

Сьогодні виділяють три основні механізми секреції води й електролітів і в кожній з них функціонуванню карбоангідрози та опосередкованому нею накопиченню HCO_3^- та Cl^- відводиться чільне місце [4], проте механізм задіяння її у регуляцію секреції практично не вивчені. Проведені нами дослідження показали, що блокування функціонування карбоангідрози специфічним блокатором BNZ (1 ммоль/л) викликає істотне зменшення усіх досліджуваних параметрів слиновиділення (рис. 1). Це доводить, що внутрішньоклітинні HCO_3^- є важливим фактором регуляції нестимульованого слиновиділення. Також нами показано, що ефект пілокарпіну в присутності BNZ відрізняється від пілокарпін-стимульованого слиновиділення. Зокрема, внутрішньоочеревинна ін'єкція пілокарпіну (2 мг/кг) у присутності BNZ призвела до пригнічення швидкості слиновиділення, концентрації білка та Ca^{2+} у секретованій слині, відповідно, на $35 \pm 5\%$ ($n=5$, $p < 0,01$), $15 \pm 2\%$ ($n=5$, $p < 0,01$) та $28 \pm 7\%$ ($n=5$, $p < 0,01$) (рис. 1).

Таким чином, наявність ефекту блокування карбоангідрازی на параметри стимульованого слиновиділення свідчить про те, що пілокарпін викликає зростання концентрації Ca^{2+} у цитозолі, яке є достатнім для підтримання високого рівня активності K^+ - та Cl^- -каналів, а відтак і самої секреції рідкої компоненти слини, проте цей процес ефективно потенціюється карбоангідразою.

При дослідженні впливу BNZ на сумарний вміст Ca^{2+} в ацинарних клітинах було показано, що додавання до Ca^{2+} -вмісного середовища інкубації суміші BNZ (10 мкмоль/л) та ацетилхоліну (ACh, 10 мкмоль/л) викликало зменшення сумарного вмісту Ca^{2+} на $25 \pm 2\%$ ($n=5$, $p<0,001$, рис. 2), тобто їх ефект не відрізнявся від ефекту, викликаного тільки BNZ (зменшення становило $35 \pm 6\%$ ($n=5$, $p<0,01$, рис. 2).

Слід наголосити, що ефект BNZ на сумарний вміст Ca^{2+} не відрізнявся від ефекту блокування Ca^{2+} -акумуляуючої функції MX за допомогою карбоніл ціанід м-хлорфенілгідрозон (CCCP) чи їх суміші. Зокрема, нами показано, що інкубування ацинарних клітин у зовнішньоклітинному Ca^{2+} -вмісному розчині в присутності CCCP (10 мкмоль/л) призводить до зменшення сумарного вмісту Ca^{2+} в середньому на $24 \pm 3\%$ ($p<0,001$, $n=5$) порівняно з контролем (рис. 3). Суміш BNZ та CCCP викликала зменшення сумарного вмісту Ca^{2+} в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози в середньому на $30 \pm 3\%$ ($n=5$, $p<0,001$, рис. 3) порівняно з контролем.

Такі результати дають можливість зробити висновок про важливу роль карбоангідрازی у підтриманні Ca^{2+} -акумуляуючої функції MX. Висловлене припущення було підтверджене шляхом прямого вимірювання концентрації іонізованого Ca^{2+} в MX. Зок-

