

УДК 612.3: 519.413.2

## РОЛЬ КАНАБІНОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ У РЕГУЛЯЦІЇ СЛИНОВИДІЛЕННЯ ПІДЩЕЛЕПНОЮ СЛИННОЮ ЗАЛОЗОЮ ЩУРІВ

О. Нецик\*, Н. Гричан\*, О. Копач\*\*, Н. Федірко\*

\*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: n\_fedirko@franko.lviv.ua

\*\*Інститут фізіології імені О. Богомольця НАН України  
вул. Богомольця, 4, Київ 25001, Україна

Досліджено роль канабіноїдних рецепторів у регуляції слиновиділення. З'ясовано, що агоніст канабіноїдних рецепторів типу CB1 та CB2 WIN 55,212-2 при введенні у залозу *in vivo* істотно пригнічує швидкість нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів і зменшує концентрацію катіонів кальцію у слині. Зумовлене холінергічним агоністом пілокарпіном стимулювання слиновиділення частково пригнічується у разі введення його одночасно з WIN 55,212-2. За цих же умов знижується концентрація катіонів кальцію у секретованій слині. Проведено локальну аплікацію WIN 55,212-2 до зрізів підщелепної слинної залози і показано, що дана сполука викликає появу дозозалежного транзійтного зменшення зовнішньоклітинної концентрації натрію ( $[Na^+]_3$ ). Розраховано напівеквівалентну концентрацію WIN 55,212-2, яка складає  $15 \pm 4$  мкмоль/л. Отже, одержані дані свідчать про наявність у клітинах підщелепної слинної залози функціонально активних канабіноїдних рецепторів, активація яких призводить до пригнічення базального та частково пілокарпінстимульованого слиновиділення і викликає зміни електролітного складу слини.

*Ключові слова:* канабіноїдні рецептори, WIN 55,212-2, пілокарпін, підщелепна слинна залоза, слиновиділення.

Ендогенні канабіноїди – ліпідна сигнальна система, яка виконує важливі регуляторні функції в організмі всіх хребетних. Ендоканабіноїдна система складається з канабіноїдних рецепторів, ендогенних лігандів і ферментів, які метаболізують ці ліганди [23]. Ендоканабіноїди ефективно модулюють перебіг фізіологічних процесів шляхом активації специфічних канабіноїдних рецепторів типу CB1 та CB2, що є білковими молекулами, спряженими з G<sub>i</sub>-білками плазматичної мембрани. Останні опосередковують пригнічення аденілатциклази, активацію мітогенактивованої протеїнкінази, регуляцію кальцієвих і калієвих каналів та інші шляхи сигнальної трансдукції [15]. Канабіноїдні рецептори експресуються у клітинах нервової системи [8, 13] та у багатьох периферійних тканинах [25].

Показано, що канабіноїди модулюють автономну нейротрансмісію. Активуючи рецептори типу CB1,  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол і анандамід викликають гіпотензію у щурів шляхом інгібування симпатичних нервів [18]. Зокрема, WIN 55,212-2 і CP55940 (синтетичні агоністи канабіноїдних рецепторів) пресинаптично пригнічують симпатичну кардіоакселераторну відповідь у серці кролів через активацію CB1 рецепторів. Ці ж агоністи також пригнічують брадикардію, викликану стимуляцією блукаючого нерва [31]. Однак протягом останніх років дискутується наявність додаткових механізмів дії канабіноїдів на функціонування клітин [16, 29, 33]. Припускається також наявність CB1 та CB2 незалежних ефектів канабіноїдів [26, 27].

Відомо, що травний тракт містить ендогенні канабіноїди (анандамід і 2-арахідонілгліцерол), а активація CB1 рецепторів пригнічує гастроінтестинальну моторику, кишкову секрецію та секрецію кислоти шлунковими залозами [19, 23].

Підщелепна слинна залоза є однією з найбільших слинних залоз у ссавців, і саме вона є основним джерелом рідкої частини слини, необхідної для зволоження та забезпечення антибактеріального захисту органів ротової порожнини [24]. Дослідженнями *in vitro* на зрізах підщелепної слинної залози щурів показано, що  $^3\text{H}-\Delta^9$ -тетрагідроканабінол транспортується й акумулюється тканиною залози [21]. Крім того, локалізацію канабіноїдних рецепторів обох типів (CB1 та CB2) було виявлено імуногістохімічними методами в ацинарних і протокових клітинах підщелепної слинної залози щурів [30]. Показано, що активація канабіноїдних рецепторів призводить до пригнічення агоніст-індукованого слиновиділення [30]. Однак слід зазначити, що висловлюються міркування про здатність ендоканабіноїдів модулювати функції слинних залоз, яка опосередковується не лише їх впливом на автономну нейротрансмісію [30]. Таким чином, сьогодні відсутні відомості про роль ендоканабіноїдів у регулюванні функцій слинних залоз і додаткові внутрішньоклітинні механізми, які можуть опосередковувати їхні ефекти, що і зумовило мету даної роботи.

Забір 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 [2]. 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 [2]. Після внутрішньом'язової ін'єкції тваринам суміші кетаміну (90 мг/кг маси) (ВАТ «Фармак», Київ) та лістенону (0,08 мл/кг) (Nucomed 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 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 металохромого барвника арсеназо III.

Виготовлення зрізів підщелепної слинної залози. Після видалення з тіла тварини залозу фіксували у 2 мл 3%-го розчину агарози (Sigma, тип VIIA). Розчин агарози виготовляли на основі базового зовнішньоклітинного розчину (ммоль/л): 140 NaCl, 10 HEPES-NaOH, 4.7 KCl, 1.13 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 D-глюкоза, pH 7.3, підігрітого до 90°C. Після приготування розчин агарози охолоджували до ~35°C і занурювали у нього часточки залози. Суміш тканини залози й агарози охолоджували при температурі 4–8°C, після чого виготовляли прямокутні блоки, які за допомогою спеціального клею прикріплювали до тканинного столика вібратора, заповненого охолодженим до 4–6°C базовим зовнішньоклітинним розчином і виготовляли зрізи тканини залози товщиною 200–300 μм. Після цього зрізи залози витримували у базовому зовнішньоклітинному розчині при температурі 25°C до проведення експерименту.

