



УДК 617.764.1 : 577.352.45

Ca²⁺-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ЗОВНІШНЬООРБИТАЛЬНОЇ СЛЬОЗОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРА.

I. Ca²⁺-ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ

А. Б. Котлярова, В. В. Манько

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: annkotliarova@gmail.com*

Сльозові залози за іннервацією та спрямованістю ефектів, механізмом трансдукції первинних агоністів і секреції є подібними до великих слинних залоз. Проте, на відміну від останніх, про організацію Ca²⁺-сигналізації та вклад різних Ca²⁺-транспортувальних систем у підтримання Ca²⁺-гомеостазу в секреторних клітинах слюзових залоз відомо недостатньо. Метою роботи було дослідити роль Ca²⁺-помп плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму в підтриманні Ca²⁺-гомеостазу в секреторних клітинах слюзових залоз.

Дослідження проведено на інтактних і пермеабілізованих дигітоніном секреторних клітинах зовнішньoorбитальної слюзової залози щура. Про функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем судили за зміною вмісту Ca²⁺ у клітинах після їхньої інкубації з певними агоністами чи антагоністами, який визначали за допомогою металохромого барвника арсеназо III.

Встановлено, що у контролі вміст Ca²⁺ в інтактних і пермеабілізованих клітинах протягом часу інкубації (15 хв) зменшується. Це зменшення зумовлене порушенням функціонування Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму, яка з високою ефективністю інгібується еозином Y (10 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л).

Важливу роль у підтриманні Ca²⁺-гомеостазу досліджуваних секреторних клітин відіграє і Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани. Це підтверджується тим, що вміст Ca²⁺ у інтактних клітинах слюзових залоз щура практично не змінювався під впливом еозину Y у широкому діапазоні (5–20 мкмоль/л) концентрацій (на відміну від пермеабілізованих дигітоніном клітин). Крім того, еозин Y (5 мкмоль/л) запобігав часозалежному зменшенню вмісту Ca²⁺ в інтактних клітинах. В обох випадках інгібування Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани нівелює ефект пригнічення функціонування Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму.

Результати двофакторного дисперсійного аналізу підтвердили, що за відсутності у середовищі еозину Y як час інкубації, так і пермеабілізованість плазматичної мембрани суттєво впливають на вміст Ca²⁺ у клітинах. У той же час, за наявності еозину Y (5 мкмоль/л) на вміст Ca²⁺ вірогідно впливає лише пермеабілізованість

плазматичної мембрани. Адже у пермеабілізованих клітинах, як і за дії еозину Y у концентрації 5 мкмоль/л, Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани не забезпечує транспортування Ca^{2+} з клітини.

Ключові слова: еозин Y, Ca^{2+} -транспортувальні системи, Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани, Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулуму, сльозова залоза, секреторні клітини.

ВСТУП

Ca^{2+} -транспортувальні системи ацинарних клітин сльозових залоз, на відміну від великих слинних залоз, практично не досліджені. У літературі є лише розрізнені дані стосовно ідентифікації у секреторних клітинах сльозових залоз деяких Ca^{2+} -транспортувальних систем і їхніх властивостей. А системний аналіз особливостей їхнього функціонування та ролі у Ca^{2+} -сигналізації відсутній. Хоча за іннервацією та механізмом секреції вони подібні. Зокрема, обидва типи залоз іннервуються як парасимпатичною, так і симпатичною нервовими системами, здійснючи секрецію рідини і білкового компонента.

Спільним є і те, що медіатор парасимпатичної нервової системи ацетилхолін активує M_3 -холінорецептори плазматичної мембрани ацинарних клітин як сльозових залоз [34], так і слинних залоз [26, 30, 49], при цьому збільшується цитозольна концентрація Ca^{2+} за рахунок генерування IP_3 і активації IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулуму [16, 46]. Як наслідок, відбувається активація Ca^{2+} -чутливих Cl^- -каналів плазматичної мембрани апікального полюса, Cl^- дифундує в порожнину ацинуса, а за ним міжклітинниками відбувається транспорт Na^+ . Це збільшує осмотичність позаклітинного середовища, тому вода транспортується у цьому ж напрямку [36, 48].

Медіатор симпатичної нервової системи норадреналін активує α_1 - і β_1 -адренорецептори на плазматичній мембрані ацинарних клітин обох типів залоз [15, 18, 50], що супроводжується, відповідно, вивільненням Ca^{2+} із IP_3 -чутливого депо та збільшенням рівня цАМФ і є необхідним для запуску екзоцитозу білків [24, 35, 43]. Встановлено також, що пілокарпін-індуковане сльозовиділення гальмується норадреналіном [25]. Подразнення ж симпатичних нервів слинних залоз зменшує пілокарпін-стимульоване слиновиділення внаслідок вазоконстрикції [39].

Але про роль інших Ca^{2+} -транспортувальних систем ацинарних клітин сльозових залоз відомо досить мало. Причиною цього є, очевидно, труднощі методичного характеру в отриманні достатньої кількості функціонально інтактних ізольованих клітин сльозових залоз щура.

Вирішальну роль у підтриманні низької цитозольної концентрації Ca^{2+} у секреторних клітинах чи не всіх екзокринних залоз, що має надзвичайно важливе значення у процесах Ca^{2+} -сигналізації, відіграє узгоджене функціонування Ca^{2+} -помп плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму.

Досліджено властивості Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця (*Chironomus plumosus*) [7, 9], підщелепних залоз щурів [1], ацинарних клітин підшлункової залози щурів [47], шлункових залоз морських свинок [4]. Підтверджена роль Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця [8], у слинних залозах личинки *Drosophila melanogaster* [12], ацинарних клітинах підщелепної залози

щурів [1], привушної залози щурів [19], шлункових залоз морських свинок [4], гепатоцитів [40], панкреатитів мишей [41].