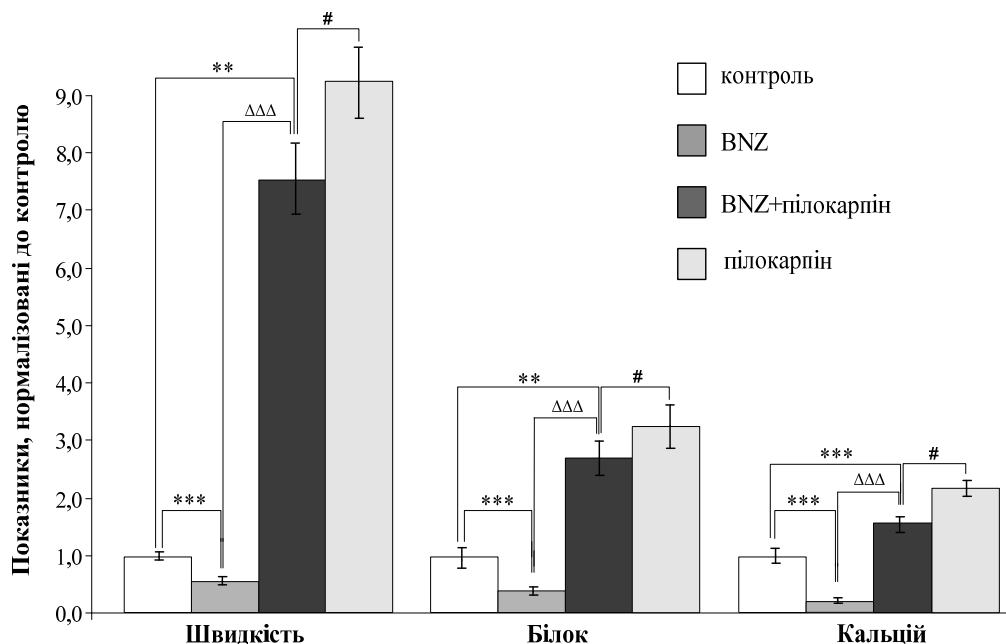


Рис. 1. Зміни показників слиновиділення ацинарними клітинами підщелепної слинної залози шурів під впливом BNZ (1 ммоль/л) та суміші BNZ з пілокарпіном (2 мг/кг). За віссю ординат – показники, нормалізовані до контролю. * – статистично достовірна різниця щодо контролю; Δ – статистично достовірна різниця щодо ефекту бензоламідів; # – статистично достовірна різниця щодо ефекту пілокарпіну.

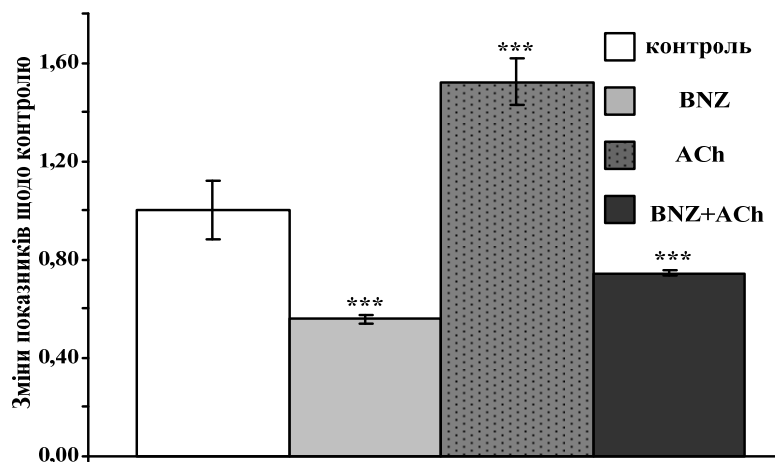


Рис. 2. Зміни сумарного вмісту Ca^{2+} в секреторних клітинах підщелепної слинної залози щурів під впливом BNZ (10 мкмоль/л) та ACh (10 мкмоль/л) і їх суміші за умов інкубації у зовнішньоклітинному розчині. За віссю ординат – показники нормалізовані до контролю. * – статистично достовірна різниця щодо контролю.

рема, ми показали, що прикладання до ацинарних клітин підщелепної слинної залози BNZ (10 мкмоль/л) веде до зниження концентрації Ca^{2+} в MX, причому даний ефект як за швидкістю, так і за амплітудою не відрізнявся від такого ефекту CCCP (рис. 4).

У наступній групі експериментів ми показали, що додавання до Ca^{2+} -вмісного інкубаційного середовища тапсигаргіну (TG, 10^{-7} моль/л) та BNZ викликало ефект, який не відрізнявся від ефекту тільки TG. Зокрема, нами показано, що додавання до Ca^{2+} -вмісного зовнішньоклітинного розчину TG та BNZ (10 мкмоль/л) викликало зростання сумарного вмісту Ca^{2+} в середньому на $34 \pm 9\%$ ($p < 0,01$, $n=6$, рис. 5), причому ефект TG становив $46 \pm 11\%$ ($p < 0,01$, $n=6$, рис. 5) порівняно з контролем.