Концентричні  $\text{Na}^+$ -чутливі мікроелектроди та реєстрація зовнішньоклітинних  $[\text{Na}^+]_z$  транзєнтів. Концентричні  $\text{Na}^+$ -чутливі мікроелектроди з напівчасом відповіді 4–6 мс були виготовлені за методикою, описаною раніше [10]. Зміни  $[\text{Na}^+]_z$  реєстрували за методикою, описаною раніше [9].

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

Клітини слинних залоз і, зокрема, підщелепної залози здатні здійснювати як нестимульовану, так і агоністстимульовану секрецію слини [3, 20]. Причому нестимульоване слиновиділення відіграє вирішальну роль у забезпеченні зволоження ротової порожнини у період між прийняттями їжі [4]. Враховуючи це, у першій серії експериментів ми вивчали роль канабіноїдних рецепторів у регуляції нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів. З метою активації канабіноїдних рецепторів ми використовували їх синтетичний агоніст [2,3-дигідро-5-метил-3-(4-морфолінілметил)піроло-[1,2,3-де]-1,4-бензоксазін-6-іл]-1-нафталеніл-метанонемезілат (WIN 55,212-2), який характеризується високою афінністю до обох типів канабіноїдних рецепторів. Показано, що в умовах *in vivo* він проявляє повний спектр фармакологічних ефектів тетрагідроканабінолу [14]. В умовах *in vitro* виявлено здатність WIN 55,212-2 пригнічувати холінергічну трансмісію тонкої кишки людини, вивільнення ацетилхоліну ентеричними нервами мурчаків, перистальтику тонкої кишки мурчаків і товстої кишки мишей, знижувати електрично стимульований транспорт іонів у тонкій кишці щурів. Відома також його здатність в умовах *in vivo* знижувати гастроїнестинальний транзит і дефекацію в мишей, акумуляцію рідини у тонкій кишці щурів та пентагастринстимульовану секрецію кислоти шлунком щурів [для огляду див. 19].

У даній роботі нами досліджено вплив WIN 55,212-2 на параметри нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою *in vivo*. Відбір слини проводили через 5 хв після ін'єкції у залозу 50 мкл WIN 55,212-2 (5 мкМ). Показано, що введення WIN 55,212-2 призводило до статистично достовірного зниження швидкості нестимульованого слиновиділення та концентрації кальцію в секретованій слині в середньому на  $46,2 \pm 7,5\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ) та  $28,5 \pm 2,6\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) відповідно, порівняно з контролем (рис. 1). Таким чином, одержані нами дані свідчать про розвиток ксеростомії за умов активації канабіноїдних рецепторів і про їхню роль у регуляції функціонування підщелепної слинної залози.

Слід пам'ятати про існування значної кількості клінічних даних, які свідчать про зменшення кількості слини та виникнення відчуття сухості в ротовій порожнині у пацієнтів внаслідок активації канабіноїдних рецепторів (розвиток ксеростомії) [20, 22]. Механізм даного явища залишається нез'ясованим. Для дослідження внутрішньоклітинних механізмів, які опосередковують розвиток ксеростомії, необхідним є використання експериментальних моделей. На основі проведених експериментів можна стверджувати, що розроблена нами експериментальна модель аналізу параметрів слиновиділення в умовах *in vivo* є адекватною для вивчення механізму модулюючої дії канабіноїдів на функціонування підщелепної слинної залози. Крім того, на основі одержаних даних можна зробити висновок про роль канабіноїдних рецепторів у регулюванні нестимульованого слиновиділення, тобто слиновиділення, яке перебуває під контролем фонового, а не імпульсного виділення нейротрансмітерів [4]. Проте у випадку як нестимульованого, так і стимульованого процесу слиновиділення здійснюється завдяки запуску внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації внаслідок

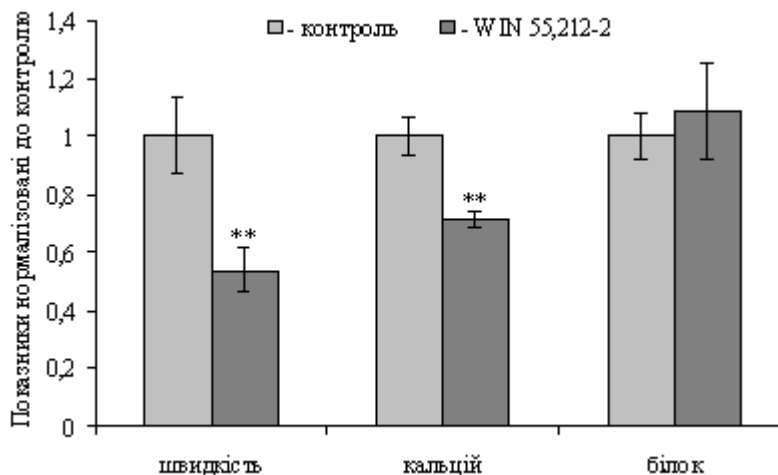


Рис. 1. Параметри нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів за умов введення у залозу тварин WIN 55,212-2 (5мкМ) відносно нестимульованого контролю. \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем.

