

УДК 612.3: 591.413.2

## КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНИЙ МЕХАНІЗМ РОЗВИТКУ РАДІАЦІЙНОЇ КСЕРОСТОМІЇ

Н. Гричан\*, О. Нецик\*, Л. Дацюк\*, 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

Слинні залози є одним із органів, найбільш чутливих до іонізуючого опромінення, одержаного протягом кількох днів або навіть годин. Однак відомості про можливі зміни  $Ca^{2+}$  сигналізації за умов розвитку радіаційної ксеростомії є нечисленними. У даній роботі ми виявили істотні порушення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози після локального опромінення ділянок голови та шиї. Ми показали, що рентгенівське опромінення у дозі 10 Гр викликає істотне підвищення базового рівня  $[Ca^{2+}]_i$  в ацинарних клітинах. Крім того, ми виявили зростання амплітуди Асн-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$  транзєнтів і виражене сповільнення їхньої кінетики; зменшення амплітуди іономіцин- та  $IP_3$ -індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу; пригнічення роботи  $Ca^{2+}$ -АТФ-аз плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулу. З іншого боку, ми виявили, що опромінення супроводжується збільшенням депокерованого входу  $Ca^{2+}$ . На нашу думку, одержані результати свідчать про те, що викликані опроміненням порушення внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  гомеостазу лежать в основі розвитку радіаційної ксеростомії.

*Ключові слова:*  $Ca^{2+}$ , кальцієвий гомеостаз, опромінення, депокерований вхід,  $Ca^{2+}$ -АТФ-ази.

Слинні залози є одним із найбільш чутливих до іонізуючого опромінення органів. Порушення функції цих залоз спостерігається навіть після відносно невисоких доз опромінення (~ 10 Гр), що робить слинні залози другим за чутливістю до радіації органом після кісткового мозку, який пошкоджується вже після опромінення дозою 1 Гр [13]. Внаслідок опромінення відбувається зниження інтенсивності слиновиділення [15, 17, 18], що призводить до розвитку ксеростомії (сухості у ротовій порожнині), виникнення карієсу й інших періодонтологічних захворювань [3, 22, 28]. Опромінення також супроводжується підвищенням в'язкості, зниженням буферної ємності, змінами концентрації електролітів, активності антибактеріальних систем слини. Все це викликає істотні зміни флори ротової порожнини, що проявляється у підвищенні кількості *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* та *Candida species*. Розвиток ксеростомії як результат зниження функціональної активності слинних залоз спостерігається вже протягом кількох годин після опромінення у мінімальних дозах [15, 17–19]. Показано, що низькі дози рентгенівського опромінення викликають оборотне порушення функцій слинних залоз, а дози в 25–40 Гр – необоротні [7, 24]. Нами розроблена експериментальна модель радіаційної ксеростомії, використання якої показало, що локальне опромінення ділянок голови та шиї щурів рентгенівськими променями з інтенсивністю 10–0,5 Гр призводить до вираженого пригнічення швидкості нестимульованого слиновиділення, концентрації білка

та  $\text{Ca}^{2+}$  у слині, яка виводилася протоками підщелепної слинної залози [20]. Одержані нами дані узгоджуються з клінічними даними інших авторів [15, 17, 18], які показали розвиток ксеростомії у пацієнтів через 1-2 год після опромінення ділянок шиї з терапевтичною метою (10–50 Гр). Крім того, ми провели електронно-мікроскопічне дослідження ультраструктури ацинарних клітин підщелепної слинної залози до і після опромінення (1–10 Гр). Нами показано відсутність виражених морфологічних змін ацинарних клітин після їх опромінення в дозах 1-10 Гр (*неопубліковані дані*).

Підщелепна слинна залоза є основним джерелом рідкої слини, збагаченої електролітами, ферментами та біологічно активними речовинами [16]. Функціонування підщелепної слинної залози перебуває під контролем автономної нервової системи й істотно посилюється при відчутті запаху, смаку їжі або при жуванні, а також під дією різноманітних психологічних факторів [7]. Дія таких стимулів приводить до вивільнення ацетилхоліну (АХ) парасимпатичними нервовими закінченнями, що викликає різке підвищення рівня секреції слини у ротову порожнину. Дія АХ пов'язана з викликаним ним підвищенням концентрації іонізованого кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) в ацинарних клітинах залози [16]. Зокрема, при дії АХ відбувається активація вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу (ЕПР) ацинарних клітин і надходження  $\text{Ca}^{2+}$  із зовнішньоклітинного простору за депокерованим механізмом, що разом приводить до зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [23]. Оскільки цитоплазматичний  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє таку важливу роль у формуванні та секреції слини, в ацинарних клітинах функціонують системи регуляторних механізмів, які підтримують гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  [2]. Так, здатність  $\text{Ca}^{2+}$  функціонувати як внутрішньоклітинний месенджер зумовлена існуванням ефективних метаболічних систем, що забезпечують підтримання низького рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитоплазмі та відносно високого рівня концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕПР. Необхідно також зазначити, що порушення кальцієвого гомеостазу в ЕПР може призводити до порушення синтезу секреторних білків, їх шаперонінгу та досягання [27]. Регуляція кальцієвого гомеостазу досягається за рахунок узгодженого функціонування іонних каналів (деякі з яких спряжені з метаболічними рецепторами) та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз, локалізованих у ЕПР і плазматичній мембрані (ПМ). Таким чином, враховуючи, що регуляція кальцієвого гомеостазу в цитоплазмі й ЕПР відіграє ключову роль у процесах синтезу та секреції компонентів слини [27], то порушення перебігу цих процесів може лежати в основі пригнічення слиновиділення при радіаційній ксеростомії. Однак, на сьогодні у літературі відсутні відомості щодо внутрішньоклітинних механізмів, які опосередковують порушення функцій слинних залоз при опроміненні.