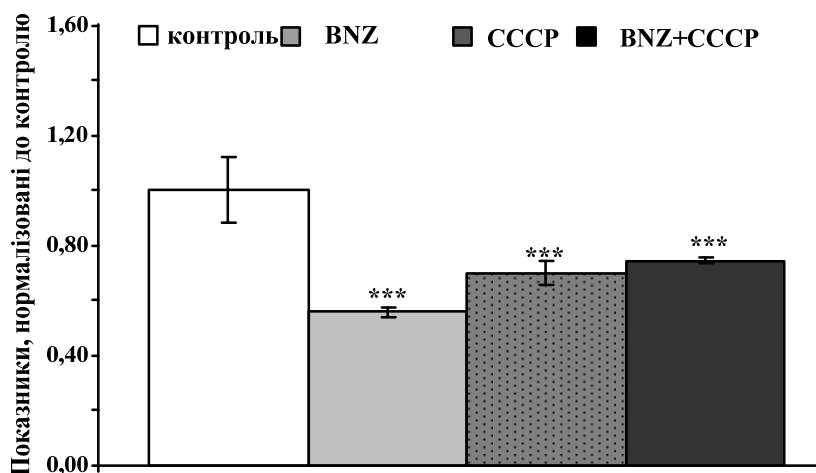


Рис. 3. Зміни сумарного вмісту Ca^{2+} в секреторних клітинах підщелепної слинної залози щурів під впливом BNZ (10 мкмоль/л) та CCCP (10 мкмоль/л) і їх суміші за умов інкубації у зовнішньоклітинному розчині. За віссю ординат – показники, нормалізовані до контролю. * – статистично достовірна різниця щодо контролю.

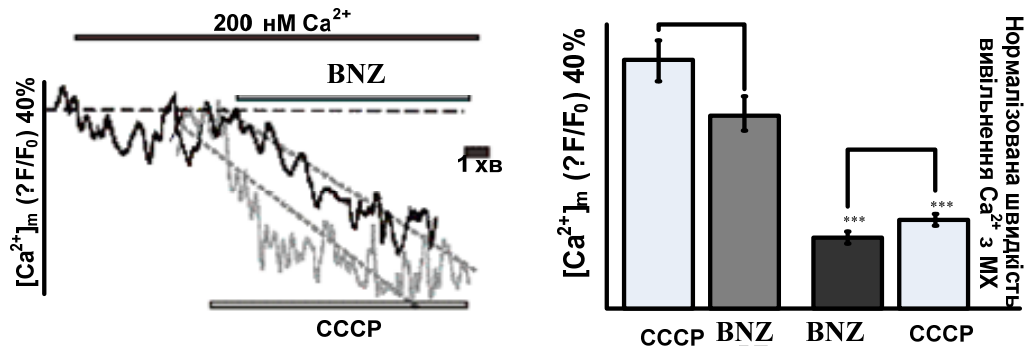


Рис. 4. Зменшення концентрації іонізованого Ca^{2+} в мітохондріях за умов аплікації до ацинарних клітин підщелепної слинної залози BNZ та CCCP.

Аналогічні результати нами одержано при додаванні суміші BNZ та TG до безкальцієвого розчину. Отримані результати були наступного характеру: дія TG проявлялась у зменшенні концентрації сумарного Ca^{2+} в ацинарних клітинах порівняно з контролем у середньому на $42 \pm 7\%$ ($p < 0,01$, $n = 6$, рис. 6).

За умов дії суміші TG та BNZ (у вищезазначених концентраціях) ми спостерігали зменшення концентрації сумарного Ca^{2+} на $22 \pm 6\%$ ($p < 0,05$, $n = 6$, рис. 6) при порівнянні з даними, отриманими у контролі.

На основі отриманих результатів ми припустили, що BNZ може впливати на роботу Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз ПМ та мембран ЕПР, що було доведено шляхом прямої реєстрації активності Ca^{2+} , Mg^{2+} - АТФаз, активність яких достовірно знижувалась: преінкубація

