

УДК 612.3: 591.413.2

ЗМІНИ ВМІСТУ МЕМБРАНОВ'ЯЗАНОГО Ca^{2+} У ТКАНИНІ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЗА ДІЇ АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ І СУРАМІНУ**О. Великопольська, В. Мерлавський, В. Манько***Львівський національний університет імені Івана Франка**вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна**e-mail: vvmanko@franko.lviv.ua*

Внаслідок додавання АТФ і АДФ до номінально безкальцієвого середовища інкубації вміст мембранозв'язаного Ca^{2+} у тканині слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. зменшується, а до гіперкальцієвого середовища – навпаки, збільшується. Причому АДФ-індуковані зміни в обох випадках є суттєвішими, ніж АТФ-індуковані. Додавання нуклеотидів до середовища з фізіологічною концентрацією Ca^{2+} не спричиняє змін вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} . При додаванні до номінально безкальцієвого середовища сураміну стимульоване аденіловими нуклеотидами зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} було відсутнім, тому це зменшення справді опосередковується активацією P2Y-рецепторів. Аналогічно, сурамін у гіперкальцієвому середовищі запобігає АТФ- і АДФ-індукованому збільшенню вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} , що розцінюється як доведення наявності P2X-рецепторів. Крім того, сурамін сам по собі спричиняє певне збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} , яке залежить від позаклітинної концентрації цього катіона і зумовлене, мабуть, пригніченням ектонуклеотидази.

Ключові слова: АТФ, АДФ, сурамін, P2X-рецептори, P2Y-рецептори, слинні залози.

Значна кількість фізіологічних процесів різних типів клітин регулюється за участю катіонів Ca^{2+} [4, 5, 8, 9, 12, 17]. У тому числі транспортування Ca^{2+} через плазматичну і внутрішньоклітинні мембрани є надзвичайно важливим для перебігу секреторного процесу [1–3, 13, 24, 30, 31]. Але послідовність процесів, що призводять до активації катіонами Ca^{2+} секреторного процесу, зокрема його завершального етапу – екзоцитозу, ще не до кінця досліджена. Причиною цього є різноманітність травних залоз і труднощі, пов'язані з реєструванням функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем клітинних мембран.

Травні залози поділяють на одно-, мало- та багатоклітинні. Досить детально є вивченими Ca^{2+} -транспортувальні системи секреторних клітин багатоклітинних залоз ссавців, зокрема таких, як великі слинні [11, 25, 26, 38] та підшлункова [16, 29, 31] залози. На відміну від цього, Ca^{2+} -транспортувальні системи секреторних клітин малоклітинних залоз двокрилих, які здатні секретувати декілька речовин, вивчені недостатньо.

Вагомі здобутки у дослідженні Ca^{2+} -сигналізації були отримані на слинних залозах мухи *Calliphora* [39, 40, 41]. Зокрема, встановлено, що Ca^{2+} -осциляції у цих секреторних клітинах запускаються серотоніном. Ще одним об'єктом, який здавна використовують у фізіологічних дослідженнях, є слинні залози личинок комарів-дергунів *Chironomus* [3, 10, 19, 27]. У секреторних клітинах цих залоз ідентифіковано і досліджено властивості потенціалкероаних Ca^{2+} -каналів, Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму, Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій, ІФ₃-чутливих та ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів (детальніше див. [7]). Постулюється також, що роль первинного посередника у малоклітинних залозах може відігравати АТФ, оскі-

льки в їхній тканині під впливом аденілових нуклеотидів зареєстровано зміни вмісту Ca^{2+} , які свідчать про наявність P2X- та P2Y-рецепторів [6].

У сучасній науковій літературі є велика кількість даних, які свідчать про важливість пуринових рецепторів у функціонуванні різних типів клітин. Численні біологічні ефекти, спричинені дією пуринів і піримідинів, було показано на різних рівнях організації – від клітин до цілісного організму: скорочення скелетних м'язів [32], вивільнення нейротрансмітерів і синаптична передача у нервовій системі [15, 23], агрегація тромбоцитів, модуляція імунних відповідей і запалення [33, 34], болю [15], серцево-судинних функцій [14], а також посилення екзокринної та ендокринної секреції [18].