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

**Регстрація концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі ацинарних клітин підщелепної слинної залози щурів.** Для вимірювання кількісних змін концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі інтактних ацинарних клітин підщелепної слинної залози щурів використовували мембранно-проникну форму високоафінного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда фура-2

(фура-2/АМ). Для завантаження  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда в ацинарні клітини суспензії ацинусів підщелепної слинної залози поміщали в базовий розчин, який містив мембранопроникну форму барвника в концентрації 5 мкмоль/л за наявності детергенту пліуронік F-127 (0,02%). Зафарбовані фура-2/АМ ацинарні клітини клали на скельця, які поміщали в перфузійну експериментальну камеру, змонтовану на мікроскопі (Axiolab, Zeiss, Oberkochen, Germany). Клітини спостерігали за допомогою довгофокусного, водоімерсійного об'єктива (63x, Ч.А. 0,9).

Для розрахунку концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) ми використовували формулу, запропоновану Гринкевичем зі співавт. [12]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot B \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

**Методика реєстрації концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в ендоплазматичному ретикулумі.** Використання таких  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих флуоресцентних індикаторів, як фура-2, для вимірювання цитоплазматичної концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  дає змогу аналізувати процеси внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, вивільнення та перезаповнення внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  [4, 26]. Проте доповненням до цього методичного підходу є проведення моніторингу концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  безпосередньо всередині  $\text{Ca}^{2+}$ -депонуючих органел. З цією метою ми використовували низькоафінний кальцієвий індикатор – маг-фура-2.

Зміни концентрації кальцію, депонованого у внутрішньоклітинних органелах, виражали не як абсолютні значення, а як співвідношення інтенсивності флуоресценції барвника на довжині хвилі збудження 360 нм до такої на 390 нм. Аналіз кількісних змін співвідношення інтенсивності флуоресценції 360/390 нм проводили за допомогою програмного пакету Microcal Origin.

**Одержання фракції везикул мембран секреторних клітин підщелепної слинної залози щурів.** Фракцію мембранних везикул ацинарних клітин підщелепної слинної залози одержували з використанням методів препаративної біохімії. До суспензії ацинарних клітин додавали буферний розчин (у масовому співвідношенні 1:8), який містив, ммоль/л: сахароза – 250,0; ЕДТА – 1,0; тріс-Cl – 10,0 (pH=7,1, t=4°C) та гомогенізували її у гомогенізаторі Поттера-Ельвейга. Гомогенат відцентрифугували протягом 10 хв при 1600 g. Пост'ядерний супернатант, збагачений мітохондріями (МХ), фрагментами ПМ та ЕПР, розчинними білками цитозолу, центрифугували при 500 000 g протягом 2 год. Одержаний пост'ядерний, постмітохондріальний супернатант одразу використовували в експерименті або зберігали при температурі –20°C.

З літературних даних відомо, що в процесі одержання мікросомальної фракції утворюється інтегральна популяція фрагментів, які мають різний характер везикульованості [11]. Тому для визначення топології мембранних фрагментів нами використано розчин неіонного детергенту – дигітонін [10].

**Визначення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз.** Перед початком експерименту аліквоти мембранних везикул переносили у розчин, наблизений за складом до внутрішньоклітинного, який містив, ммоль/л: NaCl – 50,0; KCl – 100,0; тріс-Cl – 20,0 (pH=7,4, t=37°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°C, реакцію зупиняли 20% трихлороцтовою кислотою. Вміст пробірок відцентрифугували протягом 10 хв при 1600 g. Згідно з раніше описаними методиками у супернатанті визначали вміст неорганічного фосфору ( $\text{P}_i$ ) [9] та вміст білка [14]. Відсутність зростання концентрації  $\text{P}_i$  під впливом дигітоніну свідчить на користь того, що переважна більшість везикул мік-

росомальної фракції мембран ацинарних клітин підщелепної слинної залози замкнена цитоплазматичною стороною назовні (*inside-out*). Такий характер везикульованості дає змогу використовувати дану мікросомальну фракцію для дослідження активностей  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз мембран ацинарних клітин, оскільки, як відомо, їхні каталітичні центри розташовані з цитоплазматичного боку [5].

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз розраховували як різницю між активністю АТФ-азних систем у  $\text{Ca}^{2+}$ -вмістному та безкальцієвому середовищах і виражали у мкмоль  $\text{P}_i$ , який вивільнився в ході АТФ-гідролазної реакції в перерахунку на 1 мг білка за 1 год. Тапсигаргін ( $1 \cdot 10^{-7}$  М) додавали до стандартного середовища інкубації для розділення сумарної  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азної активності на складові: тапсигаргін-нечутливу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу ПМ та тапсигаргін-чутливу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу ЕПР.