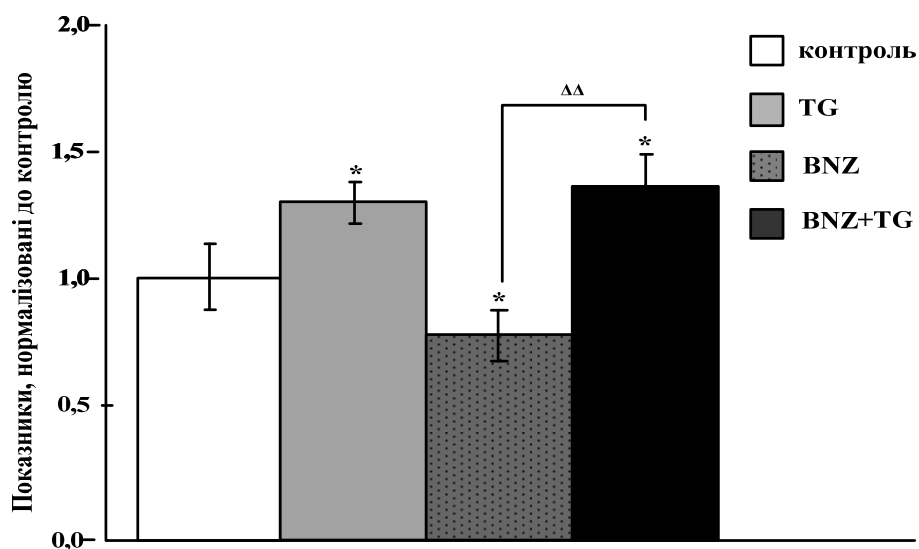


Рис. 5. Зміни сумарного вмісту Ca^{2+} в секреторних клітинах підщелепної слинної залози щурів під впливом TG (10^{-7}M) та BNZ (10 мкмоль/л) та їх суміші за умов інкубації у зовнішньоклітинному розчині. За віссю ординат – показники, нормалізовані до контролю. * – статистично достовірна різниця щодо контролю; $\Delta\Delta$ – статистично достовірна різниця щодо ефекту бензоламіду.

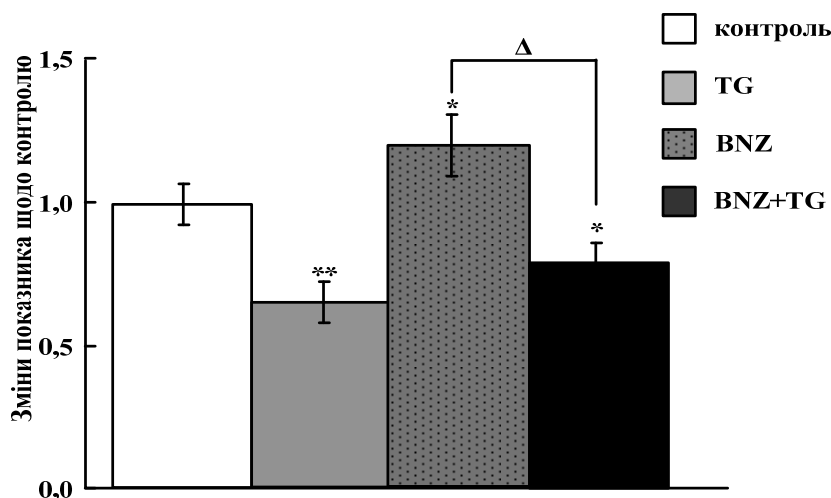


Рис. 6. Зміни сумарного вмісту Ca^{2+} в секреторних клітинах підщелепної слинної залози щурів під впливом TG (10^{-7}M) та BNZ (10 мкмоль/л) та їх суміші за умов інкубації у зовнішньоклітинному безкальцієвому розчині. За віссю ординат – показники, нормалізовані до контролю. * – статистично достовірна різниця щодо контролю; Δ – статистично достовірна різниця відносно ефекту бензоламідів.

ацинарних клітин підщелепної слинної залози з BNZ (10 мкмоль/л) призводила до зменшення сумарної Ca^{2+} -АТФазної активності в середньому на $60 \pm 4\%$ ($n=5$, $p<0,001$, рис. 7) порівняно з контролем. За даних умов активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ зменшилась у середньому на $65 \pm 3\%$ ($n=5$, $p<0,001$, рис. 7).

При цьому активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази мембран ЕПР зменшилась у середньому на $47 \pm 12\%$ ($n=5$, $p<0,01$, рис. 7). Висловлене нами припущення додатково було підтвержене шляхом прямого вимірювання концентрації Ca^{2+} в ЕПР.

Зокрема, ми показали, що у присутності BNZ спостерігалось сповільнення та зменшення інтенсивності перезавповнення депо ЕПР (рис. 8).