У теперішній час постала проблема відсутності специфічних блокаторів для ідентифікації підтипів пуринових рецепторів. Ускладнюється це тим, що тримерні P2X-рецептори ссавців характеризуються значною гетерогенністю. Тим не менше, дослідження впливу різних блокаторів може надати корисну інформацію про специфічний внесок різних субодиниць у фармакологічні властивості рецепторного гетеромера. Відомим блокатором P2-рецепторів є похідне трипанового синього сурамін, 8-(3-бензамідо-4-метилбензамідо)-нафтален-1,3,5-трисульфонова кислота, який однаково діє на обидва типи рецепторів [21, 32]. Блокування є концентраційно-залежним [28, 35] і зворотним [37]. Тому нашою метою було дослідження властивостей P2-рецепторів плазматичної мембрани секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна на основі чутливості до агоністів (АТФ, АДФ) і цього блокатора.

Дослідження проведені на інтактних секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. Про функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин судили за зміною вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} . Вміст Ca^{2+} у клітинних мембранах залежить від їхньої концентрації у середовищах, що контактують з цими мембранами. Оскільки вміст цитозольного Ca^{2+} значно нижчий, ніж депонованого Ca^{2+} , то можна вважати, що зміни вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} відображають, перш за все, його зміни у внутрішньоклітинних депо.



Рис. 1. Фотографія нижньої частки слинної залози личинки комара-дергуна, обробленої хлортетрацикліном, за $\lambda_{\text{збуд.}} = 380$ нм.

Залози препарували за допомогою мікрохірургічних інструментів під бінокулярним мікроскопом МБС-1 у краплині вихідного позаклітинного розчину й інкубували протягом 15 хв у відповідному дослідному розчині. Після цього залози 15 хв фарбували хлортетрацикліном (10 мкмоль/л), який додавали до розчину інкубації.

Після відмивання залоз від барвника вихідним позаклітинним розчином визначали інтенсивність флуоресценції за довжини збуджуючого світла ($\lambda_{\text{збуд.}}$) 380 нм. Флуоресценцію реєстрували за $\lambda_{\text{ф.}}$ 480–530 нм, використовуючи мікроскоп ЛЮМАМ-И 1 (Росія), при збільшенні 10×15 з діаметром щілини 0,1 мм (рис. 1).

Вихідний позаклітинний розчин мав такий склад, ммоль/л: NaCl – 136,90, KCl – 5,36, CaCl_2 – 1,76, Na_2HPO_4 – 0,35, KH_2PO_4 –

0,44, MgCl_2 – 0,88, глюкоза – 5,55; рН 7,2. Для дослідження впливу АТФ і АДФ на вміст мембранозв'язаного Ca^{2+} ми додавали їх до позаклітинного розчину в концентрації 100 мкмоль/л. Концентрація антагоніста Р2-рецепторів, сураміну, становила 100 мкмоль/л. Залежно від завдання, ми модифікували позаклітинний розчин: недодавали Ca^{2+} , створюючи номінально безкальцієве середовище, або збільшували його концентрацію до 10 ммоль/л. Необхідні статистичні обрахунки проводили з використанням програмного пакету для персональних комп'ютерів *Microsoft Office Excel*, достовірність різниці між двома статистичними групами встановлювали за Стьюдентом.

У результаті проведених досліджень ми встановили (рис. 2), що внаслідок додавання до номінально безкальцієвого середовища інкубації АТФ і АДФ вміст мембранозв'язаного Ca^{2+} зменшився на 23,85 та 47,05% відповідно. І, навпаки, дія АТФ і АДФ на плазматичну мембрану досліджуваних клітин, інкубованих у гіперкальцієвому середовищі, спричиняє збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} на 46,30 та 57,61%. Таким чином, АДФ-індуковані зміни в обох випадках є суттєвішими, ніж АТФ-індуковані. Додавання ж нуклеотидів до середовища з фізіологічною концентрацією Ca^{2+} (1,76 ммоль/л) статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} не спричиняє.

Отримані результати ми пояснюємо, виходячи з того, що активація Р2Y-рецепторів у більшості випадків спричиняє активацію фосфоліпази С і, відтак, утворення ІФ₃ та діацилгліцеролу [36]. ІФ₃, у свою чергу, активує внутрішньоклітинні ІФ₃-чутливі Ca^{2+} -канали. Завдяки цьому відбувається вивільнення цих іонів із внутрішньоклітинних депо у цитоплазму. Діацилгліцерол змінює, очевидно, проникність плазматичної мембрани для катіонів Ca^{2+} . Активація Р2X-рецепторів теж приводить до різкого підвищення вмісту Ca^{2+} у цитоплазмі клітини, але внаслідок надходження з позаклітинного середовища за градієнтом його концентрації [22].