**Методика опромінення тварин.** Для дослідження механізмів радіаційної ксеростомії проводили локальне опромінення ділянки голови та шиї щурів. Для цього було виготовлено свинцевий диск, який захищав інші частини тіла тварин від опромінення та давав змогу фіксувати тварину в необхідному положенні. Перед початком опромінення тварин наркотизували внутрішньоочередовинною ін'єкцією суміші кетаміну (100 мг/кг маси) та лістенону (0,05 мл/кг) і фіксували у дорзально-вентральному положенні у свинцевому диску. Через центральний отвір диска рентгенівські промені досягали тільки ділянки голови та шиї тварин. Для опромінення використовували апарат РУМ-17 із застосуванням фільтрів Cu (0,5 мм) та Al (1 мм). Потужність дози 130–150 Гр/хв, напруга 140 кВ, сила струму 4 мА, шкірно-фокусна відстань 47 см. Дослідні групи тварин опромінювали з потужністю дози 10 і 15 Гр. Через 10 хв після опромінення здійснювали декапітацію та видалення підщелепної слинної залози з тіла тварин для ізолювання ацинарних клітин.

**Статистичний аналіз.** 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.

Раніше нами показано, що локальне опромінення ділянок голови та шиї щурів призводить до пригнічення швидкості нестимульованого й агоніст-стимульованого слиновиділення підщелепної слинної залози. Враховуючи, що досліджені нами функціональні відповіді клітин підщелепної слинної залози регулюються концентрацією цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$ , наступні експерименти були присвячені вивченню ефекту радіаційного опромінення на гомеостаз кальцію у досліджуваних клітинах.

**Зміни сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози після опромінення.** Ми показали, що базовий рівень сумарного кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози опромінених тварин на  $44 \pm 2\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=10$ , рис. 1) менший порівняно з неопроміненим контролем. Крім того, інкубування ацинарних клітин підщелепної слинної залози опромінених тварин у кальційвмістному зовнішньоклітинному розчині (15 хв) у присутності інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФа-зи ЕПР - тапсигаргіну (TG) у концентрації  $1 \times 10^{-7}$  М викликало достовірне зростання вмісту сумарного  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з опроміненим контролем на  $55 \pm 6\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=10$ , рис. 1) тоді як у неопроміненій групі тварин TG викликав достовірне зростання вмісту сумарного  $\text{Ca}^{2+}$  лише на  $18 \pm 5\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ , рис. 1).

Для більш детального аналізу отриманих даних ми інкубували ацинарні клітини у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині (EGTA, 1 ммоль/л), що попереджує активацію депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$ . Ми показали, що інкубація ацинарних клітин опро-

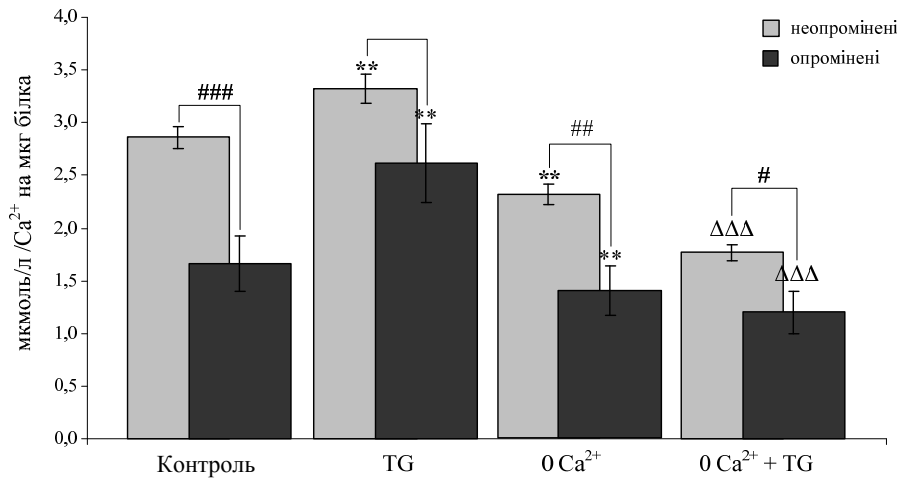


Рис. 1. Зміни вмісту сумарного Ca<sup>2+</sup> в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози у контролі та за умов опромінення дозою 10 Грей: \* – достовірність результатів порівняно з контролем кожної експериментальної групи; Δ – достовірність результатів порівняно з даними, отриманими за умов інкубування ацинарних клітин у безкальцієвому розчині обох експериментальних груп; # – достовірність результатів між двома експериментальними групами.

мінених тварин з TG у безкальцієвому розчині супроводжується зменшенням сумарного вмісту Ca<sup>2+</sup> в середньому на 13±2% (P<0,01, n=10, рис. 1), тоді як аналогічний ефект TG у неопромінену контроль становив 23±3% (P<0,001, n=9, рис. 1). Одержані дані свідчать про те, що локальне опромінення супроводжується змінами роботи кальцій-транспортних систем, які задіяні у підтриманні низького рівня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> станів спокою, тобто за відсутності стимуляції ацинарних клітин. Останнє може бути ймовірною причиною порушення за умов опромінення нестимульованого слиновиділення, показаного нами раніше [20].

Відомо, що ацетилхолін (АХ) є природним агоністом мускаринових рецепторів – основних рецепторних систем, що здійснюють контроль за функціональними відповідями ацинарних клітин слинних залоз, а порушення їх функціонування є ймовірною причиною розвитку різноманітних патологій [2, 16].