Отже, нами виявлено, що карбоангідраза задіяна у регулювання процесів як нестимульованого, так і стимульованого слиновиділення, впливаючи безпосередньо на активність м-холінорецепторів чи модулюючи, принаймні, одну з ланок сигнального шляху, який запускається при їхній активації. Ми вважаємо, що ефект блокування карбоангідрази на процеси слиновиділення опосередкований змінами внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу у клітинах залоз. І справді, за умов блокування карбоангідрази нами було показано: і) пригнічення агоніст-індукованого зростання сумарного Ca^{2+} в ацинарних клітинах і депокерованого входу Ca^{2+} за умов блокування карбоангідрази; ii) пригнічення Ca^{2+} -акumuлюючої функції МХ та зменшення концентрації депонованого ними Ca^{2+} . Одержані результати сповна узгоджуються з даними Leinonen et al. [17], McDonald et al. [20] та Nagao et al. [23], які показали, що карбоангідраза V спричиняє підсилення поглинання Ca^{2+} МХ, а блокування роботи цього ферменту призводить до: а) зниження рівня HCO_3^- , який є субстратом багатьох ферментативних реакцій; б) пригнічення експресії NO-синтази; в) пригнічення окислення глюкози, утворення АТФ та поглинання Ca^{2+} МХ [21]. Ми також виявили істотне пригнічення активності Ca^{2+} -АТФази ПМ та ЕПР за умов інгібування карбоангідрази, яке слід, ймовірно, пов'язувати зі зниженням спорідненості Ca^{2+} та АТФ-зв'язувальних центрів помпи до субстратів в умовах закислення цитозолу [1].

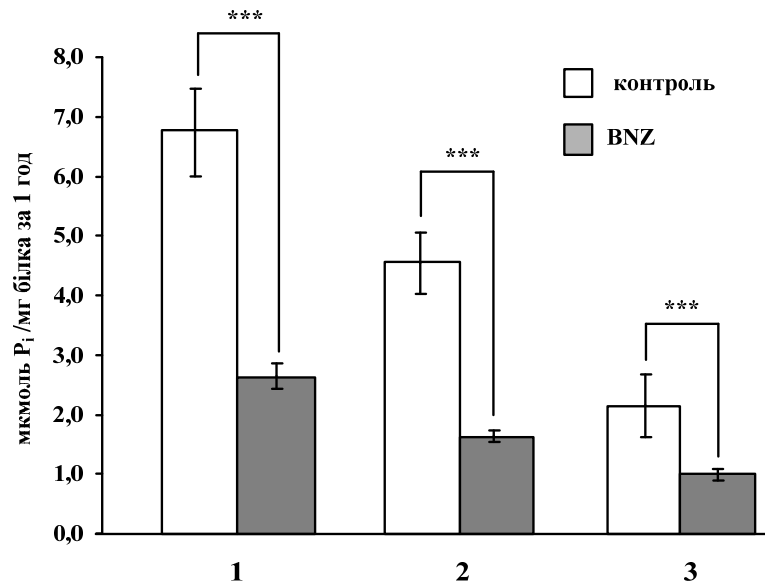


Рис. 7. Зміни активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ та мембран ЕПР ацинарних клітин підщелепної слинної залози за умов преінкубації з бензоламідом (10 мкмоль/л): 1 – сумарна Ca^{2+} -АТФазна активність; 2 – активність Ca^{2+} -АТФази ПМ; 3 – активність Ca^{2+} -АТФази ЕПР. * – статистично достовірна різниця щодо контролю.

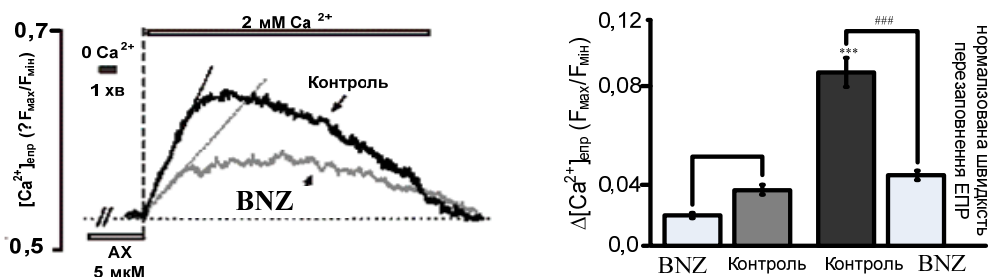


Рис. 8. Пригнічення перезаповнення ендоплазматичного ретикулула унаслідок блокування карбоангідрази.