активації мембранних рецепторів агоністом. Для ацинарних клітин підщелепної слинної залози таким агоністом, який запускає секрецію рідкого компоненту слини, є ацетилхолін або його аналоги [28]. Враховуючи це, у наступній групі експериментів ми вивчали вплив агоністів канабіноїдних рецепторів на параметри слиновиділення, стимульованого холіноміметиками, які є основними у регуляції секреції рідини й електролітів [7]. Згідно з даними літератури, канабіноїд анандамід пригнічує метахолін- і норепінефриніндуковане слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів [30]. Також показано, що  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол ( $\Delta^9$ -THC) не спричинював змін пілокарпін- чи ацетилхолінстимульованого потоку слини у котів, але значно зменшував потік слини з підщелепної слинної залози котів і собак під час електричної стимуляції барабанної струни. Припускається, що таке зниження електрично-стимульованого потоку слини у собак відбувається за рахунок зменшення інтенсивності вивільнення ацетилхоліну, в свою чергу призводить до зменшення потоку крові до підщелепної слинної залози та кількості ацетилхоліну для стимуляції секреторних клітин залози [22]. При дослідженні впливу WIN 55,212-2 на параметри агоністіндукованого слиновиділення, індукованого активацією мускаринових рецепторів, відбір слини проводили через 10 хв після ін'єкції агоністів. Відомо, що аналог ацетилхоліну, агоніст М-холінорецепторів – пілокарпін, стимулює секрецію рідкої слини й електролітів, практично не змінюючи рівня секреції білка [2, 6]. Попередньо одержані нами дані [1] свідчать про функціональну взаємодію між різними рецепторними групами плазматичної мембрани ацинарних клітин. Зокрема, нами було показано модуляцію стимулюючого ефекту пілокарпіну при сумісній активації холіно- та пуринорецепторів [1]. З урахуванням цього та з метою уникнення можливого системного ефекту пілокарпіну проводили введення агоністів у двох варіантах: 1 – внутрішньоочеревинна ін'єкція пілокарпіну поєднувалась із внутрішньозалозним введенням WIN 55,212-2; 2 – обидві сполуки вводили внутрішньозалозно. Нами показано, що за умов внутрішньоочеревної ін'єкції тваринам пілокарпіну

(0,2 мг/кг) відбувалося статистично достовірне зростання швидкості слиновиділення, концентрації кальцію та білка в середньому на  $168,7 \pm 28,4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=7$ ),  $142,2 \pm 49,6\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=7$ ) та  $51,4 \pm 15,2\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=9$ ) відповідно порівняно з нестимульованим контролем (рис.2).

З'ясовано, що при внутрішньозалозній ін'єкції WIN 55,212-2 (5 мкМ) на фоні внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (0,2 мг/кг) спостерігалось зменшення стимулюючого ефекту пілокарпіну на швидкість слиновиділення на  $39,7 \pm 8,4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ ), концентрацію  $Ca^{2+}$  та білка на  $32,4 \pm 7,4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=7$ ) та  $58,7 \pm 19,4\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=4$ ) відповідно порівняно з пілокарпін-стимульованим контролем (рис. 2).

Встановлено, що за умов ін'єкції у залозу суміші пілокарпіну (0,2 мг/кг) та WIN 55,212-2 (5 мкМ) спостерігалися значно більш виражені зміни усіх досліджуваних параметрів слиновиділення. Зокрема, за таких умов стимулювальний ефект пілокарпіну на швидкість слиновиділення статистично достовірно зменшувався у середньому на  $51,8 \pm 9,6\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=6$ ), концентрацію  $Ca^{2+}$  та білка у секретованій слині – на  $54,9 \pm 8,3\%$  ( $n=6$ ) та  $57,9 \pm 5,2\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=4$ ) відповідно відносно пілокарпінстимульованого контролю (рис. 3).

З метою з'ясувати можливий вплив канабіноїдних рецепторів на активацію холінергічної сигнальної системи та наявність функціональних наслідків взаємодії між даними рецепторами ми проводили попереднє введення у залозу WIN 55,212-2, а після цього суміші WIN 55,212-2 та пілокарпіну. Після введення у залозу суміші WIN 55,212-2 та пілокарпіну (0,2 мг/кг) на фоні попереднього введення WIN 55,212-2 стимулювальний ефект пілокарпіну на швидкість слиновиділення (див. рис. 3) зменшувався у середньому на 22% ( $n=4$ ), концентрацію  $Ca^{2+}$  та білка у секретованій слині – на 70% ( $n=4$ ) та 93% ( $n=4$ ) відповідно щодо пілокарпінстимульованого контролю (рис. 4).

Отже, WIN 55,212-2-індуковане пригнічення пілокарпінстимульованого слиновиділення за умов попереднього введення WIN 55,212-2 достовірно не відрізняється від

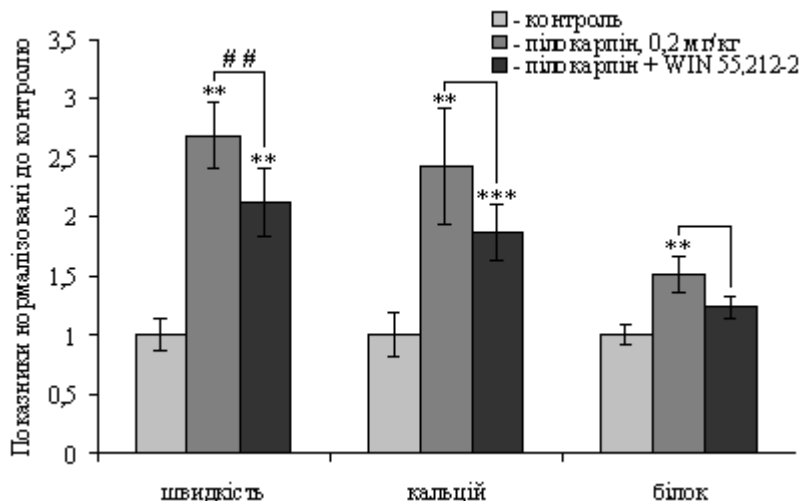


Рис. 2. Показники слиновиділення підщелепної слинної залозою щурів під впливом WIN 55,212-2 (5мкМ) на фоні внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (0,2 мг/кг) щодо нестимульованого контролю. \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з нестимульованим контролем; ## –  $P < 0,01$  порівняно зі стимулювальним ефектом пілокарпіну між двома експериментальними групами тварин.