Виходячи з цього, ми припустили, що досліджені нами ефекти можуть бути пов'язані з модуляцією однієї з ланок ацетилхолін-індукованого сигнального шляху. Тому у наступній серії експериментів ми інкубували ацинарні клітини підщелепної слинної залози опроміненіх і неопроміненіх тварин з ацетилхоліном (АХ, 10 мкмоль/л) протягом 15 хв. Ми показали, що в опроміненіх тварин додавання АХ до базового кальцій-вмісного зовнішньоклітинного розчину викликав зростання вмісту сумарного Ca<sup>2+</sup> в ацинарних клітинах у середньому на 32±9% (P<0,05, n=5, рис. 2) порівняно з опроміненіх контролем, і не відрізнявся від ефекту АХ у групі неопроміненіх тварин (35±8%, P<0,01, n=5, рис. 2). Аплікування АХ у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині викликало зменшення вмісту сумарного Ca<sup>2+</sup> в досліджуваних клітинах опроміненіх тварин на 23±4% (P<0,05, n=5, рис. 2), а у неопроміненіх тварин – на 25±5% (P<0,01, n=9, рис. 2). Отже, ацетилхолін викликав збільшення сумарного вмісту Ca<sup>2+</sup> в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози опроміненіх і неопроміненіх тварин за умов їх інкубування у кальційвмісному та зменшення – у безкальцієвому середовищі однако-

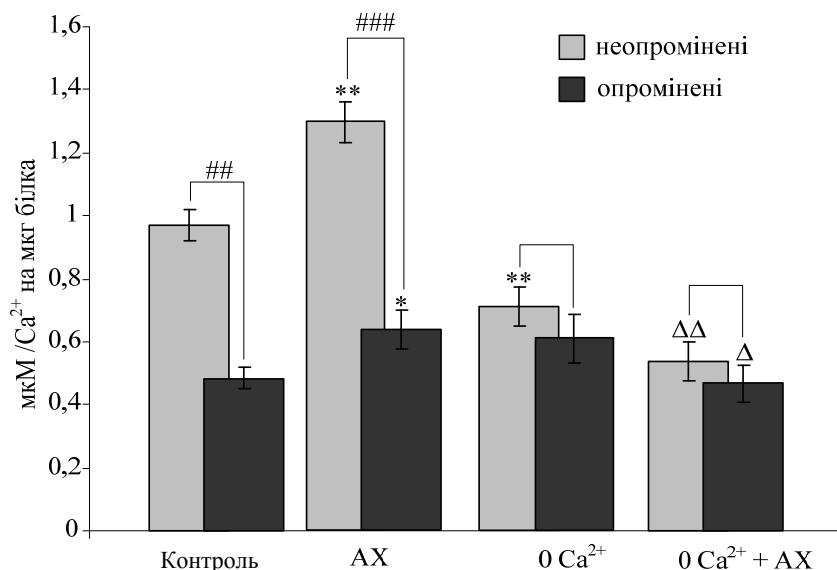


Рис. 2. Зміни концентрації сумарного Ca<sup>2+</sup> в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози у контролі та за умов опромінення дозою 10 Грей: \* – достовірність результатів порівняно з контролем кожної експериментальної групи; Δ – достовірність результатів порівняно з даними, отриманими за умов інкубування ацинарних клітин у безкальцієвому розчині обох експериментальних груп; # – достовірність результатів між двома експериментальними групами.

вою мірою як у опроміненних, так і у неопроміненних тварин. Таким чином, нами не виявлено істотних агоніст-індукованих змін сумарного вмісту кальцію за умов опромінення.

Отже, одержані дані свідчать про порушення процесів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу за умов локального опромінення тварин. Найбільш імовірно, що ці зміни стосуються насамперед перебігу кальцієвої сигналізації у ЕПР та депонерованого входу Ca<sup>2+</sup> у клітини.

**Зміни перебігу Ca<sup>2+</sup> сигналізації у цитоплазмі та ЕПР після опромінення.** Нами виявлено, що через 1 та 14 год після опромінення спостерігається достовірне зростання базового рівня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в ацинарних клітинах (рис. 3). Зокрема базальний рівень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в ацинарних клітинах неопроміненних тварин становив 95 ± 4 нМ (n=86), а у клітинах опроміненних тварин – 132±3 нМ (n=6) та 161±12 нМ (n=6) через 1 та 14 год після опромінення відповідно (рис. 3). Зміни аналогічного характеру були виявлені нами при дослідженні змін внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу у клітинах підщелепної слинної залози за умов діабетичної ксеростомії [8]. Ми вважаємо, що таке тривале зростання [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> може приводити до виснаження пулу секреторних везикул [23], а відтак до пригнічення нестимульованого слиновиділення, яке ми спостерігали в умовах *in vivo* [20]. Дане припущення, як було показано іншими авторами [15, 17, 18], є типовим проявом радіаційної ксеростомії. Слід однак зазначити, що змін базального рівня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> не було виявлено в епітеліальних лінійних клітинах Vcl-2 і Vcl-XL після їх опромінення γ-променями з потужністю дози 19 Гр [23], тоді як у клітинах привушної слинної залози при їх опроміненні рентгенівськими променями з потужністю 15 Гр також спостерігали істотне зростання базального рівня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, яке спостерігалось на 1, 3 та 10-ту добу після опромінення [6].

Ми показали, що аплікування до ацинарних клітин агоніста мускаринових рецепторів ацетилхоліну (5 мкМ) через 1 год після опромінення тварин призводить до виражених змін перебігу агоніст-індукованої  $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації (рис. 3). Так, амплітуда АХ-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйенту після опромінення була суттєво більшою та становила  $298 \pm 13$  нМ (n=12) порівняно з  $236 \pm 19$  нМ (n=64) у контрольній групі тварин. Таким чином, після опромінення нами виявлено достовірне зростання амплітуди АХ-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів на  $27 \pm 8\%$  ( $P < 0,001$ , n=12, рис. 3).