Таким чином, нами доведено, що карбоангідраза регулює функціонування ацинарних клітин підщелепної слинної залози за двома механізмами: перший пов'язує її з безпосереднім впливом її на секрецію через рівень HCO_3^- та модуляцією хоча б однієї ланки холоднонергічної системи, а наступний опосередкований її вкладом у регуляцію Ca^{2+} -гомеостазу.

1. Вац Ю., Гричан Н., Федірко Н. Функціональні властивості іоногенних груп у складі молекул Ca^{2+} -АТФаз ацинарних клітин підщелепної слинної залози шурів // Експериментальна і клінічна фізіологія та біохімія. 2006. № 1. С 31–40.
2. Гричан Н., Федірко Н. Роль пуринорецепторів у регуляції слиновиділення підщелепною слинною залозою шурів // Експериментальна і клінічна фізіологія та біохімія. 2008. № 1. С. 11–22.
3. Федірко Н. В. Механізми підтримання кальцієвого гомеостазу в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 45 с.

4. *Ambudkar I.* Regulation of calcium in salivary gland secretion // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2000. N 11. P. 4–25.
5. *Asari M., Sasaki K., Kano Y., Nischita T.* Immunohistochemical Localization of Carbonic Anhydrase Isozymes I, II and III in the Bovine Salivary Glands and Stomach // *Arch. Histol. Cytol.* 1989. Vol. 52. N 4. P. 337–344.
6. *Blair-West J., Fernley R., Nelson J.* et al. The effect of carbonic anhydrase inhibitors on the anionic composition of sheep's parotid saliva // *J. Physiol.* 1980. N 299. P. 29–44.
7. *Breton S.* The cellular physiology of carbonic anhydrases // *JOP 2001. 2 (4 Suppl).* P. 159–164.
8. *Chegwidden W., Dodgson S., Spencer I.* The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals // *New Horizons.* 2000. P. 343–363.
9. *Fedirko N., Avshalumov M., Rice M., Chesler M.* Regulation of Postsynaptic Ca²⁺ Influx in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons via Extracellular Carbonic Anhydrase // *J. Neuroscience.* 2007. Vol. 27. N 5. P. 1167–1175.
10. *Feldstein J., Silverman D.* Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat // *J. Biol. Chem.* 1984. N 259. P. 5447–5453.
11. *Fiske C., SubbaRow Y.* The colometric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375–400.
12. *Fleming R., Parkkila S., Parkkila A.* et al. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization // *J. Clin. Invest.* 1995. N 96. P. 2907–2913.
13. *Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.* A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties // *J. Biol. Chem.* 1985. N 260. C. 3440–3450.
14. *Hewett-Emmett D., Tashian R.* Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families // *Mol. Phylogene. Evol.* 1996. N 5. P. 50–77.
15. *Jahromi S., Pelletier M., McDonald P.* et al. Antiepileptic efficacy of topiramate: assessment in two *in vitro* seizure models // *Brain Res.* 2000. N 872. P. 20–28.
16. *Kivela A., Kivela J., Saarnio J., Parkkila S.* Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11. N 2. P. 155–163
17. *Leinonen J., Kivela J., Parkkila S., Parkkila A-K. & Rajaniemi H.* Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle // *Caries Res.* 1999. N 33. P. 185–190.
18. *Lovejoy D., Hewett-Emmett D, Porter C.* et al. Evolutionarily conserved, “acatalytic” carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine: the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the DBP gene at 19q13.3 // *Genomics.* 1998. Vol. 54. N 3. P. 484–493.
19. *Lowry J., Rosenbrough N., Farr A., Randal R.* Protein measurements with the folic phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. C265–C275.
20. *MacDonald M.* Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion // *J. Biol. Chem.* 1995. N 270. P. 20051–20058.
21. *McNaughton N., Davies C., Randall A.* Inhibition of alpha(1E) Ca²⁺-channels by carbonic anhydrase inhibitors // *J. Pharm. Sci.* 2004. N 95. P. 240–247.
22. *Murakami H., Sly W.* Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase // *J. Biol. Chem.* 1987. N 262. P. 1382–1388.