Надходженням позаклітинного Ca^{2+} у секреторні клітини, інкубовані у номінально безкальцієвому середовищі, можна знехтувати. Тому у цьому випадку зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} , як і сумарного вмісту Ca^{2+} у тканині залоз [6], зумовле-

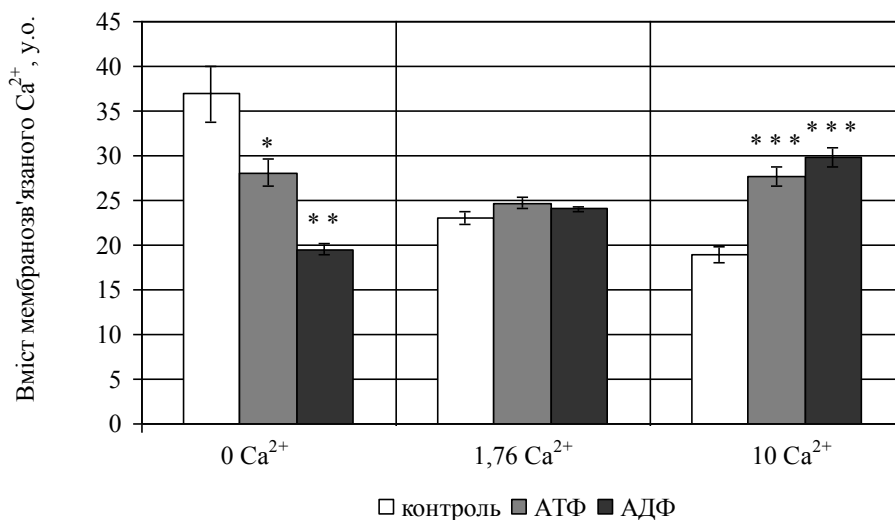


Рис. 2. Зміни вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} під впливом АТФ і АДФ за інкубування в номінально безкальцієвому середовищі: $[\text{Na}^+] = 136,9$ ммоль/л, $[\text{ATP}] = 100$ мкмоль/л, $[\text{ADP}] = 100$ мкмоль/л; тут і надалі * – різниця статистично достовірна щодо контролю $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; $n = 7-8$.

не активацією P2Y-рецепторів і, відповідно, IФ₃-чутливих Ca²⁺-каналів. Підвищення [Ca²⁺]_i сприяє активації Na⁺-Ca²⁺-обмінника і Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани – систем, які забезпечують виведення Ca²⁺ у позаклітинне середовище.

Збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ у секреторних клітинах слинних залоз, які інкубували у гіперкальцієвому середовищі, спричинене його надходженням у цитоплазму P2X-рецепторами та депонуванням. За цих умов активуються, зазвичай, і P2Y-рецептори, але оскільки кальцієвий концентраційний градієнт є значним, рівновага зміщена у бік депонування, а не вивільнення із депо.

За фізіологічного кальцієвого градієнта між надходженням позаклітинного Ca²⁺ (активацією P2X-рецепторів) та його вивільненням із внутрішньоклітинного депо (активацією P2Y-рецепторів) встановлюється динамічна рівновага, тому жодних статистично-достовірних змін ми не зареєстрували. Аналогічні дані були отримані нами і у попередніх дослідженнях, проведених з вимірюванням сумарного вмісту Ca²⁺ у тканині [6].

Після дії сураміну на мембрану секреторних клітин, інкубованих у номінально безкальцієвому середовищі, стимульоване аденіновими нуклеотидами зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ було відсутнім (рис. 3). Отже, це зменшення справді опосередковане активацією P2Y-рецепторів. Чим зумовлене певне збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺, спричинене АТФ за таких умов, ми наразі відповісти не можемо.

Аналогічно, додавання сураміну до гіперкальцієвого середовища запобігає АТФ- і АДФ-індукованому збільшенню вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ (рис. 4). Ми розцінюємо це як доведення наявності P2X-рецепторів на плазматичній мембрані досліджуваних клітин.