Слід зазначити, що як і у випадку базального рівня  $[Ca^{2+}]_i$ , так і при агоніст-індукованій  $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації зміни, викликані опроміненням, за характером відповідають тим, що були виявлені нами раніше при дослідженні внутрішньоклітинних механізмів діабетичної ксеростомії [8].

Також ми показали, що час напівспаду (t) АХ-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів перебуває в експоненціальній залежності та є істотно довшим на  $77 \pm 14\%$  ( $p < 0,01$ , n=12, рис. 3) в ацинарних клітинах опромінених тварин. Зокрема, розрахована величина t АХ-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів, зареєстрованих у ацинарних клітинах неопроміненого контролю, становила  $11,8 \pm 1,3$  с (n=12) та зростала до  $21 \pm 6$  с (n=12) в секреторних клітинах опромінених тварин.

Одержані дані дають нам змогу припускати, що викликане опроміненням зростання амплітуди та напівширини АХ-індукованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів може бути викликане: і) зміною чутливості мускаринових рецепторів до ацетилхоліну; іі) посиленням  $IP_3$ -чутливого вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР; ііі) посиленням входу  $Ca^{2+}$  через ПМ; іv) порушенням роботи систем, які забезпечують виведення  $Ca^{2+}$  з цитоплазми клітини після завершення дії стимулу. Іншими авторами також було виявлено зміни карбахол-стимульованої  $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації у клітинах привушної слинної залози після опромінення [6]. Однак цими авторами не було виявлено змін густини мускаринових рецепторів, їх чутливості до агоніста і модифікації рецептор-G-білок сигнального ланцюга при опроміненні. Припускається, що викликані опроміненням зміни перебігу карбахол-

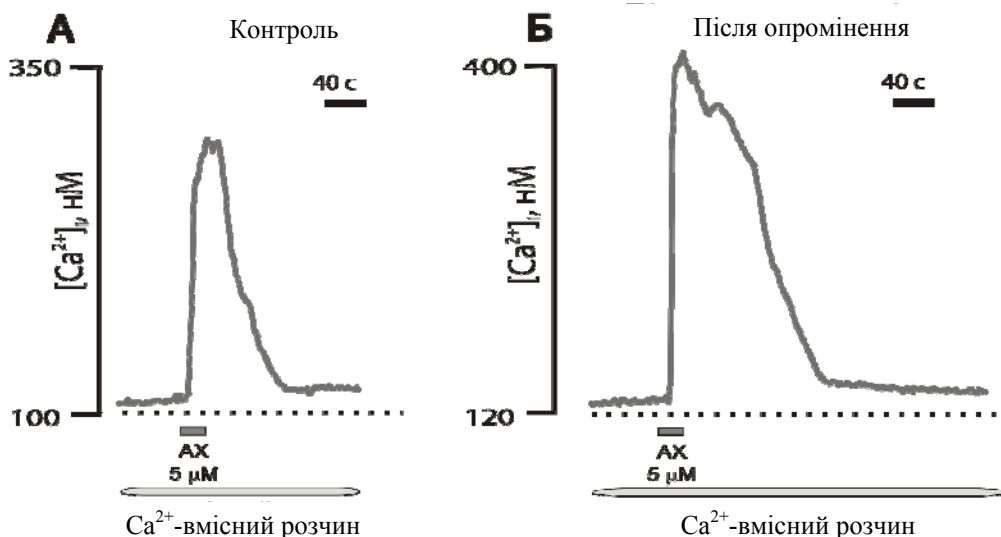


Рис. 3.  $[Ca^{2+}]_i$ -транзйенти, індуковані аплікацією до ацинарних клітин підщелепної слинної залози АХ (5 мкМ) у контролі (А) та після одноразового опромінення дозою 10 Грей (Б).

стимульованої  $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації зумовлені порушенням транслокації протеїнкінази C до плазматичної мембрани клітин при дії агоніста [8].

Подальші експерименти були присвячені перевірці висловлених нами припущень. У першу чергу ми провели прямий моніторинг концентрації  $Ca^{2+}$  в ЕПР ( $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ ) в ацинарних клітинах, завантажених низькоафінним барвником маг-фура 2/АМ. Щоби перевірити, чи змінюється за умов опромінення базовий рівень ( $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ ), ми прикладали до ацинарних клітин протоніофор іономіцин, який у рецептор-незалежний спосіб викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  з депо ЕПР [27].

Ми показали, що після опромінення вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР за умов дії іономіцину (500 нМ) суттєво знижується (на  $41 \pm 7\%$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 12$ , рис. 4). Достовірно зростає за умов опромінення і тривалість процесу іономіцин-індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР. Зокрема, напівширина іономіцин-індукованого  $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ -транзйєнта зростала на  $72 \pm 12\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n = 12$ , рис. 4). Крім того, ми показали, що додавання до внутрішньопіпетного розчину  $IP_3$  (2 мкмоль/л) викликало незначне зменшення  $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$  в опроміненіх тварин порівняно з опроміненим контролем (рис. 5). Зокрема, проведені розрахунки показали, що за таких умов амплітуда  $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ -транзйєнта зменшувалася на  $59 \pm 9\%$  ( $p < 0,001$ ,  $n = 12$ , рис. 5). У роботах інших авторів дані щодо ефекту опромінення на процес вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР діаметрально відрізняються. Зокрема, [21] показали відсутність ефекту опромінення на вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР слинних залоз. З іншого боку, [6] наводять дані, які свідчать про наявність такого ефекту. Ймовірною причиною відмінності даних ми вважаємо використання різних доз опромінення та відмінності між лінійними клітинами й ізольованими.