23. Nagao Y., Platero J., Waheed A., Sly W. Human mitochondrial carbonic anhydrase: cDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16 // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. N 90. P. 7623–7627.
24. Nauntofte B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells // Am. J. Physiol. 1992. N 263. G823–G837.
25. Parkkila A.-K., Scarim A., Parkkila S. et al. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion // J. Biol. Chem. 1998. N 273. P. 24620–24623.
26. Parkkila S., Kaunisto K., Rajaniemi L. et al. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands // J. Histochem. Cytochem. 1990. N 38. P. 941–947.
27. Parkkila S., Parkkila A., Lehtola J. et al. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury // Dig. Dis. Sci. 1997. N 42. P. 1013–1019.
28. Supuran C., Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15. N 13. P. 4336–4350.
29. Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa, Yuji Furukawa, Michio Komai. Decreased expression of carbonic anhydrase isozyme II, rather than of isozyme VI, in submandibular glands in long-term zinc-deficient rats // British J. Nutrition. 2008. N 99. P. 248–253.
30. Tsieng R. Y. Intracellular Measurements of Ion Activities // Annual Rev. Biophys. and Bioengineering. 1983. N 12. C. 91–116.

THE ROLE OF CARBOXYANHYDRASE IN THE REGULATION OF FUNCTIONING OF RAT SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND

N. Grychan*, O. Kopach**, N. Voitenko**, N. Fedirko*

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

***Bogomoletz Institute of Physiology
4, Bogomoletz St., Kyiv 25001, Ukraine*

It is known that carboxyanhydrase is important for the functioning of the different cell types however the data about its role in the regulation of salivary cells functioning are elusive. We found that inhibitor of carboxyanhydrase – benzolamide significantly decreased nonstimulated and agonist-stimulated saliva secretion. In addition we showed that benzolamide caused decrease of agonist-induced increase of total calcium content and suppression of store-operated Ca^{2+} entry. Furthermore, inhibition of carboxyanhydrase induced suppression of Ca^{2+} -uptake into the mitochondria, decrease of the amount of Ca^{2+} accumulated in the mitochondria, inhibition of Ca^{2+} -ATPases of plasma membrane and the endoplasmic reticulum membrane. Thus, carboxyanhydrase regulates the functioning of acinar cells of submandibular salivary glands by two mechanisms: first is due to its direct involvement in the regulation of secretion via the cellular level of HCO_3^- and modulation of cholinergic signaling, second – via its role in the regulation of cellular Ca^{2+} -homeostasis.

Key words: submandibular salivary gland, acinar cells, secretion, Ca^{2+} , carboxyanhydrase.

РОЛЬ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПОДЧЕЛЮСТНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н. Гричан*, О. Копач**, Н. Войтенко**, Н. Федірко*

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

*** Институт физиологии имени А.Богомольца НАН Украины
ул. Богомольца, 4, Киев 25001, Украина*

Известно, что карбоангидраза играет важную роль в процессах секреции, однако данные о механизме ее вклада в данный процесс немногочисленны. В этой работе нами показано, что ингибитор карбоангидразы бензоламид приводит к угнетению нестимулированной и агонист-стимулированной секреции слюны. Более того, нами показано угнетение агонист-стимулированного возрастания общего Ca^{2+} и угнетения депонированного входа ионов Ca^{2+} в исследованных клетках под влиянием бензоламида. Показано, что при блокировании карбоангидразы происходит угнетение Ca^{2+} -аккумулирующей функции митохондрий и уменьшение концентрации депонированного в них Ca^{2+} , значительное снижение активности Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны и мембран эндоплазматического ретикулума. Таким образом, карбоангидраза регулирует функционирование ацинарных клеток подчелюстной слюнной железы с помощью двух механизмов: первый связывает карбоангидразу с непосредственным её вовлечением в секрецию через уровень HCO_3^- и модуляцией хотя бы одного звена холинергической системы, а второй опосредован её ролью в регуляции активности Ca^{2+} -транспортных систем митохондрий и Ca^{2+} -АТФаз.

Ключевые слова: подчелюстная слюнная железа, ацинарные клетки, секреция, Ca^{2+} , карбоксиангидраза.

Стаття надійшла до редколегії 06.04.09
Надійшла після доопрацювання 11.05.09
Прийнята до друку 13.05.09