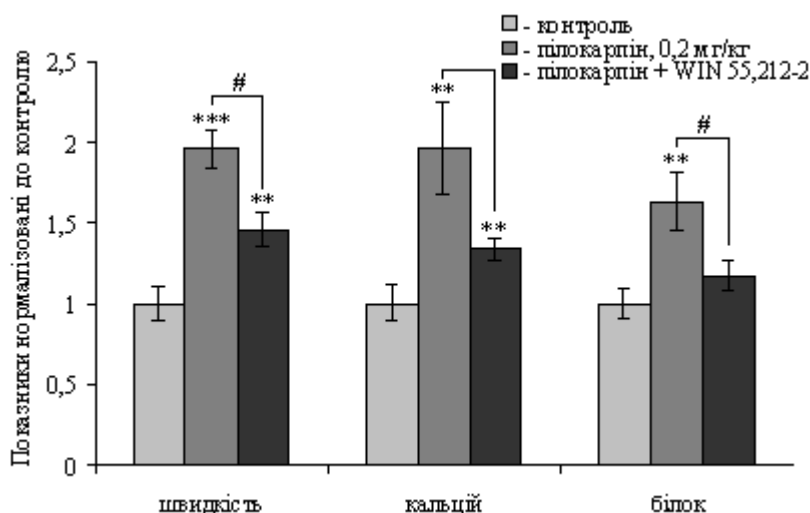


Рис. 3. Зміни слиновиділення підщелепною слинною залозою відносно нестимульованого контролю за умов введення у залозу пілокарпину (0,2 мг/кг) та суміші пілокарпину з WIN 55,212-2 (5мкМ). \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з нестимульованим контролем; # –  $P < 0,05$  порівняно зі стимульовальним ефектом пілокарпину між двома експериментальними групами тварин.

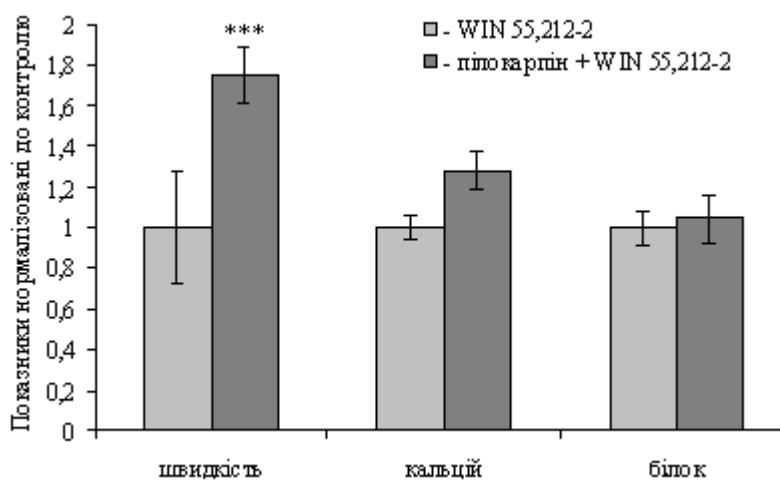


Рис. 4. Параметри нестимульованого та пілокарпінстимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів за умов введення у залозу WIN 55,212-2 (5мкМ) в обох випадках. \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з контролем.

такого, викликаного введенням у залозу суміші WIN 55,212-2 та пілокарпину і відсутності WIN 55,212-2 за нестимульованих умов (рис. 3).

Попередніми дослідженнями було показано, що ін'єкція пілокарпину у концентрації 2 мг/кг призводить до максимальної активації досліджуваних параметрів слиновиділення [2] та генерації цитоплазматичних  $Ca^{2+}$  транз'єнтів максимальної амплітуди [11]. Останнє зумовлене високим рівнем активації M-3 рецепторів плазматичної мем-

брани ацинарних клітин [28]. Враховуючи це, ми проводили вивчення ролі канабіноїдних рецепторів у регуляції слиновиділення, активаваного субмаксимальними концентраціями пілокарпіну. За умов внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (2 мг/кг) спостерігали зростання швидкості слиновиділення, концентрації кальцію та білка в середньому на  $303,9 \pm 33,7\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ),  $99,3 \pm 33,3\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) та  $37,1 \pm 29,1\%$  ( $n=4$ ) відповідно порівняно з контролем. При внутрішньозалозній ін'єкції WIN 55,212-2 (5 мкМ), на фоні внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (2 мг/кг), спостерігали зниження стимульовального ефекту пілокарпіну на швидкість слиновиділення в середньому на  $26,9 \pm 5,9\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ), концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  та білка на  $6,4\%$  ( $n=5$ ) та  $22,1\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ ) відповідно порівняно з пілокарпінстимульованим контролем (рис. 5).

Таким чином, при підвищенні концентрації пілокарпіну відбувається зменшення інгібуючого ефекту блокування канабіноїдних рецепторів на слиновиділення. Одержані дані дають змогу припустити наявність конкурентного інгібування, як це було показано у випадку сумісної активації адренергічних і пуринорецепторів [32].

При ін'єкції у залозу пілокарпіну (2 мг/кг) спостерігали статистично достовірне зростання швидкості слиновиділення та концентрації кальцію в середньому на  $147,2 \pm 42,9\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ) та  $75,2 \pm 16,8\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ ) відповідно щодо нестимульованого контролю. За умов введення у залозу суміші пілокарпіну (2 мг/кг) та WIN 55,212-2 (5 мкМ) спостерігалось статистично достовірне зниження стимульовального ефекту пілокарпіну на швидкість слиновиділення в середньому на  $45,0 \pm 3,7\%$  ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ) відносно пілокарпінстимульованого контролю (рис. 6).

Пригнічувальна дія WIN 55,212-2 на пілокарпін (2 мг/кг)-стимульоване слиновиділення при попередньому введенні у залозу WIN 55,212-2 достовірно не змінювалась.