Отже, виявлені зміни свідчать про зменшення за умов опромінення  $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ . Іншими ж авторами висловлюється думка про те, що за умов опромінення відбувається пригнічення утворення  $IP_3$ , що і лежить в основі зменшення агоніст-індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР [25]. Однак, враховуючи, що спостерігали зменшення вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР, індуковане в рецептор-незалежний спосіб, ми вважаємо в основі виявлених змін ймовір-

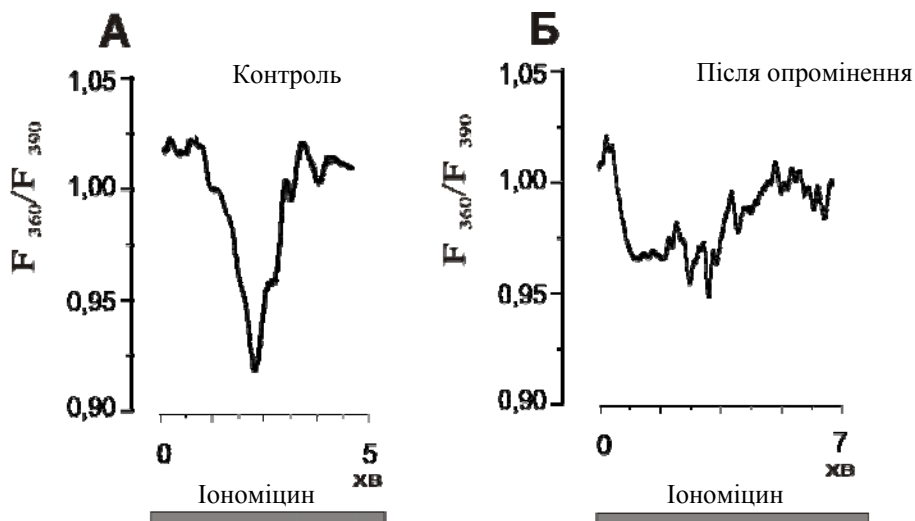


Рис. 4.  $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ -транзйєнти, індуковані аплікацією до ацинарних клітин підщелепної слинної залози іономіцину (500 нМ) у контролі (А) та після одноразового опромінення дозою 10 Грей (Б).



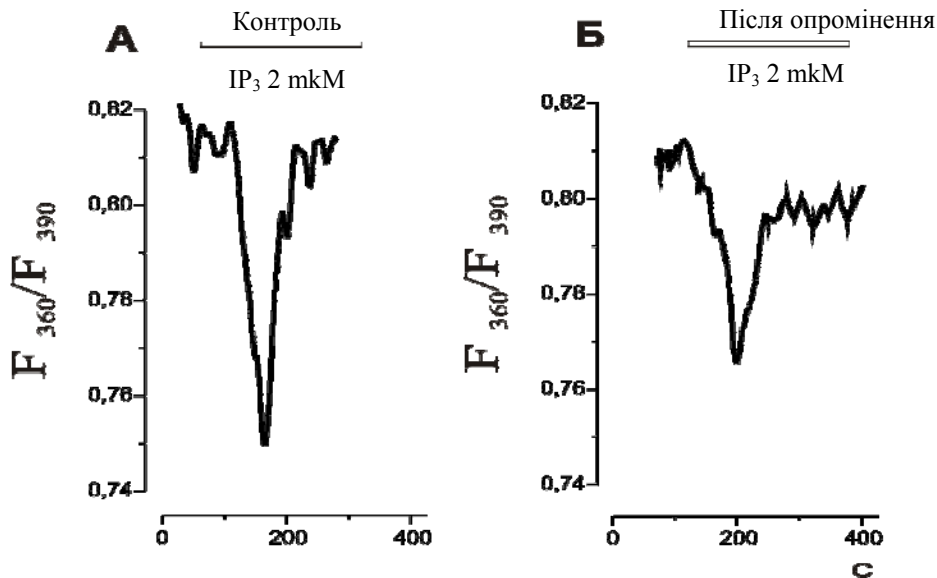


Рис. 5.  $[Ca^{2+}]_{EPR}$ -транзенти, індуковані внесенням у внутрішньопіпетний розчин  $IP_3$  (2 мкМ) у контролі (А) та після одноразового опромінення дозою 10 Грей (Б).

ним зростання інтенсивності пасивного витоку  $Ca^{2+}$  з ЕПР та/або зменшення інтенсивності зворотного захоплення  $Ca^{2+}$  в ЕПР внаслідок сповільнення роботи  $Ca^{2+}$ -АТФ-аз.

