ВІСНИК ЛЬВІВ. УН-ТУ *VISNYK OF LVIV UNIV.*
Серія біологічна. 2008. Вип. 47. С. 130-145 *Biology series. 2008. Is. 47. P. 130-145*

УДК 612.3: 591.413.2

Ca^{2+}-ЗАЛЕЖНИЙ МЕХАНІЗМ ПОРУШЕННЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ МЕНАДІОН-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

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.О.Богомольця НАН України*
вул. Богомольця, 4, Київ 25201, Україна

З'ясовано, що менадіон викликає зміни параметрів слиновиділення: початкове зростання швидкості слиновиділення, зростання концентрації білка та кальцію у секретованій слині. Проте довготривале введення менадіону у концентраціях 5, 10 і 50 мкмоль/л спричиняло поступове й виражене зниження концентрації білка та кальцію у секретованій слині. З іншого боку, активація холінергічної системи викликала зростання усіх досліджуваних параметрів слиновиділення, проте таке зростання не досягало рівня активації при дії лише пілокарпіну. На основі отриманих даних ми зробили висновок, що менадіон-індуковані зміни функціонування підщелепної слинної залози опосередковані змінами хоча б однієї ланки сигнального шляху холінергічної системи. Показано, що *in vitro* менадіон викликав зменшення концентрації сумарного кальцію. Виявлені зміни функціонування ацинарних клітин підщелепної слинної залози, найімовірніше, опосередковані змінами Ca^{2+} гомеостазу. Проведений електронно-мікроскопічний аналіз внутрішньої структури ацинарних клітин показав порушення структури мембрани мітохондрій, що, очевидно, зумовлене їх кальцієвим перевантаженням. Виявлені морфофункціональні зміни мітохондрій, на нашу думку, лежать в основі розвитку Ca^{2+}-залежного порушення функціонування ацинарних клітин підщелепної слинної залози за умов менадіон-індукованого апоптозу.

Ключові слова: підщелепна слинна залоза, слина, Ca^{2+} гомеостаз, менадіон, апоптоз.

Порушення процесів перебігу внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу, викликане тривалими періодами клітинної активності або підвищенням інтенсивності стимуляції клітин, може передувати розвиткові клітинного апоптозу та некрозу [22, 32]. Для багатьох типів клітин показано, що процесові клітинного апоптозу передує дегрануляція клітин. Процес дегрануляції супроводжується припиненням процесу синаптичної передачі у збудливих клітинах [8, 11] та екзоцитозу у незбудливих клітинах [15]. Припускається, що індуктором дегрануляції клітин є підвищення утворення активних форм кисню (ROS), що також опосередковується змінами внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації. Так, Guérin-Marchand et al. [19] показали, що H_2O_2 порушує перебіг внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, викликаної як фізіологічною, так і нефізіологічною стимуляцією незбудливих клітин [5, 34]. Незважаючи на це, ефекти ROS на внутрішньоклітинну кальцієву сигналізацію та механізм ROS-індукованого порушення процесу екзоцитозу залишається нез'ясованим. Враховуючи, що H_2O_2 не лише діє як ROS зовнішньоклітинно, але його ефект проявляється і всередині клітин, важко виділити специфічні ефекти ROS на

© Гричан Н., Копач О., Федірко Н., 2008

функціонування клітин. Щоби уникнути небажаного додаткового ефекту, ми використовували менадіон на заміну H_2O_2. Як відомо, менадіон (2-метил-1,4-нафтокуінон) – синтетичне похідне вітаміну K1 [14, 29]. Менадіон перетворюється за допомогою NAD(P)H: хіноноксидоредуктаза (NQOR) у клітині синтезує гідрохінон з використанням NAD(P)H. Після цього гідрохінон окислюється молекулярним киснем і супероксидом, внаслідок чого утворюється O_2. Таким чином, використання менадіону дає можливість досліджувати трансдукцію сигналів у клітинах без участі зовнішньоклітинних ROS.

Забір слини з проток підщелепної слинної залози. Слину, що продукувалася підщелепною слинною залозою, відбирали з використанням скляних канюль із діаметром носика 1,0–1,5 мм за раніше описаною методикою [1]. Перевагою даного методу є можливість проводити дослідження кількісного та якісного складу слини, що продукується та виводиться підщелепною слинною залозою щурів *in vivo*, а відтак дає змогу проаналізувати функціональну активність клітин досліджуваної залози [1]. Слід зауважити, що експерименти ми проводили між 10 та 11-ю годинами дня з метою уникнення впливу циркадних ритмів. Після внутрішньоочеревинної ін'єкції тваринам суміші кетаміну (100 мг/кг маси) та лістенону (0,05 мл/кг) тварин фіксували у дорзальновентральному положенні на хірургічному столику. Слину відбирали за допомогою мікроканюль, впритул підведених до проток залози у ротовій порожнині. Виділення слини підщелепною слинною залозою оцінювали за такими параметрами: швидкість слиновиділення, концентрація білка та кальцію. Швидкість слиновиділення розраховували як об'єм слини, що виділяється залозою за 1 год у перерахунку на 1 кг маси тварини. Концентрацію білка у слині визначали за методом Лоурі, концентрацію кальцію – з використанням металохромного барвника арсеназо III.

Ізолювання ацинарних клітин підщелепної слинної залози. *In vitro* дослідження впливу менадіону на внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію та секреторну активність залози проводили на ізольованих 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, $CaCl_2$ – 1,3, $MgCl_2$ – 1,0, гідроксиетилпіперазин–N–2–етансульфонова кислота (HEPES) – 10, глюкоза – 10, pH=7,4.

Електронна мікроскопія. Для дослідження внутрішньої структури ацинарних клітин до і після обробки менадіоном попередньо фіксували ізольовані ацинарні клітини підщелепної слинної залози у 1,5% розчині тетраокису осмію (OsO_4) та какодилатному буфері (pH=7,2) протягом 2–2,5 год при 4°C. Після цього зразки тричі промивали какодилатним буфером. Зневоднення зразків проводили з використанням етилового спирту зростаючої концентрації (50, 70, 90 та 98%) протягом 30 хв у кожному випадку. Надалі зразки переносили в пропіленоксид на 10–15 хв, після чого поміщали в суміш пропіленоксиду та смоли „Епон-812", яку згодом заміняли на чисту смолу – етап формування брикетів. У такому вигляді зразки полімеризували протягом 2 діб при температурі 60°C. Зрізи ацинарних клітин (товщиною 40–60 нм) виготовляли на ультрамікротомі УМТП 6М за допомогою алмазного ножа „ДІАТОМ". Зрізи контрастували за методом Рейнолдса [30]. Аналіз і фотографування зразків проводили з використанням електронно-трансмісійного мікроскопа ТЕМ-100.

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

Вплив менадіону на функціональні відповіді підщелепної слинної залози. Нами показано, що швидкість нестимульованого слиновиділення підщелепною слинною залозою за контрольних умов становила в середньому 1,31±0,21 мл/кг/год, концентрація білка та кальцію у секретованій слині − 0,44±0,05 та 0,28±0,03 ммоль/л (n=10), відповідно. Одержані величини показників слиновиділення узгоджуються із такими, що одержані нами раніше [2], та даними інших авторів [5].