З одержаних даних випливає, що ефективність пригнічувальної дії WIN 55,212-2 на агоністіндуковане слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів перебуває у

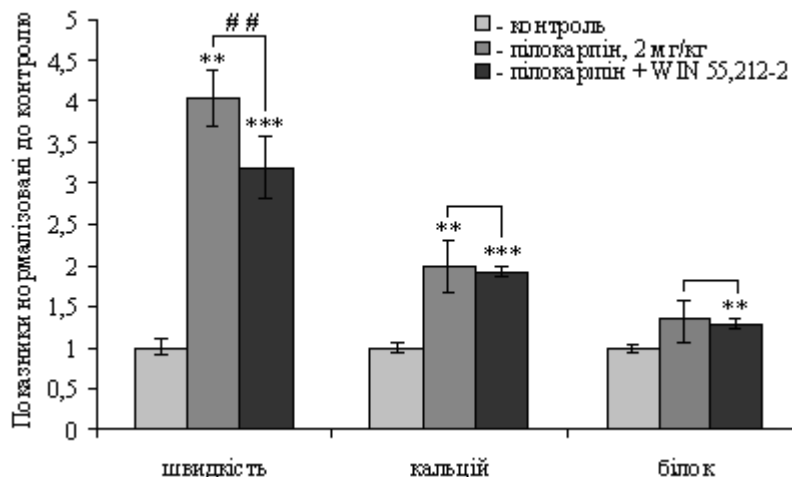


Рис. 5. Параметри слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів за умов внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (2 мг/кг), та введення у залозу тварин WIN 55,212-2 (5 мкМ) на фоні внутрішньоочеревинної ін'єкції пілокарпіну (2 мг/кг). Показники нормалізовані до нестимульованого контролю. \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з нестимульованим контролем; ## –  $P < 0,01$  порівняно зі стимульованим ефектом пілокарпіну між двома експериментальними групами тварин.

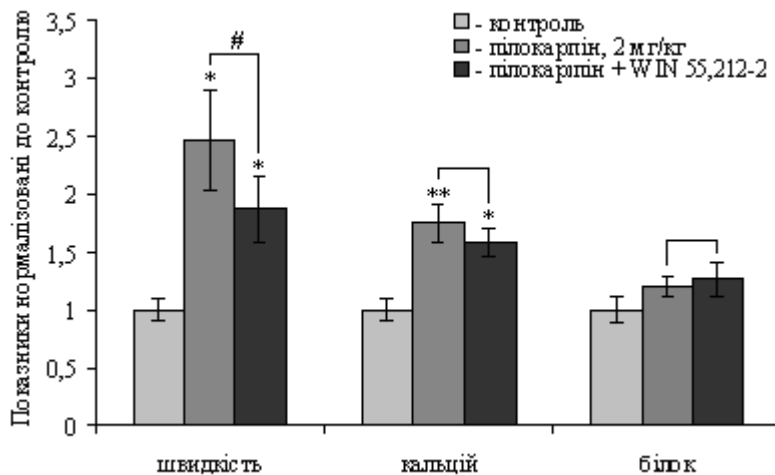


Рис.6. Параметри слиновиділення підщелепною слинною залозою відносно нестимульованого контролю за умов введення у залозу пілокарпіну (2мг/кг) та суміші пілокарпіну з WIN 55,212-2 (5мкМ). \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з нестимульованим контролем; # –  $P < 0,05$  порівняно зі стимулювальним ефектом пілокарпіну між двома експериментальними групами тварин.

залежності від концентрації пілокарпіну, введеного у тканину залози: при вищій концентрації холінергічного агоніста спостерігається послаблення пригнічувального ефекту синтетичного ендоканабіноїда WIN 55,212-2 на параметри слиновиділення. Останнє свідчить про те, що активація канабіноїдних рецепторів призводить до порушення перебігу сигнальних шляхів, які активуються за дії пілокарпіну. Однак той факт, що пригнічувальний ефект WIN 55,212-2 на швидкість слиновиділення зникає навіть за умов стимуляції слиновиділення високими дозами пілокарпіну, свідчить про задіяння додаткових (не залежних від функціонування М-холінорецепторів) сигнальних шляхів при активації канабіноїдних рецепторів. Крім того, враховуючи, що рівень секреції білка не зазнавав достовірних змін, можна припустити, що сигнальні шляхи, задіяні у реалізацію функціональних ефектів канабіноїдних рецепторів, не пов'язані зі змінами концентрації у клітинах цАМФ. Слід зазначити, що одержані нами результати відрізняються від даних інших авторів, які показали пряму кореляцію між активацією канабіноїдних рецепторів, акумуляцією у клітинах цАМФ та стимуляцією секреції амілази клітинами привушної слинної залози [5]. Ці відмінності ефектів, на нашу думку, можна пояснити в першу чергу відмінністю типу секреції: секрет привушної залози в основному ферментного складу, секреція якого і перебуває під прямим контролем цАМФ, тоді як секреція рідинного компоненту слини є кальційзалежним процесом і не зазнає істотного впливу з боку аденілатциклазної сигнальної системи [24]. Крім того, іншими авторами [31] було виявлено, що активація канабіноїдних рецепторів призводить до пригнічення форсколініндукованого накопичення у клітинах підщелепної слинної залози цАМФ, а це супроводжується пригніченням агоністіндукованої секреції. Нами вперше виявлено, що активація канабіноїдних рецепторів призводить до пригнічення нестимульованого слиновиділення, тобто за умов, коли на клітину не діють агоністи. Останнє також свідчить про здатність ендоканабіноїдів пригнічувати слиновиділення, зумовлене не тільки ефектом на синаптичну трансмісію, а й додатковими молекулярними механізмами.