Аби перевірити, чи спричинює опромінення зміни депо-керованого входу  $Ca^{2+}$  в ацинарні клітини, ми завантажували клітини високоафінним кальційчутливим барвником фурі 2/АМ. Після цього спочатку клітини стимулювали АХ у безкальцієвому розчині з метою спустошити  $Ca^{2+}$  депо ЕПР і активувати депокеровані канали ПМ, а потім додавали  $Ca^{2+}$  (2 ммоль/л) до зовнішньоклітинного розчину, що дає змогу візуалізувати депокерований вхід у цитоплазму. Нами показано, що через 1 год після опромінення відбувається достовірне зростання та сповільнення депокерованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзентів (рис. 6). Зокрема абсолютна амплітуда депокерованих  $[Ca^{2+}]_i$ -транзентів зростає в середньому на  $56 \pm 6\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n=10$ ), а їх напівширина – на  $48 \pm 8\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n=10$ ). Збільшення інтенсивності та тривалості депокерованого входу  $Ca^{2+}$  також було виявлене в епітеліальних клітинах лінії Vcl-2 та Vcl-XL після їх опромінення  $\gamma$ -променями з потужністю дози 19 Гр [25]. Ми припускаємо, що збільшення амплітуди і тривалості депокерованого входу за умов опромінення служить внутрішнім компенсаторним механізмом.

**Зміни активності  $Ca^{2+}$ -АТФ-аз ПМ і ЕПР після опромінення.** Враховуючи, що одними з основних систем, які відповідають за підтримання низької  $[Ca^{2+}]_i$  у стані спокою ацинарних клітин, є  $Ca^{2+}$ -АТФ-ази ПМ та мембрани ЕПР [16], ми провели визначення питомої активності  $Ca^{2+}$ -АТФаз після опромінення (10 Грей). Ми показали, що через 1 год після опромінення спостерігається зниження сумарної  $Ca^{2+}$ -АТФ-азної активності мембран ацинарних клітин у середньому на  $32 \pm 4\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=6$ , рис. 6) порівняно з неопроміненим контролем. При цьому активність  $Ca^{2+}$ -АТФ-ази ПМ опромінених тварин достовірно не відрізнялася від контролю, а активність  $Ca^{2+}$ -АТФ-ази ЕПР достовірно зменшувалась на  $63 \pm 6\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=6$ , рис. 6).

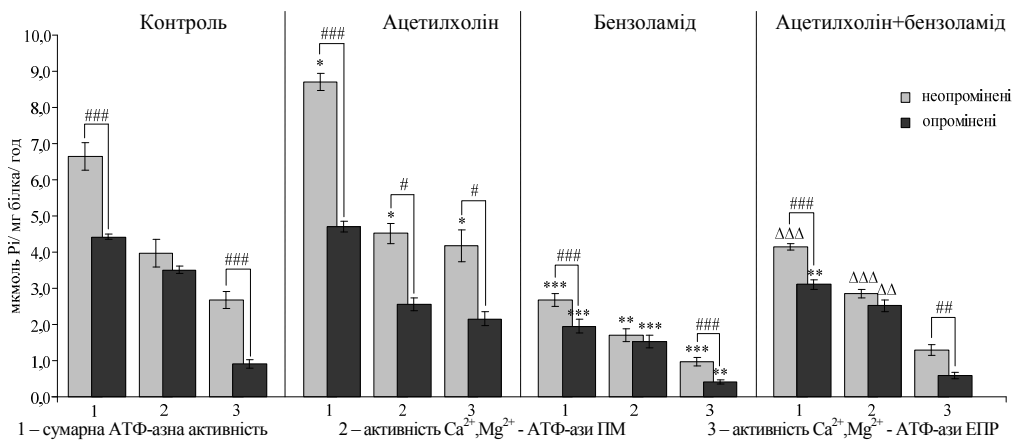


Рис. 6. Зміни питомої Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ПМ та ЕПР за умов опромінення дозою 10 Гр: \* – достовірність змін порівняно з контролем кожної експериментальної групи; Δ – достовірність змін порівняно з даними, отриманими за умов інкубування ацинарних клітин з бензоламідом; # – достовірність змін між двома експериментальними групами.

Інкубування ацинарних клітин підщелепної слинної залози групи неопромінених тварин з АХ (10 мкмоль/л) викликало зростання сумарної Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності в середньому на 33±10% (P<0,05, n=6, рис. 6). У опромінених тварин АХ не викликав достовірних змін сумарної Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності порівняно з неопроміненим контролем. При цьому активність Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ПМ і ЕПР зменшувалася на 42±8% (P<0,05, n=6, рис. 6) та 44±11% (P<0,05, n=6, рис. 6) відповідно.

Таким чином, одержані нами дані свідчать про виражені зміни внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup> гомеостазу у клітинах підщелепної слинної залози через 1 год після локального опромінення голови та ший піддослідних тварин. Ми встановили, що за умов опромінення відбувається і) зменшення кальцієвої ємності депо ЕПР; ii) потенціювання АХ-індукованих [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> відповідей клітин, що зумовлено зростанням амплітуди і тривалості депокерваного входу Ca<sup>2+</sup> у клітини; iii) вираженим пригніченням роботи Ca<sup>2+</sup>-АТФ-ази ПМ та ЕПР. Ми вважаємо, що виявлені зміни є причиною розвитку радіаційної ксеростомії, яка проявляється різким зменшенням інтенсивності слиновиділення та змінами білково-електролітного складу нестимульованої і агоніст-стимульованої слини.