Згідно з даними інших авторів, менадіон у концентрації 20 мкмоль/л викликає розвиток апоптичних і некротичних змін в ізольованих панкреацитах [18], а у дослідженнях, проведених на гепатоцитах, з метою індукувати апоптичні та некротичні зміни застосовували менадіон у концентрації 80 мкмоль/л [13]. Крім того, в експериментах на лімфоцитах з'ясовано, що менадіон починає проявляти свій деструктивний ефект на секреторну активність клітин вже у концентрації 5–10 мкмоль/л, що проявляється у вираженій дегрануляції цитоплазми клітин [20]. Дані щодо дії менадіону на функціональні відповіді клітин слинних залоз і, зокрема, підщелепної відсутні. Щоб з'ясувати ефект менадіону на функціональні відповіді підщелепної слинної залози, ми проводили внутрішньоочеревинну ін'єкцію тваринам менадіону в концентраціях 5, 10, 50 мкмоль/л.

У першій серії експериментів тваринам проводили внутрішньоочеревинну ін'єкцію 5 мкмоль/л менадіону. Відбір слини проводили через 1 та 24 год. Через 24 год проводили наступну ін'єкцію менадіону. У кожному випадку ін'єкціям передував відбір слини, після якого повторно вводили менадіон. Ми показали, що через 1 год після першого введення менадіону (5 мкмоль/л) відбувалося зростання швидкості слиновиділення в середньому на 20±2% (n=5, p<0,01, рис. 1). За даних умов концентрація білка та кальцію у секретованій слині зменшувалась у середньому на 20±7% (n=5, p<0,05, рис. 1) та 65±4% (n=5, p<0,001, рис. 1) відповідно.

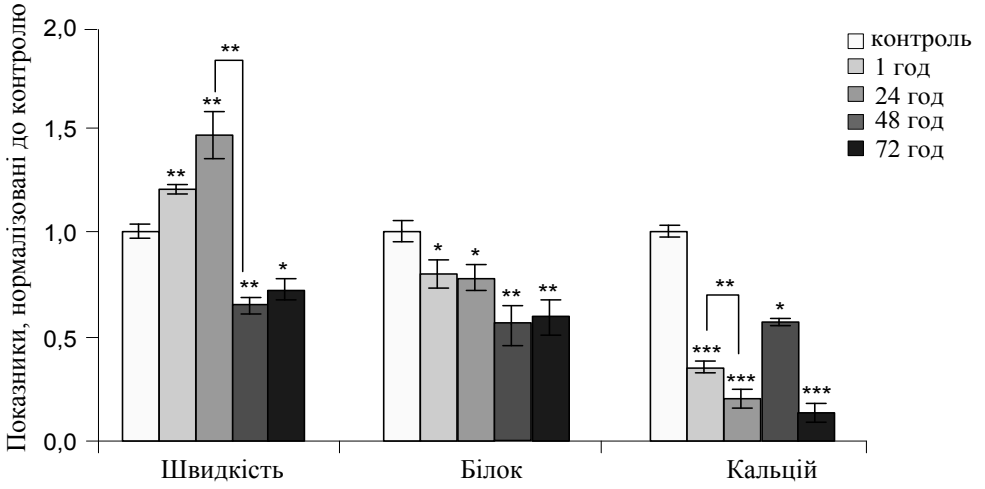

Рис. 1. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом менадіону (5 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

Після другої (24 год) ін'єкції менадіону (5 мкмоль/л) ми спостерігали подальше зростання швидкості нестимульованого слиновиділення, яке становило 46±12% (n=5, p<0,01, рис. 1) порівняно з контролем та 21 ±9% (n=5, p>0,05, рис. 1) порівняно з ефектом першої ін'єкції менадіону. При цьому концентрація білка у секретованій слині після другої ін'єкції менадіону зменшувалася на 22±6% (n=5, p<0,05, рис. 1) порівняно з контролем, але достовірно не відрізнялася від ефекту першої ін'єкції менадіону. Концентрація кальцію у секретованій слині після другої ін'єкції менадіону зменшувалася на 80±4% (n=5, p<0,001, рис. 1) порівняно з контролем та на 43±9% (n=5, p<0,01, рис. 1) порівняно з ефектом першої ін'єкції менадіону.

Після третьої (48 год) ін'єкції менадіону ми спостерігали виражене зменшення швидкості нестимульованого менадіонового слиновиділення в середньому на 35±4% (n=5, p<0,01, рис. 1) порівняно з контролем та на 54±6% (n=5, p<0,01, рис. 1) порівняно з ефектом другої ін'єкції менадіону. За цих умов відбувалося зменшення концентрації білка в слині у середньому на 30±4% (n=5, p<0,01, рис. 1) щодо контролю та не спостерігалося достовірних змін щодо ефекту другої ін'єкції менадіону. Концентрація кальцію у секретованій слині зменшувалася на 52±11% (n=5, p<0,05, рис. 1) порівняно з контролем і не відрізнялася від такої після другої ін'єкції менадіону.

Після четвертої (72 год) ін'єкції менадіону (5 мкмоль/л) не спостерігалося подальшого зменшення швидкості нестимульованого слиновиділення порівняно з ефектом третього введення менадіону, хоча величина даного показника була меншою за контрольні значення в середньому на 28±5% (n=5, p<0,01, рис. 1). Концентрація кальцію у секретованій слині не відрізнялася від такої після третьої ін'єкції менадіону та на 86±5% (n=5, p<0,001, рис. 1) була меншою за контрольні значення. Концентрація білка не відрізнялася від ефекту третьої ін'єкції менадіону та на 41±9% (n=5, p<0,01, рис. 1) була меншою за контроль. Таким чином, первинний ефект менадіону пов'язаний зі зростанням швидкості нестимульованого слиновиділення, хоча зміни білкового й електролітного складу секретованої слини зазнають протилежних змін. Враховуючи, що рівень нестимульованого слиновиділення за фізіологічних умов є незначним і регулюється концентрацією кальцію у цитоплазмі клітин у стані спокою (тобто без стимуляції) [14, 26], виявлені зміни можуть свідчити про підвищення базального рівня Ca^{2+} у нестимульованих ацинарних клітин – процес, який одержав назву *кальцієве перевантаження* [6]. Слід зазначити, що процес кальцієвого перевантаження виявлено в багатьох типах клітин за патологічних умов. Припускається, що таке перевантаження і є ймовірною причиною виснаження пулу секреторних гранул (дегрануляції клітин), що проявляється у первинному зростанні інтенсивності секреції. Зокрема, перевантаження цитоплазматичним кальцієм виявлено у клітинах слинних залоз за умов цукрового діабету [16, 31], пресинаптичних нервових закінченнях нейронів дорзальних рогів спинного мозку за умов розвитку діабетичної нейропатії [21] та периферичному запаленні [33], в β-клітинах підшлункової залози за умов інсулінзалежного й інсуліннезалежного діабету [27], лімфоцитах при розвитку гострого алергічного синдрому, клітинах слинних залоз при розвитку автоімунних захворювань [4, 35]. Ми припускаємо, що зменшення рівня секреції білкового й електролітного складу слини на початкових етапах введення менадіону відображає порушення гомеостазу кальцію всередині внутрішньоклітинних депо кальцію – таких, як ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії, оскільки саме функціонування цих органел визначає інтенсивність перебігу синтезу та процесингу секреторних білків і ефективність секреції електролітів [24, 26]. Якщо висловлена нами ідея про початкову

менадіон-індуковану дегрануляцію ацинарних клітин є вірною, то це повинно супроводжуватися протилежними ефектами при продовженні введення менадіону. Крім того, при тривалому перевантаженні клітин цитоплазматичним кальцієм слід очікувати не лише кальцій-залежного виснаження пулу секреторних везикул, але і подальшого порушення гомеостазу кальцію всередині ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій, викликане поступовим розвитком (слідом за тривалим цитоплазматичним) кальцієвого перевантаження. І справді, нами було виявлено зменшення значень усіх досліджуваних параметрів за умов тривалого введення менадіону, хоча зміни білкового вмісту слини були найменш вираженими (рис. 1).