Таким чином, наведені вище результати свідчать про роль канабіноїдних рецепторів у регуляції секреції рідинного й електролітного компонентів слини. З метою підтвердження даних, одержаних в умовах *in vivo*, ми провели реєстрацію зовнішньоклітинних секреторних натрієвих транзєнтів, викликаних активацією канабіноїдних рецепторів *in vitro*. Відомо, що при запуску трансклітинного транспорту електролітів відбуваються зміни зовнішньоклітинної концентрації катіонів калію, натрію, кальцію, хлору та бікарбонатів [24]. Зміни концентрації цих іонів у міжклітинному просторі базальної поверхні ацинарних клітин свідчать про секреторні події, і їх називають секреторними транзєнтами. З метою активації канабіноїдних рецепторів нами проведено локальну апікацію WIN 55,212-2 до клітин зрізів підщелепної слинної залози і показано, що дана сполука викликає появу дозозалежного транзєнтного зменшення зовнішньоклітинної концентрації натрію ( $[Na^+]_o$ , рис. 7, А–В). Крім того, за умов прикладання WIN 55,212-2 у базовому кальційвмісному зовнішньоклітинному середовищі призводить до постійного швидкого транзєнтного зменшення  $[Na^+]_o$ , яке спостерігається протягом усього часу дії WIN 55,212-2 (рис. 7, Б).

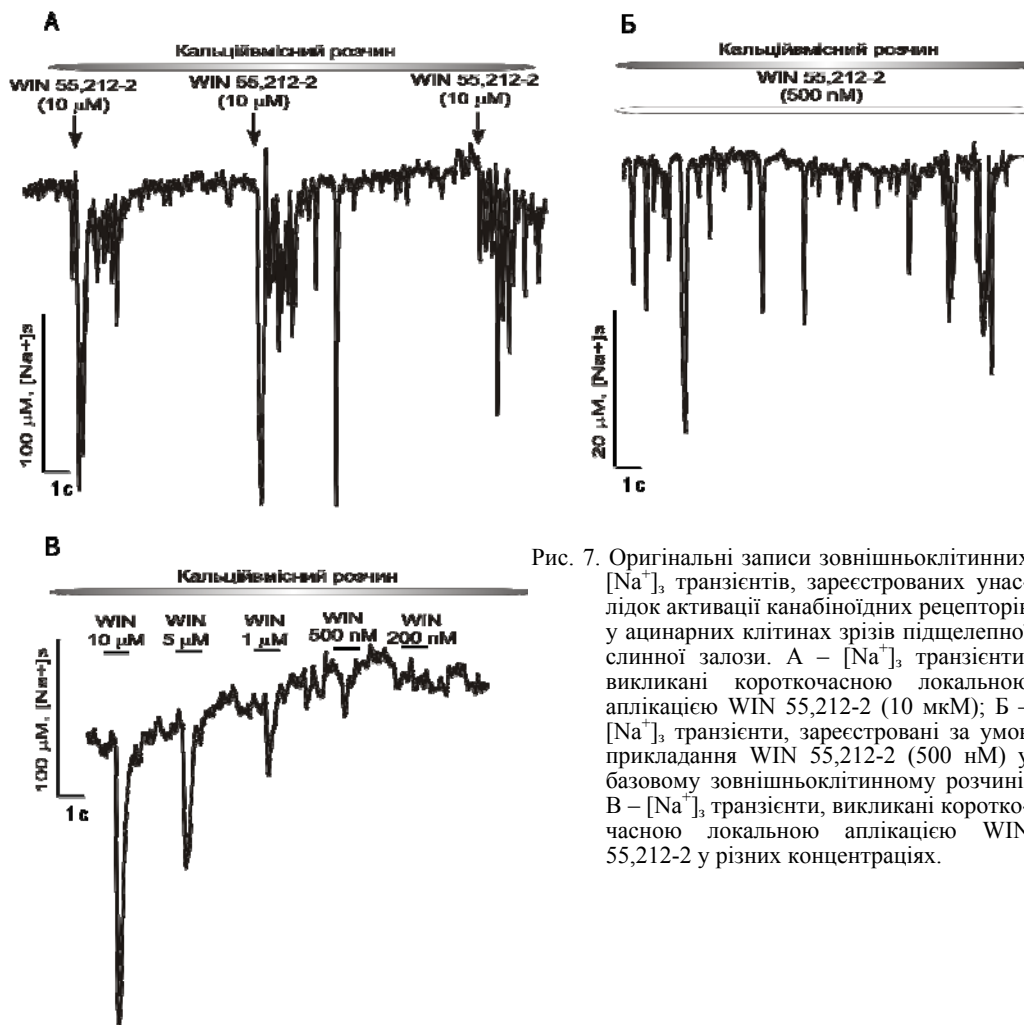


Рис. 7. Оригінальні записи зовнішньоклітинних  $[Na^+]_o$  транзєнтів, зарєстрованих унаслідок активації канабіноїдних рецепторів у ацинарних клітинах зрізів підщелепної слинної залози. А –  $[Na^+]_o$  транзєнти, викликані короткочасною локальною апікацією WIN 55,212-2 (10 мкМ); Б –  $[Na^+]_o$  транзєнти, зарєстровані за умов прикладання WIN 55,212-2 (500 нМ) у базовому зовнішньоклітинному розчині; В –  $[Na^+]_o$  транзєнти, викликані короткочасною локальною апікацією WIN 55,212-2 у різних концентраціях.

Нами розраховано напівефективну концентрацію WIN 55,212-2, яка становить  $15 \pm 4$  мкмоль/л (рис. 7, В). Встановлено, що мінімальна концентрація WIN 55,212-2, яка здатна викликати  $[Na^+]_i$ -транзєнти, становить 300 нмоль/л, а в концентрації 90 мкмоль/л спостерігаються  $[Na^+]_i$ -транзєнти максимальної амплітуди. Розраховано, що амплітуда  $[Na^+]_i$ -транзєнтів, викликаних WIN 55,212-2 у концентрації 10 мкмоль/л, становить  $280 \pm 34$  мкмоль/л, час напівзростання  $150 \pm 23$  мс, а швидкість напівспаду  $420 \pm 45$  мс (рис. 8).