Слід також зазначити, що додавання сураміну до номінально безкальцієвого середовища само по собі спричиняє статистично достовірне (P≤0,05) збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ на 5,44% (див. рис. 3). За збільшеної до 10 ммоль/л [Ca²⁺] це збільшення становило 16,82% (P≤0,001; див. рис. 4). Отже, ефект сураміну залежить від позаклітинної [Ca²⁺]. Відомо, що ця речовина не лише пригнічує P2-рецептори, але і є

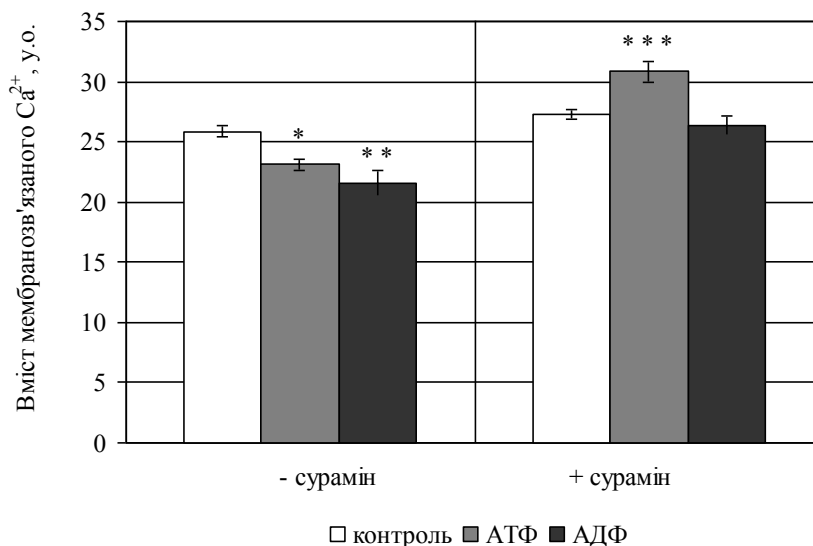


Рис. 3. Залежність АТФ- і АДФ-індукованих змін вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ від наявності сураміну в номінально безкальцієвому середовищі: [Ca²⁺]=0 ммоль/л, [Na⁺]=136,9 ммоль/л, [АТФ]=100 мкмоль/л, [АДФ]=100 мкмоль/л, [сурамін]=100 мкмоль/л; n=11–29.

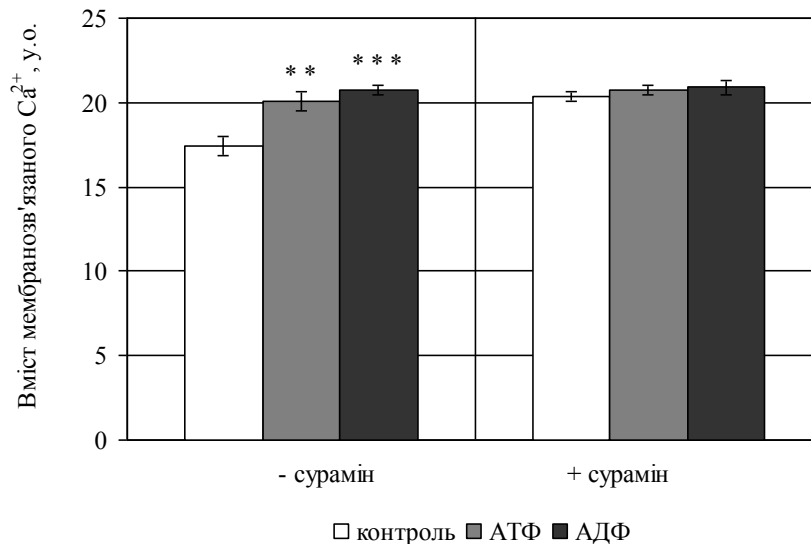


Рис. 4. АТФ- і АДФ-індуковані зміни вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} за відсутності та наявності сураміну в гіперкальцієвому середовищі: $[\text{Ca}^{2+}] = 10$ ммоль/л, $[\text{Na}^+] = 136,9$ ммоль/л, $[\text{АТФ}] = 100$ мкмоль/л, $[\text{АДФ}] = 100$ мкмоль/л, $[\text{сурамін}] = 100$ мкмоль/л; $n = 7-18$.