Незважаючи на важливу роль нестимульованого слиновиділення у попередженні розвитку сухості ротової порожнини та періодонтологічних захворювань, основною функцією досліджуваної залози є секреція великої кількості слини за умов підвищення тонусу парасимпатичної нервової системи. Цей ефект на слиновиділення опосередковується активацією М-холінорецепторів [15, 28] при дії принципового медіатора – ацетилхоліну, що вивільняється закінченнями парасимпатичних нервових волокон [4]. Враховуючи це, ми припустили, що менадіон може модифікувати цей сигнальний шлях, який буде супроводжуватися змінами стимульованого слиновиділення. Для перевірки цього у наступній серії експериментів тваринам проводили ін'єкцію 5 мкмоль/л менадіону кожні 24 год, після відбору нестимульованої слини, через 3 год проводили ін'єкцію пілокарпіну і відбирали пілокарпін-стимульовану слину. Попередньо нами показано [2], що внутрішньоочеревинна ін'єкція пілокарпіну у розрахунку 2 мг/кг маси тварини викликала істотне посилення слиновиділення, що проявлялось у збільшенні швидкості слиновиділення в середньому у 3 рази, при цьому концентрація білка у секретованій слині достовірно не змінювалась, а концентрація кальцію зростала в середньому у 4,5 разу.

Нами показано, що через 24 год після першої ін'єкції менадіону зміни показників нестимульованого слиновиділення були аналогічними до виявлених у попередній серії експериментів. Проте з'ясувалося, що у присутності менадіону відбувається драматичне зменшення стимулюючого ефекту пілокарпіну на швидкість слиновиділення. Зокрема, через 24 год після першої ін'єкції менадіону стимулюючий ефект пілокарпіну на швидкість слиновиділення становив лише 12±5% ($n=5$, $p<0,05$, рис. 2) від такого у контролі. На противагу цьому, у присутності менадіону проявлявся стимулюючий ефект пілокарпіну на концентрацію білка у секретованій слині (42±6%, $n=5$, $p<0,01$, рис. 2), чого не спостерігалось за контрольних умов (рис. 2). У випадку із впливом на концентрацію кальцію стимулюючий ефект пілокарпіну зростав і становив 149±34% ($n=5$, $p<0,05$, рис. 2) від такого у контролі.

Після другої ін'єкції менадіону стимулюючий ефект пілокарпіну щодо його стимулюючого ефекту у контролі становив 53±4% ($n=5$, $p<0,05$, рис. 2) у випадку швидкості слиновиділення. Стимулюючий ефект пілокарпіну на концентрацію білка продовжував спостерігатись (на відміну від контролю) і становив 116±34% ($n=5$, $p<0,01$, рис. 2). Стимулюючий ефект пілокарпіну на концентрацію кальцію у слині становив 465±37% ($n=5$, $p<0,05$, рис. 2) порівняно з контролем. Після третьої ін'єкції менадіону стимулюючий ефект пілокарпіну щодо його стимулюючого ефекту у контролі становив 83±8% ($n=5$, $p<0,05$, рис. 2) у випадку швидкості слиновиділення та 670±126% ($n=5$, $p>0,05$, рис. 2) у випадку концентрації кальцію у слині.

Слід зазначити, що збільшення кількості ін'єкцій менадіону мало кумулятивний вплив на стимулюючий ефект пілокарпіну. Так, після першої (24 год), другої (48) та

третьої (72 год) ін'єкцій стимулюючий ефект пілокарпіну на швидкість слиновиділення становив 36±18% (n=5, p<0,05, рис. 2), 156±15% (n=5, p<0,001, рис. 2) та 246±23% (n=5, p<0,001, рис. 2) порівняно з менадіоновим нестимульованим контролем. Концентрація кальцію у даному випадку зростала у 6, 19 та 28 разів порівняно з менадіоновим нестимульованим контролем. Проте слід наголосити, що стимулюючий ефект пілокарпіну на зміни концентрації білка у секретованій слині проявлявся на 24 та 48-му год і зникав на 72-гу год після введення менадіону (рис. 2).

Ймовірно, що такий характер змін зумовлений кумулятивним пригнічувальним ефектом менадіону на нестимульоване слиновиділення (рис. 1, 2). Ми припускаємо, що зменшення швидкості слиновиділення у даному випадку є наслідком порушення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу насамперед у цитоплазмі клітин. З іншого боку, драматичне зростання концентрації кальцію у секретованій слині може свідчити про функціональні наслідки як тривалого цитоплазматичного перевантаження кальцієм, так і збільшення пасивного вивільнення кальцію із ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій ненормованим зростанням у них концентрації кальцію. Відомо, що накопичення кальцію у мітохондріях призводить до відкривання неспецифічної пори перемінного проникнення та істотного зростання швидкості вивільнення кальцію із мітохондрій [12]. Останнє буде посилювати цитоплазматичне перевантаження кальцієм, призводити до зменшення клітинних запасів АТФ, що, у свою чергу, супроводжуватиметься нагромадженням кальцію в секреторних везикулах [18] та порушенням роботи Ca^{2+}-АТФ-аз плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму [10].

Таким чином, одержані нами дані показують зниження стимулюючого ефекту активації М-холінорецепторів на швидкість слиновиділення за умов введення менадіону. Хоча, з іншого боку, нами виявлено підвищення рівня потенціації слиновиділення при тривалому введенні менадіону, що може відображати активацію внутрішньоклітинних протекторних механізмів в ацинарних клітинах. Ми припускаємо, що і в цьому випадку в основі виявлених змін лежить порушення перебігу процесів кальцієвої сигналі-