Отже, дані свідчать про те, що в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози шурів наявні функціонально активні ендоканабіноїдні рецептори, активація яких призводить до появи  $[Na^+]_i$ -транзєнтів, що свідчить про здатність цих рецепторів модулювати секрецію електролітів.

Загалом нами встановлено, що у клітинах підщелепної слинної залози наявні функціонально активні канабіноїдні рецептори, активація яких призводить до пригнічення нестимульованого та пілокарпінстимульованого слиновиділення і викликає зміни електролітного складу слини. Виявлені зміни свідчать про модулюючий вплив ендоканабіноїдів на одну зі сигнальних ланок (найімовірніше кальційзалежні сигнальні шляхи), задіяних у регуляції рідинного слиновиділення при активації мускаринових рецепторів.

Загалом нами встановлено, що у клітинах підщелепної слинної залози наявні функціонально активні канабіноїдні рецептори, активація яких призводить до пригнічення нестимульованого та пілокарпінстимульованого слиновиділення і викликає зміни електролітного складу слини. Виявлені зміни свідчать про модулюючий вплив ендоканабіноїдів на одну зі сигнальних ланок (найімовірніше кальційзалежні сигнальні шляхи), задіяних у регуляції рідинного слиновиділення при активації мускаринових рецепторів. На користь цього свідчать дані імуногістохімічного аналізу локалізації канабіноїдних рецепторів у клітинах підщелепної слинної залози. Зокрема, згідно з даними Prestifilippo et al. [31], ці рецептори локалізовані у мембрані базального полюсу ацинарних клітин, тобто просторово колокалізовані з іншими G-білок зв'язаними рецепторними структурами та депокерованими каналами (TRPV1), які забезпечують основний шлях надходження  $Ca^{2+}$  у клітини. Здатність ендогенних канабіноїдів регулювати внутрішньоклітинну  $Ca^{2+}$  сигналізацію через модуляцію процесів вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму та власне через прямий вплив на функцію TRPV1 каналів була нещодавно доведена для інших типів клітин [12, 17, 34].

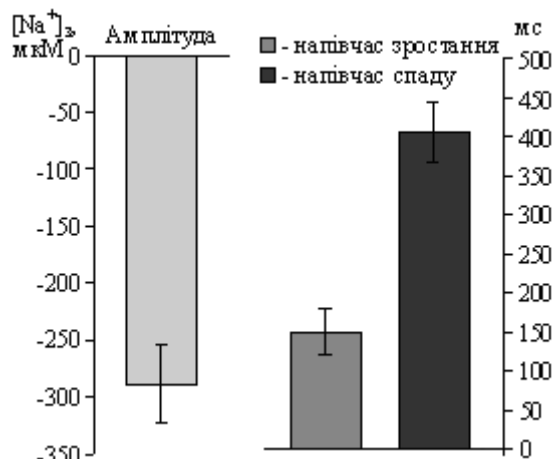


Рис. 8. Амплітудно-часові характеристики зовнішньоклітинних  $[Na^+]_i$  транзєнтів, викликаних WIN 55,212 (10 мкМ).

1. Гричан Н., Федірко Н. Роль пуринорецепторів у регуляції слиновиділення підщелепною слинною залозою шурів // Експеримент. та клін. фізіологія і біохімія. 2008. № 1. С. 11–22.
2. Копач О., Федірко Н. Кальційзалежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз у разі дії агоністів холінергічної природи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. № 37. С. 205–212.
3. Ambudkar I. Regulation of calcium in salivary gland secretion // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2000. N 11. P. 4–25.
4. Andersen J. P. Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase by site-directed mutagenesis // Biosci. Rep. 1995. Vol. 15. P. 243–261.

5. Busch L., Sterin-Borda L., Borda E. Expression and biological effects of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor in rat parotid gland // *Biochem. Pharmacol.* 2004. Vol. 68. No.9. P. 1767–1774.
6. Castle J. D., Castle A. M. Two regulated secretory pathways for newly synthesized parotid salivary proteins are distinguished by doses of secretagogues // *J. Cell Sci.* 1996. Vol. 109. No. 10. P. 2591–2599.
7. Culp D. J., Luo W., Richardson L. A., Watson G. E. et al. Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 271. No. 6. Pt. 1. P. 1963–1972.
8. Devane W. A., Dysarz F. A. III, Johnson M. R. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain // *Mol. Pharmacol.* 1988. Vol. 34. P. 605–613.
9. Fedirko N., Avshalumov M., Rice M. E., Chesler M. Regulation of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in hippocampal CA1 pyramidal neurons via extracellular carbonic anhydrase // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27. No. 5. P. 1167–75.
10. Fedirko N., Svichar N., Chesler M. Fabrication and use of high-speed, concentric H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-selective microelectrodes suitable for *in vitro* extracellular recording // *J. Neurophysiol.* 2006. Vol. 96. No. 2. P. 919–924.
11. Fedirko N., Kruglikov I., Kopach O. et al. Changes in functioning of rat submandibular salivary gland under streptozotocin-induced diabetes are associated with alteration of calcium signaling and calcium transporting pumps // *Biochem. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1762. N 3. P. 294–303.
12. Gkoumassi E., Dekkers B. G. J., Dröge M. J. et al. (Endo)cannabinoids mediate different Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms in human bronchial epithelial cells // *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* 2009. Vol. 380. N 1. P. 67–77.
13. Herkenham M., Lynn A. B., Little M. D. et al. Cannabinoid receptor localization in brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 1932–1936.
14. Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors // *Pharmacol. Rev.* 2002. Vol. 54. No. 2. P. 161–202.
15. Howlett A. C. The cannabinoid receptors // *Prostaglandins and other lipid mediators.* 2002. Vol. 68–69. P. 619–631.
16. Howlett A. C., Breivogel C. S., Childers S. R. et al. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress // *Neuropharmacol.* 2004. Vol. 47. No. 1. P. 345–358.
17. Hsu S.-S., Huang C.-J., Cheng H.-H. et al. Anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells // *Toxicol.* 2007. Vol. 231. P. 21–29.
18. Ishac E. J., Jiang L., Lake K. D. et al. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves // *Br. J. Pharmacol.* 1996. Vol. 118. P. 2023–2028.
19. Izzo A. A., Mascolo N., Capasso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids // *Current Opinion in Pharmacol.* 2001. Vol. 1. P. 597–603.
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. N 2. P 125–140.
21. McConnell W. R., Borzelleca J. F. A study of the mechanism of transport of Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol in the rat submaxillary gland *in vitro* // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1978. Vol. 235. P. 180–186.
22. McConnell W. R., Dewey W. L., Harris L. S., Borzelleca J. F. A study of the effect of Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (Δ<sup>9</sup>-THC) on mammalian salivary flow // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1978. Vol. 206. P. 567–573.
23. McPartland J. M. The endocannabinoid system: an osteopathic perspective // *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2008. Vol. 108. P. 586–600.