1. *Конач О., Федірко Н.* Кальційзалежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз у разі дії агоністів холінергічної природи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 37. С. 205–212.
2. *Ambudkar I.* Regulation of calcium in salivary gland secretion // Crit Rev. Oral. Biol. Med. 2000. N 11. P. 4–25.
3. *Atkinson J. C., Grisius M., Massey W.* Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment // Dent. Clin. North Am. 2005. N 49(2). P. 309–326.
4. *Berridge M. J.* The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle // Cell Calcium. 2002. N 32. С. 235–249.
5. *Carafoli E., Brini M.* Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport // Current opinion in Chem. Biol. 2000. Vol. 4. P. C. 152–C161.
6. *Coppes R., Roffel A., Liekele J. W. et al.* Early Radiation Effects on Muscarinic Receptor-

- Induced Secretory Responsiveness of the Parotid Gland in the Freely Moving Rat // *Radiat. Res.* 2000. Vol. 153. P. 339–346.
7. *Eisbruch A., Ten Haken R. K., Kim H. M.* et al. Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999. N 45. Vol. 3. P. 577–587.
  8. *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.
  9. *Fiske C. H., SubbaRow Y.* The colometric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375–400.
  10. *Fiskum G.* Intracellular levels and distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in digitonin-permeabilized cells // *Cell Calcium.* 1985. Vol. 6. P. 25–37.
  11. *Grover A. K., Kwan C. Y., Crankhaw J., Daniel E. E.* Effect of digitonin on rat myometrium subcellular membrane fractions // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1981. Vol. 59. P. 1128–1133.
  12. *Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.* A New Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties // *J. Biol. Chem.* 1985. N 260. C. 3440–3450.
  13. *Kielbassa A. M., Hinkelbein W., Hellwig E., Meyer-Luckel H.* Radiation-related damage to dentition // *Lancet Oncol.* 2006. N 7(4). P. 326–335.
  14. *Lowry J. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.* Protein measurements with the folic phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. C265–C275.
  15. *McDonald S., Meyerowitz C., Smudzin T., Rubin P.* Preliminary results in a pilot study using WR-2721 before fractionated irradiation of the head and neck to reduce salivary gland dysfunction // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994. N 29. P. 747–754.
  16. *Melvin J., Yule D., Shuttleworth T., Begenisich T.* Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells // *Annu. Rev. Physiol.* 2005. N 67. P. 445–469.
  17. *Mira J. G., Wescott W. B., Starcke E. N., Shannon I. L.* Some factors influencing salivary function when treating with radiotherapy // *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 1981. N 7. P. 535–541.
  18. *Mossman K. L.* Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy // *Radiat. Res.* 1983. N 95 (2). P. 392–398.
  19. *Nagler R. M., Baum B. J., Fox P. C.* Effects of X irradiation on the function of rat salivary glands at 3 and 40 days // *Radiat. Res.* 1993. Vol 136(3). P. 392–396.
  20. *Netsyk O., Grychan N., Klevets M., Fedirko N.* Changes in the intracellular calcium homeostasis contributes to the development of irradiation-induced xerostomia // International Workshop of the Physiological Society „Latest advances in ion channels techniques applied to physiological problems” (Shanghai, 12–16, September 2008). Abstracts of the Physiological Society International Workshop ”Latest advances in ion channel techniques applied to physiological problems”. Suppl. 1. P. C16, P. 29.
  21. *O’Connell A., Evans R., Ambudkar I., Redman R.* Radiation-Induced Progressive Decrease in Fluid Secretion in Rat Submandibular Glands Is Related to Decreased Acinar Volume and Not Impaired Calcium Signaling // *Radiat. Res.* 1999. Vol. 151. N 2. P. 150–158.
  22. *Peter B., Van Waarde M. A., Vissink A.* et al. The role of secretory granules in radiation-induced dysfunction of rat salivary glands // *Radiat. Res.* 1995. Vol. 141(2). P. 176–182.

23. *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.
24. *Roesink J. M., Moerland M. A., Battermann J. J.* et al. Quantitative dose-volume response analysis of changes in parotid gland function after radiotherapy in the head-and-neck region // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001. Vol. 51. N 4. P. 938–946.
25. *Sun X., Liu X., Martinez R., Dang H., Zhang G.* Effects of radiation on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in salivary epithelial cell lines transfected with Bcl-2 and Bcl-XL // *Eur. J. Oral. Sci.* 2001. Vol. 109. N 2. P. 103–108.
26. *Tsien R. Y.* Intracellular Measurements of Ion Activities // *Annu. Rev. Biophys. Bioengineering.* 1983. N 12. C. 91–116.
27. *Verkhratsky A.* Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells // *Biol. Res.* 2004. Vol. 37. N 4. P. 693–699.
28. *Vissink A., Gravenmade E. J., Ligeon E. E., Konings A. W.* Functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands // *Radiat. Res.* 1990. N 124. P. 259–265.

#### **$\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT MECHANISM OF RADIATION-INDUCED XEROSTOMIA**

**N. Grychan\*, O. Netsyk\*, L. Datshjuk\*, O. Kopach\*\*, N. Vojtenko\*\*, N. Fedirko\***

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

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

Salivary glands are particularly highly susceptible to acute exposure to ionizing radiation obtained within few days or even hours. However, the information about the changes of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the conditions of radiation-induced xerostomia is limited. Here we showed the alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  handling in submandibular acinar cells after the local head and neck irradiation. Exposure to 10 Gy x-ray caused increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The amplitude of ACh-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients was increased and the responses were significantly decelerated. The ionomycin- and  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum was decreased and the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ases both plasma membrane and endoplasmic reticulum were decreased after irradiation. However, radiation enhanced store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx activated by ACh. These results suggest that radiation-induced disturbance of resting and agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  handling may underlie the development of radiation-induced xerostomia.

*Key words:*  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium homeostasis, irradiation, store-operated entry,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ases.

Стаття надійшла до редколегії 10.09.08

Прийнята до друку 14.10.08