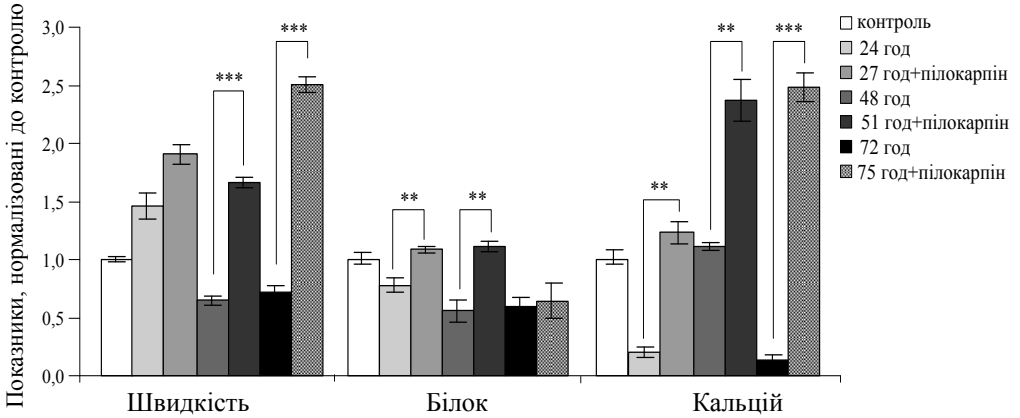

Рис. 2. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом пілокарпіну (2 мг/кг) на фоні менадіону (5 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

зації як у цитоплазмі, так і у внутрішньоклітинних депо кальцію. Останнє базується на тому, що кінетика агоніст-індукованих кальцієвих транзиєнтів і відповідна їй часова динаміка секреторної активності визначається взаємодією між процесами вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулуму, депо-керованого надходження кальцію, АТФ-залежного його захоплення в ендоплазматичний ретикулум та виведення через плазматичну мембрану. З іншого боку, кожен із цих процесів регулюється мітохондріями, чия кальцій-акумулююча функція зазнає істотних змін у присутності менадіону, як було показано на багатьох інших об'єктах [27].

Для детальнішого аналізу виявлених змін ми провели дослідження впливу менадіону на пілокарпін-стимульоване слиновиділення протягом кількох годин після ін'єкції. Одержані дані свідчать, що введення пілокарпіну через 3 год після ін'єкції менадіону (5 мкмоль/л) призводило до зменшення стимулюючого ефекту пілокарпіну на швидкість слиновиділення на 19±3% (n=5, p<0,05) порівняно з його стимулюючим ефектом у контролі у випадку концентрації кальцію у слині – стимулюючий ефект пілокарпіну становив 12±4% (n=5, p<0,05) від такого у контролі (рис. 3). При цьому стимулюючого ефекту пілокарпіну на концентрацію білка у слині не спостерігалось (рис. 3).

З іншого боку, стимулюючий ефект пілокарпіну після введення менадіону становив 58±5% (n=4, p<0,001, рис. 3) на швидкість слиновиділення, 5±15% (n=5, p<0,05, рис. 3) на концентрацію білка у слині та 52±16% (n=5, p<0,05) на концентрацію кальцію у секретованій слині порівняно з нестимульованим менадіоновим контролем.

Таким чином, одержані дані свідчать про те, що дисфункція підщелепної слинної залози розвивається вже протягом перших годин після однократного введення менадіону. Останнє дає змогу зробити висновок про високу чутливість досліджуваної залози до менадіону, а також про порушення під впливом менадіону функціонування М-холінорецепторів.

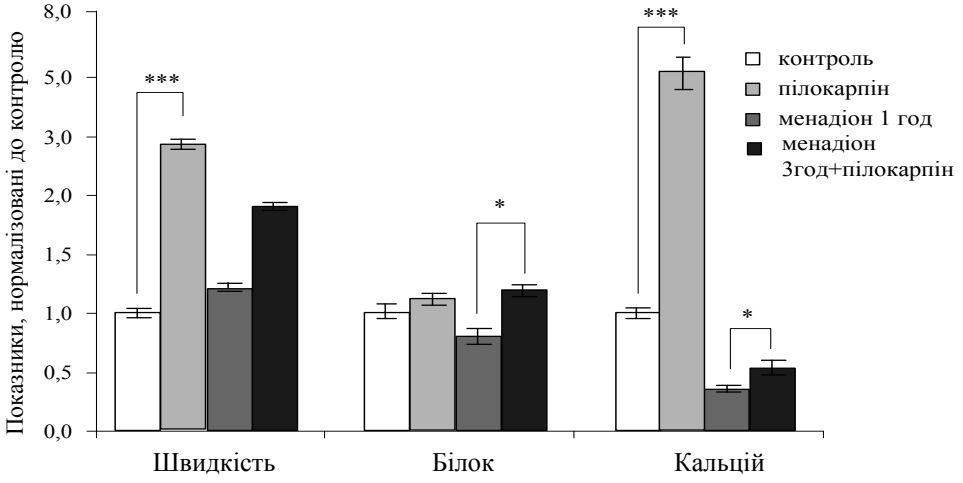

Рис. 3. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом пілокарпіну (2 мг/кг) на фоні менадіону (5 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

У наступній групі експериментів ми вивчали ефект внутрішньоочеревинної ін'єкції менадіону (10 мкмоль/л) на параметри слиновиділення підщелепною слинною залозою. З метою дослідити пролонгованість ефектів менадіону здійснювали його хронічне введення (ін'єкцію менадіону проводили кожні 3 дні). Схема досліду передбачала, що кожного разу внутрішньоочеревинній ін'єкції менадіону передував відбір нестимульованої слини. Одержані дані свідчать, що через 3 дні після першої ін'єкції менадіону відбувалося зростання швидкості нестимульованого слиновиділення в середньому на 186±33% (n=5, p<0,05, рис. 4), зменшення концентрації білка у слині в середньому на 60±9% (n=5, p<0,01, рис. 4) та зростання концентрації кальцію у секретованій слині в середньому на 146±47% (n=5, p<0,05, рис. 4) порівняно з контролем.

Після другої ін'єкції менадіону (6 доба) відбувалося зростання швидкості нестимульованого слиновиділення на 85±15% (n=5, p<0,05, рис. 4) порівняно з контролем та її зменшення на 51±9% (n=5, p<0,05, рис. 4) порівняно з ефектом менадіону після першої ін'єкції. При цьому ми спостерігали зменшення концентрації білка у слині на 49±12% (n=5, p<0,05, рис. 4) щодо контролю та відсутність достовірних змін даного показника щодо ефекту менадіону після першого його введення. За таких умов концентрація кальцію у секретованій слині зростала на 130±25% (n=5, p<0,05, рис. 4) порівняно з контролем і зменшувалася порівняно з ефектом менадіону після першої його ін'єкції на 116±3% (n=5, p<0,01, рис. 4). Однак після третьої (9 день) ін'єкції менадіону ми спостерігали достовірне зменшення швидкості слиновиділення 14±2% (n=5, p<0,01, рис, 4) до контролю та на 117±3% (n=5, p<0,01, рис. 4) порівняно з ефектом менадіону після другого його введення. За таких умов відбувалося зменшення концентрації кальцію у секретованій слині на 16±3% (n=5, p<0,01, рис. 4) порівняно з контролем і на 116±30% (n=5, p<0,05, рис. 4) порівняно з ефектом менадіону при попередньому його введені. За даних умов ми не спостерігали достовірних змін концентрації білка порівняно з ефектом менадіону на 6-ту добу, проте даний показник зменшувався на 52±3% (n=5, p<0,01, рис. 4) порівняно з контролем.