24. *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.
25. *Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M.* Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids // *Nature.* 1993. Vol. 365. P. 61–65.
26. *Oz M.* Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids // *Pharmacol. Ther.* 2006. Vol. 111. No.1. P. 114–144.
27. *Pertwee R. G.* Pharmacological actions of cannabinoids // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005. Vol. 168. P. 1–51.
28. *Petersen O.* Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells // *J. Physiol.* 1992. N 448. P. 1–51.
29. *Plant T. D., Strotmann R.* TRPV4 // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2007. Vol. 179. P. 189–205.
30. *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.
31. *Szabo B., Nordheim U., Niederhoffer N.* Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. Vol. 297. P. 819–826.
32. *Toescu E. C., Lawrie A. M., Petersen O. H.* et al. Spatial and temporal distribution of agonist-evoked cytoplasmic  $Ca^{2+}$  signals in exocrine acinar cells analysed by digital image microscopy // *The EMBO J.* 1992. Vol. 11. P. 1623–1629.
33. *Van der Stelt M., Di Marzo V.* Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection // *Neuromolecular Med.* 2005. Vol. 7. No. 1–2. P. 37–50.
34. *Van der Stelt M., Trevisani M., Vellani V.* et al. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying  $Ca^{2+}$  influx via TRPV1 channels // *The EMBO J.* 2005. Vol. 24. No. 17. P. 3026–3037.

#### THE ROLE OF CANNABINOID RECEPTORS IN THE REGULATION OF SALIVATION BY SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND

O. Netsyk \*, N. Grychan \*, O. Kopach \*\*, N. Fedirko \*

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

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

The role of cannabinoid receptors in the regulation of salivation was studied. We have found that agonist of CB1 and CB2 cannabinoid receptors – WIN 55,212-2 *in vivo* caused significant decrease of the rate of unstimulated salivation by rat submandibular salivary gland and decrease  $Ca^{2+}$  concentration in saliva. Stimulation of salivation with cholinergic agonist pilocarpine was significantly reduced upon injection of pilocarpine in the mixture with WIN 55,212-2. The latter was accompanied by significant decrease of the  $Ca^{2+}$  concentration in secreted saliva. We also performed local application of WIN 55,212-2 to slices of submandibular salivary gland and found that this is accompanied with transient decrease of  $[Na^+]_i$ .  $EC_{50}$  for WIN 55,212-2 is equal to  $15 \pm 4$  nM. We suggested the presence of the functionally active cannabinoid receptors in submandibular salivary gland cells and activation of these receptors leads to inhibition of nonstimulated and pilocarpine-induced salivation as well as changes in electrolyte content of saliva.

*Key words:* cannabinoid receptors, WIN 55,212-2, pilocarpine, submandibular salivary gland, salivation.

**РОЛЬ КАНАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ  
СЛЮНОВЫДЕЛЕНИЯ ПОДЧЕЛЮСТНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗОЙ КРЫС****О. Нецик<sup>\*</sup>, Н. Грычан<sup>\*</sup>, О. Копач<sup>\*\*</sup>, Н. Федірко<sup>\*</sup>**

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

*<sup>\*\*</sup>Институт физиологии имени О. Богомольца НАН Украины  
ул. Богомольца, 4, Киев 25001, Украина*

Исследована роль канбиноидных рецепторов в регуляции слюно-выделения. Установлено, что в условиях *in vivo* инъекция в подчелюстную слюнную железу агониста канбиноидных рецепторов типа CB1 и CB2 WIN 55,212-2 приводит к уменьшению скорости нестимулированного слюно-выделения, а также концентрации ионов кальция в слюне. Кроме того, установлено частичное угнетение стимулирующего эффекта холинэргического агониста пилокарпина на скорость слюновыделения при его совместном введении с WIN 55,212-2. При этом также наблюдается уменьшение концентрации ионов кальция в секретированной слюне. Проведена локальная аппликация WIN 55,212-2 к срезам подчелюстной слюнной железы. Показано, что активация канбиноидных рецепторов сопровождается появлением дозозависимого транзистентного уменьшения внеклеточной концентрации натрия ( $[Na^+]_в$ ). Рассчитана полуэффекивная концентрация WIN 55,212-2, которая составляет  $15 \pm 4$  мкмоль/л. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках подчелюстной слюнной железы функционально активных канбиноидных рецепторов, активация которых приводит к угнетению базального и пилокарпин-стимулированного слюновыделения, а также вызывает изменение электролитного состава слюны.

*Ключевые слова:* канбиноидные рецепторы, WIN 55,212-2, пилокарпин, подчелюстная слюнная железа, слюновыделение.

Стаття надійшла до редколегії 01.09.08  
Надійшла після доопрацювання 08.04.09  
Прийнята до друку 19.05.09