інгібітором ектонуклеотидази [32]. Пригнічення ектонуклеотидази повинно спричинити збільшення концентрації ендогенних три- і динуклеотидів, які можуть потрапляти у позаклітинне середовище з нервових закінчень чи внаслідок деградації клітин [32], і, тим самим, призвести до активації P2-рецепторів.

Таким чином, у результаті проведених досліджень ми отримали переконливі докази наявності P2X- та P2Y-рецепторів на плазматичній мембрані секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*.

1. Гриньків М. Я., Клевець М. Ю., Шостаковская И. В. Роль кальція в екструзії пшечварительных ферментов ацинарними клетками поджелудочной железы // Физиол. журн. 1988. Т. 34. № 4. С. 13–17.
2. Дубицький Л. О. Енергозалежні Ca^{2+} -транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз та механізми взаємодії їх з катіонами металів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 39 с.
3. Клевець М. Ю. Електричні властивості секреторних клітин травних залоз і механізми екструзії їх ферментів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 1993. 40 с.
4. Костерин С. А. Транспорт кальція в гладких м'язках. К.: Наук. думка, 1990. 216 с.
5. Костюк П. Г. Кальцій и клеточная возбудимость. М.: Наука, 1986. 255 с.
6. Манько В., Великопольська О. Ідентифікація пуринових рецепторів у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2005. Вип. 40. С. 134–139.
7. Манько В. В. Системи трансмембранного транспортування кальцію у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* Linnaeus: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2008. 44 с.
8. Пидопличко В. И., Верхратский А. Н. Электрофизиологические исследования одиночных клеток сердца. К.: Наук. думка, 1989. 240 с.
9. Рыбальченко В. К. Плазматическая мембрана гладкомышечной клетки: активный транспорт кальция, натрий-кальциевый обмен и реконструкция ионной проводимости: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1988. 50 с.

10. Туркевич Г. Б. Отсутствие ядерно-цитоплазматической разницы потенциалов в клетках слюнной железы хирономуса // Цитология. 1970. Т. 12. № 4. С. 495–504.
11. Федірко Н. В. Механізми підтримання кальцієвого гомеостазу в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 45 с.
12. Шуба М. Ф. Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения // Физиол. журн. 1981. Т. 27. № 4. С. 533–541.
13. Burgoyne R. D., Morgan A. Secretory granule exocytosis // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. N 2. P. 581–632.
14. Burnstock G., Kennedy C. Purinergic receptors in the cardiovascular system // *Prog. Pharmacol.* 1986. Vol. 6. P. 111–132.
15. Burnstock G., Wood J. N. Purinergic receptors: Their role in nociception and primary afferent neurotransmission // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. Vol. 6. P. 526–532.
16. Cancela J. M., Van Coppenolle F., Galione A. et al. Transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers // *EMBO J.* 2002. Vol. 21. N 5. P. 909–919.
17. Carafoli E., Santella L., Branca D., Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2001. Vol. 36. Is. 2. P. 107–260.
18. Chapal J., Hillare-Buys D., Bertrand G. et al. Purinergic receptors on insulin-secreting cells // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1994. Vol. 8. P. 117–127.
19. Cohen C. J. Characterization of the resting potential in *Chironomus* salivary gland cells // *Exp. Cell. Res.* 1977. Vol. 106. N 1. P. 15–30.
20. Dalzier H. H., Westfall D. P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: Subclassification, distribution and molecular characterization // *Pharmacol. Rev.* 1994. Vol. 46. P. 449–466.
21. Dunn P. M., Blakeley A. G. Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens // *Br. J. Pharmacol.* 1988. Vol. 93. N 2. P. 243–245.
22. Evants R. J., Supernant A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons // *Semin. Neurosci.* 1996. Vol. 8. P. 217–223.
23. Gordon J. L. Extracellular ATP: Effects, sources and fate // *Biochem. J.* 1986. Vol. 233. P. 309–319.
24. Hokin L. E. Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices // *Biochim. Biophys. Acta.* 1966. Vol. 115. N 1. P. 219–221.
25. Larina O., Thorn P. Ca^{2+} dynamics in salivary acinar cells: distinct morphology of the acinar lumen underlies near-synchronous global Ca^{2+} responses // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118. P. 4131–4139.
26. Liu X., Ambudkar I. S. Characteristics of a store-operated calcium-permeable channel. Sarcoplasmic reticulum calcium pump function controls channel gating // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. Is. 32. P. 29891–29898.
27. Loewenstein W. R., Nakas M., Socolar S. J. Junctional membrane uncoupling. Permeability transformations at a cell membrane junction // *J. Gen. Physiol.* 1967. Vol. 50. P. 1865–1891.
28. Nakazawa K., Inoue K., Fujimori K., Takanaka A. Effects of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat phaeochromocytoma cells // *Pflugers Arch.* 1991. Vol. 418. N 3. P. 214–219.
29. Park M. K., Lomax R. B., Tepikin A. V., Petersen O. H. Local uncaging of caged Ca^{2+} reveals distribution of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in pancreatic acinar cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. N 19. P. 10948–10953.
30. Petersen O. H. New aspects of cytosolic calcium signaling // *News Physiol. Sci.* 1996. N 11. P. 13–17.