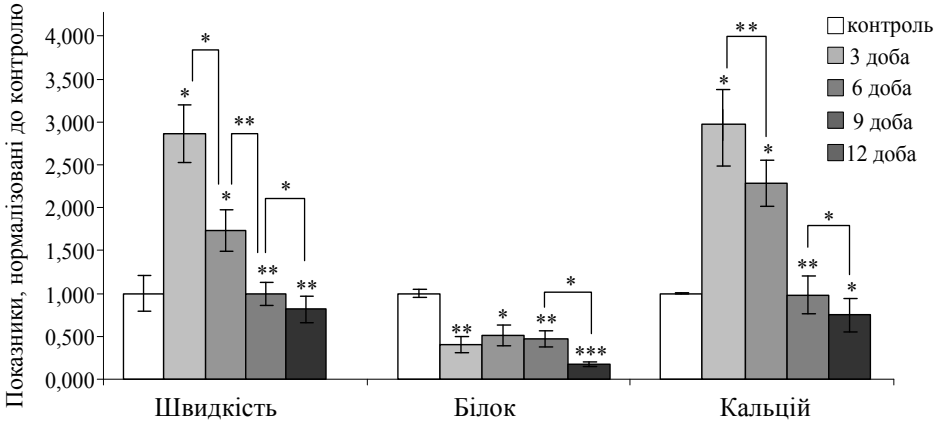

Рис. 4. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом менадіону (10 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

З рис. 4 видно, що подібна тенденція спостерігалася після четвертої ін'єкції менадіону (12-та доба). Тобто одержані дані свідчать, що збільшення концентрації менадіону призводить до того, що стабілізація його ефектів на досліджувані параметри слиновиділення спостерігається значно пізніше, ніж у разі введення 5 мкмоль/л (3 доба порівняно з 12-ю добою див. рис. 1 і 4).

Для дослідження ефекту хронічного введення менадіону на агоніст-стимульоване слиновиділення у подальшій серії експериментів тваринам проводили ін'єкції менадіону (10 мкмоль/л) що три доби. Відбір слини проводили на 18-ту добу, після чого тваринам вводили пілокарпін (2 мг/кг). Нами показано, що на 18-ту добу після хронічного введення менадіону стимулюючий ефект пілокарпіну становив 455±33% (n=5, p<0,05, рис. 5) на швидкість слиновиділення, при цьому концентрація білка у слині достовірно не змінювалась, та 85±17% (n=5, p<0,05, рис. 5) на концентрацію кальцію у слині порівняно зі стимулюючим ефектом пілокарпіну у контролі. З іншого боку, ми показали, що пілокарпін-стимульована швидкість слиновиділення на 18-й день після введення менадіону в середньому зростала у 13 разів (n=5, p<0,01, рис. 5) щодо нестимульованого менадіонового слиновиділення. За таких умов концентрація білка у секретованій слині достовірно не змінювалася. Концентрація кальцію у слині зростала у 3,5 разу (n=5, p<0,001, рис. 5) порівняно з нестимульованим менадіоновим контролем.

Таким чином, менадіон у концентрації 10 мкмоль/л (як і у випадку ін'єкції тваринам 5 мкмоль/л менадіону) призводив до зменшення стимулюючого ефекту пілокарпіну. На основі отриманих результатів можна висловити припущення, що введення тваринам менадіону призводить до порушення перебігу принаймні однієї з ланок М-

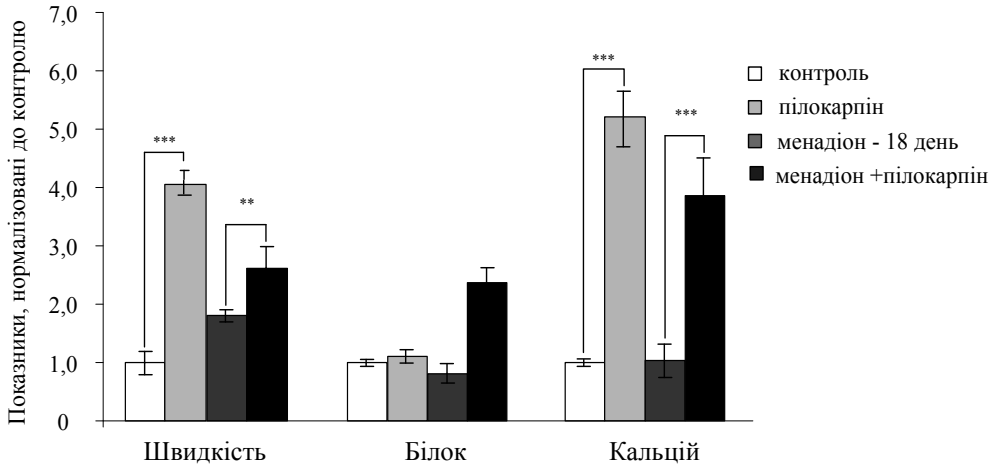

Рис. 5. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом пілокарпіну (2 мг/кг) на фоні менадіону (10 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

холінорецептор → кальцієва сигналізація у цитоплазмі → кальцієва сигналізація у внутрішньоклітинних кальцієвих депо → секреція рідинного та ферментного складу слини.

У наступній групі експериментів ми вивчали ефект введення менадіону у концентрації 50 мкмоль/л на функціональні відповіді досліджуваних клітин.

Через 1 год після ін'єкції менадіону у концентрації 50 мкмоль/л ми спостерігати зростання швидкості нестимульованого слиновиділення на 35±5% (n=5, p<0,01, рис. 6), зменшення концентрації білка в середньому на 36±3% (n=5, p<0,001, рис. 6) і зростання концентрації кальцію у секретованій слині в середньому на 121±3% (n=5, p<0,001, рис. 6) щодо нестимульованого контролю.

Тобто викликані менадіоном зміни показників слиновиділення, які спостерігалися через 1 год після ін'єкції, були подібними до ефектів, викликаних менадіоном 5 мкмоль/л, що підтверджує нашу гіпотезу про однонаправленість дії менадіону та на високу чутливість до даної речовини підщелепної слинної залози. З іншого боку, ми з'ясували, що через три години після введення тваринам менадіону спостерігалося драматичне зменшення швидкості слиновиділення, яке становило 70±2% (n=5, p<0,001, рис. 6) порівняно з контролем та 78±2% (n=5, p<0,001, рис. 6) до ефекту менадіону через 1 год після ін'єкції. При цьому ми спостерігали незначне, але достовірне зменшення концентрації білка у секретованій слині – 22±6% (n=5, p<0,05, рис. 6) порівняно з контролем. Ми з'ясували, що через три години після введення тваринам менадіону спостерігалося драматичне зменшення концентрації кальцію у секретованій слині, яке становило 89±3% (n=5, p<0,001, рис. 6) порівно з контролем та 95±2% (n=5, p<0,001, рис. 6) до ефекту менадіону через 1 год після ін'єкції. Таким чином, менадіон у високих концентраціях викликає найбільш виражений ефект на секрецію рідинного й електролітного компонентів слини. Такий ефект проявляється вже на ранніх стадіях після введення менадіону (3 год), хоча при введенні менадіону у нижчих концентраціях аналогічного ха-

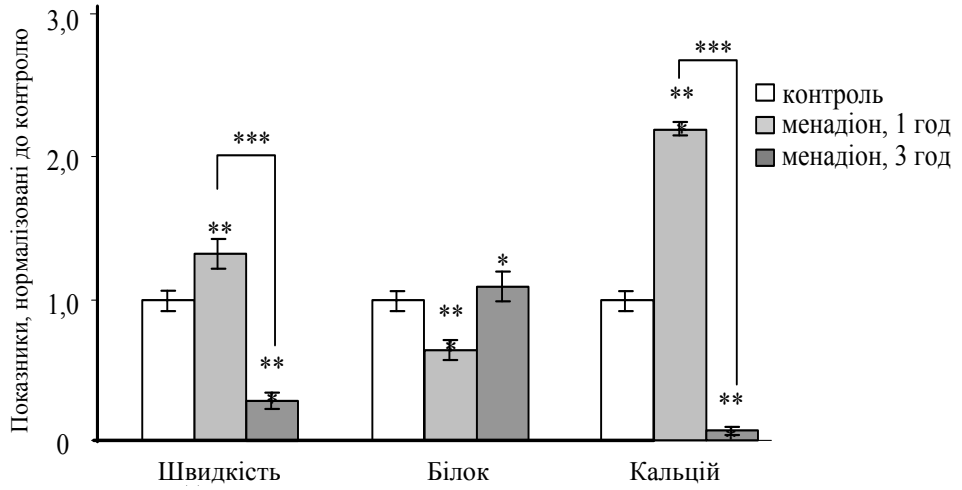

Рис. 6. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів під впливом менадіону (50 мкмоль/л). Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

рактеру зміни ми спостерігали. Оскільки зміни концентрації білка у секретованій слині у даній серії експериментів були найменш виражені, ми припускаємо, що ймовірно через 3 год після введення, незалежно від дози менадіону, не спостерігається істотних порушень внутрішньоретикулярного кальцієвого гомеостазу.

З метою з'ясувати, чи виявлені нами ефекти менадіону на параметри слиновиділення зумовлені прямим пошкоджуючим ефектом на функціонування залози, чи додатковими механізмами, вводили менадіон (10 мкмоль/л) безпосередньо у кожну часточку залози. Для цього після наркотизування тварин тактильно відшукували часточки залози і вводили менадіон. Ін'єкцію проводили кожні три доби. Отримані дані свідчать, що на третю добу після першої ін'єкції менадіону швидкість слиновиділення та концентрація кальцію збільшилися на 90±8% (n=5, p<0,05, рис. 7) та 122±40% (n=5, p<0,05, рис. 7) відповідно порівняно з контролем. При цьому концентрація білка у секретованій слині достовірно не змінювалась.

На 6-ту добу ми спостерігали зростання швидкості слиновиділення порівняно з контролем на 110±9% (n=5, p<0,05, рис. 7) та на 10±1% (n=5, p<0,05, рис. 7) щодо ефекту менадіону, зумовленого першим його введенням. Вміст білка при цьому зростав у середньому на 67±8% (n=5, p<0,05, рис. 7) порівняно з контролем та на 140±37% (n=5, p<0,05, рис. 7) щодо даних, отриманих після першої ін'єкції менадіону. Концентрація кальцію у досліджуваній слині на 6-ту добу зростала в середньому на 85±25% (n=5, p>0,05, рис. 7) щодо контрольних значень і не зазнавала достовірних змін порівняно з ефектом першої ін'єкції менадіону. На 9-ту добу ми спостерігали зростання швидкості слиновиділення на 56±2% (n=5, p<0,05, рис. 7) щодо контролю та зменшення цього показника на 24±3% (n=5, p>0,05, рис. 7) порівняно з ефектом менадіону після другої його ін'єкції. Концентрація секретованого білка у слині зростала щодо контролю на 30±4% (n=5, p<0,05, рис. 7) та не зазнавала достовірних змін порівняно з даними, отриманими

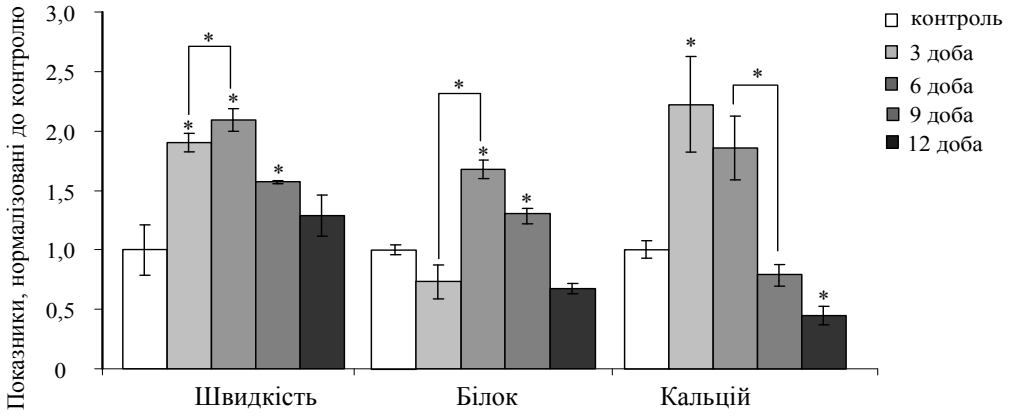

Рис. 7. Зміни показників слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів за умов ін'єкції менадіону (10 мкмоль/л) в кожну часточку залози. Експерименти проведені *in vivo* на наркотизованих тваринах (n=5). За віссю показники нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем. Стовпчики, з'єднані лініями, вказують на достовірність змін між окремими ефектами менадіону.

після другої ін'єкції менадіону. Концентрація кальцію у досліджуваній слині на 9-ту добу не відрізнялася від значень контролю, проте достовірно зменшувалася порівняно з ефектом менадіону при його попередньому введенні в середньому на 55±8% (n=5, p<0,05, рис. 7). На 12-ту добу ми не спостерігали достовірних змін швидкості слиновиділення ні порівняно з контролем, ні порівняно зі значеннями, отриманими при введенні менадіону на 9-ту добу. За аналогічною тенденцією змінювалася концентрація білка у секретованій слині. Зменшення концентрації кальцію у слині на 12-ту добу спостерігалося порівняно з контролем на 54±7% (n=5, p<0,05, рис. 7). При порівняні цих даних до ефекту менадіону після його ін'єкції на 9-ту добу достовірних змін концентрації кальцію не спостерігалось. Таким чином, зміни параметрів слиновиділення, викликаних введенням менадіону безпосередньо у тканину залози, були аналогічними до таких, викликаних його внутрішньоочеревинним введенням.

Вплив менадіону на сумарний вміст кальцію та секрецію білка *in vitro*. Для перевірки нашого припущення про порушення під впливом менадіону внутрішньоклітинних механізмів, які підтримують внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію у стані спокою та стимуляції М-холінорецепторів, нами було проведено інкубацію ацинарних клітин у зовнішньоклітинному розчині з менадіоном і без. Нами показано, що після 10 хв інкубування ізольованих ацинарних клітин з менадіоном (10 мкмоль/л) у кальційвмісному зовнішньоклітинному середовищі відбувалося зменшення сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах у середньому на 35±9% (n=6, p<0,01, рис. 8,*А*).