31. *Petersen O. H., Ueda N.* Pancreatic acinar cells: the role of calcium in stimulus-secretion coupling // *J. Physiol.* 1976. Vol. 254. Is. 3. P. 583–606.
32. *Ralevic V., Burnstock G.* Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rew.* 1998. N 50. P. 413-492.
33. *Rolf M. G., Mahaut-Smith M. P.* Effects of enhanced P2X₁ receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets // *Thromb. Haemost.* 2002. Vol. 88. N 3. P. 495–502.
34. *Seifert R., Schultz G.* Involment of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uracil nucleotides // *Trends Pharmacol. Sci.* 1989. Vol. 10. P. 365–369.
35. *Suzuki E., Kessler M., Montgomery K., Arai A. C.* Divergent effects of the purinoceptor antagonists suramin and PPNDs on AMPA receptors // *Mol. Pharmacol.* 2004. Vol. 66. P. 1738–1747.
36. *Yang C. M., Wu W. B., Pan S. L. et al.* P2Y₂ receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilisation in tracheal epithelial cells // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2000. N 279. P. 235–241.
37. *Zhang Y. L., Keng Y. F., Zhao Y. et al.* Suramin Is an Active Site-directed, Reversible, and Tight-binding Inhibitor of Protein-tyrosine Phosphatases // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N 20. P. 12281–12287.
38. *Zhang X., Wen J., Bidasee K. R. et al.* Ryanodine receptor expression is associated with intracellular Ca²⁺ release in rat parotid acinar cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1997. Vol. 273. Is. 4. P. C1306–C1314.
39. *Zimmermann B., Walz B.* Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala* // *J. Physiol.* 1997. Vol. 500. Pt. 1. P. 17–28.
40. *Zimmermann B., Walz B.* The mechanism mediating regenerative intercellular Ca²⁺ waves in the blowfly salivary gland // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. P. 3222–3231.
41. *Zimmermann B.* Control of InsP₃-induced Ca²⁺ oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria // *J. Physiol.* 2000. Vol. 525. N 3. P. 707–719.

CHANGES OF MEMBRANEBOUND CA²⁺ CONTENT IN SALIVARY GLANDS TISSUE UNDER THE INFLUENCE OF ADENIL NUCLEOTIDES AND SURAMIN

O. Velykopolska, V. Merlavsky, V. Manko

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

As a result of ATP and ADP adding to nominal Ca²⁺-free incubatory medium membranebound Ca²⁺ content in *Chironomus plumosus* salivary glands tissue decreased, in case of hypercalcium medium effect was alternate. Moreover, ADP-induced changing is more marked, than ATP-induced in both cases. Nucleotide application into medium with physiological Ca²⁺-concentration doesn't cause membranebound Ca²⁺ content changes. After suramin application into nominal Ca²⁺-free medium decreasing of adenil nucleotides stimulated membranebound Ca²⁺-content was absent, therefore that changes actually mediated with P2Y-receptors activation. In a similar manner, suramin in hypercalcium medium prevents ATP- and ADP-induced membranebound Ca²⁺ content increasing, which regarding as P2X-receptors availability. Beside that, suramin in itself causes some membranebound Ca²⁺-content increasing, which depends on extracellular concentration of that cation and caused, perhaps, with ecto-nucleotidase inhibition.

Key words: ATP, ADP, suramin, P2X, P2Y, salivary glands.

Стаття надійшла до редколегії 27.05.08

Прийнята до друку 09.06.08