Збільшення тривалості інкубації клітин з менадіоном до 30 хв призводило до більш вираженого зменшення вмісту кальцію, яке становило 47±7% (n=5, p<0,01, рис. 8,*А*). Крім того, нами встановлено, що інкубування ацинарних клітин з менадіоном (10 мкмоль/л) у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині з ЕГТА (1 ммоль/л) протягом 30 хв викликало зменшення сумарного вмісту кальцію в середньому на 65±7% (n=5, p<0,001, рис. 8, *Б*) порівняно з контролем. Таким чином, менадіон викликав зменшення сумарного вмісту кальцію у досліджуваних клітинах практично однаковою мірою за умов як кальційвмісного, так і безкальцієвого середовища. Останнє дає нам змогу зробити висновок про те, що менадіон-індукований апоптоз супроводжується змен-

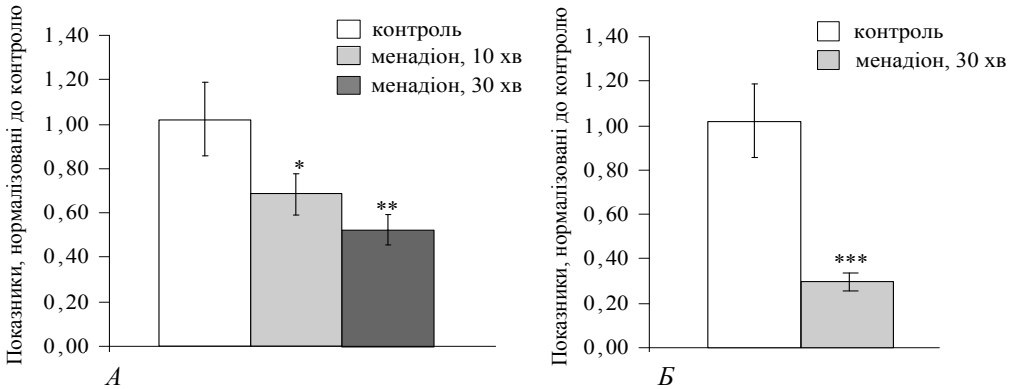

Рис. 8. Зміни концентрації сумарного кальцію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози за умов інкубації у зовнішньоклітинному кальційвмісному розчині (*А*) та безкальцієвому розчині (*Б*) з менадіоном (10 мкмоль/л). За віссю показники, нормалізовані до контролю. * – p<0,05; ** – p<0,01;*** – p<0,001. Зірочками вказано рівень достовірності змін порівняно з контролем.

шенням вивільнення кальцію із ендоплазматичного ретикулуму, як це було показано для панкреацитів [18].

Вплив менадіону на внутрішню структуру ацинарних клітин підщелепної слинної залози. Додаткове свідчення ролі мітохондрій у менадіон-індукованих змінах функціонування ацинарних клітин підщелепної слинної залози ми отримали з використанням методу електронної мікроскопії [3]. На рис. 9 представлено електронно-мікроскопічні зображення ультраструктури ацинарних клітин (мітохондріальна фракція) у контролі та після інкубування клітин із менадіоном *in vitro*. Як видно із рис. 9, *А* в ацинарних клітинах є мітохондрії овальної форми, які розташовані переважно у базолатеральній частині клітин. Довжина мітохондрій становить від 375 нм до 1000 нм (n=6). За контрольних умов у мітохондріях добре розвинені кристи, що свідчить про нормальний функціональний стан цих органел. Ми показали, що інкубування ацинарних клітин підщелепної слинної залози у зовнішньоклітинному розчині з менадіоном призводило як до змін стану самих мітохондрій, так і до змін їхньої форми (рис. 9, *Б*, *В*, *Г*). Як видно з рис. 9, після дії менадіону мітохондрії мають менший розмір (від 120 до 240 нм, n=6). Крім цього зменшується кількість крист, які, у свою чергу, не мають чітких обрисів.

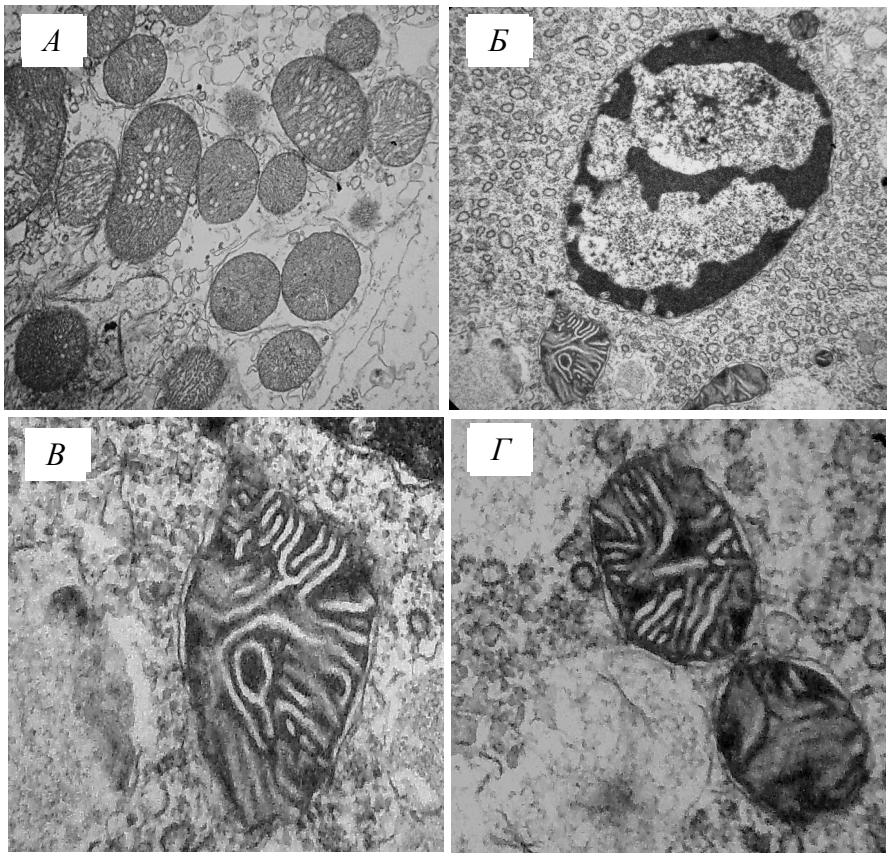

Рис. 9. Електронна мікрофотографія мітохондрій ацинарних клітин підщелепної слинної залози за умов інкубації у зовнішньоклітинному розчині без менадіону (*А*) та з менадіоном (*Б*, *В*, *Г*). Збільшення 4 000 разів.

Слід зауважити, що цитоплазма у таких клітин сильно вакуолізована. Такі морфологічні та функціональні зміни мітохондрій пояснюють тим, що активатори мітохондріальної пори перехідного проникнення, в тому числі і кальцій, спричиняють набрякання мітохондрій, розрив внутрішньомітохондріальної мембрани та вихід у цитоплазму проапоптичних сполук [12, 17].

Таким чином, виявлені нами зміни слиновиділення свідчать про високу чутливість функціональної активності клітин підщелепної слинної залози до ROS-індукуючих агентів, зокрема менадіону. Крім того, ми показали, що в основі порушення слиновиділльної функції при дії менадіону, найбільш ймовірно, лежать зміни перебігу процесів внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації (як агоніст-індукованої, так і за умов нестимульованого слиновиділення). Ми постулюємо, що в основі виявлених змін слиновиділення та кальцієвого гомеостазу лежить порушення кальцій-транспортних функцій мітохондрій і відповідно посилення вивільнення кальцію із мітохондрій, що супроводжується кальцієвим перевантаженням секреторних клітин і пригніченням секреції білково-електролітного складу слини. Останнє підтверджується даними електронно-мікроскопічного аналізу внутрішньої структури мітохондрій, який показав істотні морфологічні зміни структури мітохондрій після дії менадіону.

1. *Копач О., Федірко Н.* Кальцій-залежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз у разі дії агоністів холінергічної природи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 37. С. 205–212.
2. *Гричан Н., Федірко Н.* Роль пуринорецепторів у регуляції слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів // Експеримент. та клін. фізіол. і біохім. 2008. № 1. С. 11–22.
3. *Викли Б.* Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 323 с.
4. *Ambudkar I.* Regulation of calcium in salivary gland secretion // Crit Rev. Oral. Biol. Med. 2000. N 11. P. 4–25.
5. *Anderson L., Suleiman A., Garrett J.* Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland // Microsc. Res. Tech. 1994. N 27. P. 61–70.
6. *Berridge M.* Microdomains and elemental events in calcium signalling // Cell Calcium. 1996. N 20. P. 95–96.
7. *Brooks A. C., Whelan C. J., Purcell W. M.* Reactive oxygen species generation by mast cells in response to substance P: A NK_1-receptor-mediated event // Br. J. Pharmacol. 1999. Vol. 128. P. 585–590.
8. *Budd S., Nicholls D.* Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells // J. Neurochem. 1996. N 67. P. 2282–2291.
9. *Cadenas E., Davies K.* Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging // Free Radical Biol. & Med. 2000. Vol. 29. P. 222–230.
10. *Carafoli E.* Calcium signaling: a tale for all seasons // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. N 99. P. 1115–1122.
11. *Castilho R. F., Hansson O., Ward M. W.* et al. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells // J. Neurosci. 1998. N 18. P. 10277–10286.
12. *Chernyak B., Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 238. P. 623–630.

13. *Chiou T., Chu S., Tzeng W.* Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation // Toxycolgy. 2003. Vol. 191. N 2–3. P. 77–88.
14. *Chlebowski R., Akman S., Block J. B.* Vitamin K in the treatment of cancer // Cancer Treat Rev**.** 1985. Vol. 12. N 1. P. 49–63.
15. *Culp D., Luo W., Richardson L.* et al. Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini // Am. J. Physiol. 1996. Vol. 271. N 6. P. 1963–1972.
16. *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.
17. *Ferri K., Kroemer G.* Mitochondria-the suicide organelles // BioEssays. 2001. Vol. 23. P. 111–115.
18. *Gerasimenko J., Gerasimenko O., Palejwala A.* et al. Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca^{2+} elevations and the mitochondrial permeability transition pore *// J. Cell Science. 2002*. Vol. 115. P. 485–497.
19. *Guérin-Marchand C., Sénéchal H., Pelletier C.* et al. H_2O_2 impairs inflammatory mediator release from immunologically stimulated RBL-2H3 cells through a redox-sensitive, calcium-dependent mechanism // Inflamm. Res. 2001. N 50. P. 341–349.
20. *Kawamura F., Hirashima N., Furuno T., Nakanishi M.* Effects of 2-Methyl-1,4-naphtoquinone (Menadione) on Cellular Signaling in RBL-2H3 Cells // Biol. Pharm. Bull. 2006. Vol. 29. N 4. P. 605–606.
21. *Kruglikov I., Gryshchenko O., Shutov L.* et al. Diabetes-induced abnormalities in ER calcium mobilization in primary and secondary nociceptive neurons // Pflugers Arch. 2004. Vol. 448. N 4. P. 395–401.
22. *Leist M., Nicotera P.* Calcium and neuronal death // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1998. N 132. P. 79–125.
23. *Liu X., Kim C., Yang J.* et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c // Cell. 1996. Vol. 86. P. 147–157.
24. *Lodish H., Kong N.* Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum // J. Biol. Chem. 1990. N 265. P. 10893–10899.
25. *Mehendale H., Svensson S., Baldi C., Orrenius S.* Accumulation of Ca^{2+} induced by cytotoxic levels of menadione in the isolated, perfused rat liver // Europ. J. Biochem. 1985. Vol. 149. P. 201–206.
26. *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.
27. *Petersen O.* Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. N 52. P. 40485–40492.
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. *Prasad K., Edwards-Prasad J., Sakamoto A.* Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture // Life Sci. 1981. Vol. 29. N 13. P. 1387–1392.
30. *Reynolds E.* The use of lead citrate at high pH as electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. N 17. P. 208–212.
31. *Stegeman C.* Oral manifestations of diabetes // Home. Healthc. Nurse. 2005. N 23. P. 233–240.

32. *Tymianski M., Charlton M., Carlen P., Tator C.* Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons // J. Neurosci. 1993. N 13. P. 2085–2104.
33. *Voitenko N., Potapenko Ie., Shyshkin O.* Changes of intracellular calcium-regulating mechanisms of primary and secondary sensory neurones in periferal inflammation // Fiziol Zh. 2004. Vol. 50. N 4. P. 33–41.
34. *Wolfreys K., Oliviera D.* Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function // Eur. J. Immunol. 1997. Vol. 27. P. 297–306.
35. *Zachariasen R.* Oral components of Sjogren's syndrome // J. Gt. Houst. Dent. Soc. 1996. N 68. P. 19–21.

CA^{2+}- DEPENDENT MECHANISM OF DYSFUNCTION OF SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND UNDER CONDITIONS OF MENADIONE-INDUCED APOPTOSIS

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

**Ivan Franko National University of Lviv*
4, Hrushevskyi 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

We showed that initial effect of menadion includes potentiation of salivation rate, secretion of proteins and calcium. However, increasing the time or number of intraperitoneal injections of menadione (5, 10, and 50 μM) dramatic decrease of protein and calcium concentration in secreted saliva. On the other hand, in the presence of menadione, activation of M-cholinoreceptors leads to increase in the salivation rate and proteine secretion but this stimulating effect was much less pronounced compare to control. We also showed the ability of menadione to decrease of total cellular calcium content both in calcium containing and calcium-free media. Taking together these data allow us to conclude that menadion-induced changes in functioning of submandibular salivary gland are mediated by changes in the intracellular calcium homeostasis and involve alteration of M-cholinoreceptor function. Electron-microscopic analysis of inner structure of acinar cells showed substantial disturbance of mitochondrial membrane structure that may be due to development of calcium overloaded. We suggest that changes in mitochondria morpho-functional state underlies the calcium -dependent nature of menadione-induced salivary cell disfunction.

Key words: submandibular salivary gland, saliva, Ca^{2+}-homeostasis, manadione, apoptosis.

Стаття надійшла до редколегії 27.05.08
Прийнята до друку 09.06.08