Метою роботи було дослідити роль Ca²⁺-помп плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулулу в підтриманні Ca²⁺-гомеостазу в секреторних клітинах зовнішньорбітальної сльозової залози щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведене на нелінійних білих щурах масою 160–250 г, яких утримували у стаціонарних умовах виварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Ізолювання секреторних клітин зовнішньорбітальної сльозової залози щура

Після наркотизації хлороформом і декапітації тварини швидко виділяли зовнішньорбітальну сльозову залозу (*glandula orbitalis externa*) та очищали її від сполучної тканини.

Для ізолювання секреторних клітин зовнішньорбітальної сльозової залози щура використали модифікований нами метод В. Герцога, Г. Сайдеса і Ф. Міллера [27]. Підібравши умови ізолювання, ми встановили, що оптимальним є використання дворазової почергової інкубації у позаклітинному Ca²⁺-вмісному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та лідази, і в позаклітинному середовищі, яке містить ЕГТА (2 ммоль/л). Спочатку у відпрепаровану залозу ін'єкцією вводили суміш колагенази (690 У/мл) з лідазою (400 У/мл), розчинених на основі позаклітинного середовища такого складу (ммоль/л): NaCl – 119, KCl – 6, MgCl₂ – 1,2, HEPES – 10, CaCl₂ – 1, глюкоза – 10, NaHCO₃ – 25; pH 7,4. Після цього залозу інкубували 25 хв у водяному термостаті при температурі 37°C та помірному струшуванні. Після завершення інкубації змінювали розчин на позаклітинний, що містить ЕГТА (2 ммоль/л), й інкубували у ньому протягом 5 хв. Повторно інкубували у Ca²⁺-вмісному позаклітинному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та лідази (15 хв), піпетували наконечниками з отвором різного діаметра в безкальцієвому ЕГТА-вмісному позаклітинному середовищі, після чого промивали у Ca²⁺-вмісному розчині.

Після першої інкубації з колагеназою та лідазою, але перед інкубацією з ЕГТА, ацинуса здебільшого зібрані у комплекси. Після першої інкубації з ЕГТА ацинарні комплекси розпушуються, а після другої інкубації з колагеназою та лідазою з подальшим піпетуванням отримуємо суспензію окремих клітин і невеликих їх груп (рис. 1, А).

Кількість клітин підраховували за допомогою камери Горяєва. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально, під світловим мікроскопом, з використанням барвника трипанового синього. Для цього 0,2% розчин трипанового синього, виготовленого на основі номінально безкальцієвого позаклітинного середовища, змішували зі суспензією клітин в однакових об'ємах і через 2–3 хв розглядали під мікроскопом. Відсутність забарвлення ядра свідчить про цілісність плазматичних мембран клітин.

Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин

Метод пермеабілізації плазматичної мембрани за допомогою дигітоніну часто застосовують для різних клітин [2, 10, 13, 29, 33]. Оскільки плазматична мембрана різних клітин суттєво відрізняється за вмістом холестерину, діюча концентрація дигі-

тоніну, а також умови пермеабілізації та склад розчинів у кожному випадку є іншими. Тому виникала необхідність адаптувати цей метод для пермеабілізації плазматичної мембрани клітин секреторних клітин зовнішньосльозової залози щурів.

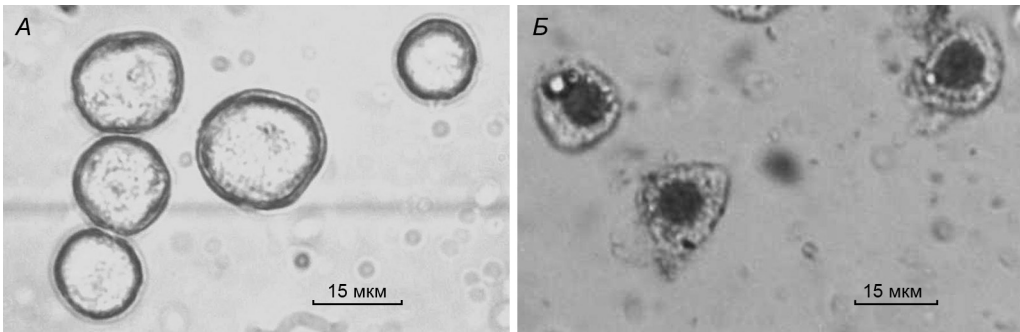


Рис. 1. Ізольовані секреторні клітини зовнішньорбітальної сльозової залози щура (світлова мікроскопія за допомогою Nikon optiphot 2, Японія):

А – інтактні клітини ізольовані з використанням дворазової почергової інкубації у двох позаклітинних середовищах: 1) $[Ca^{2+}] = 1$ ммоль/л; [колагеназа] = 690 U/мл (тип IV); [лідаза] = 400 U/мл; 2) [EGTA] = 2 ммоль/л; Б – пермеабілізовані секреторні клітини зовнішньорбітальної сльозової залози щура після інкубації протягом 10 хв з дигітоніном (50 мкг / 0,5 млн клітин) у середовищі, наближеному за складом до внутрішньоклітинного

Fig. 1. Isolated secretory cells of rat exorbital lacrimal gland (light microscopy using Nikon optiphot 2, Japan): A – intact isolated secretory cells of lacrimal gland after double continuous incubation with two extracellular media: 1) $[Ca^{2+}] = 1$ mmol/l; [collagenase] = 690 U/ml (type IV); [lidase] = 400 U/ml 2) [EGTA] = 2 mmol/l; Б – permeabilized secretory cells of exorbital lacrimal gland of rat after 10 min incubation with digitonin (50 µg/0.5 mln cells) in intracellular like medium

Оптимальну концентрацію дигітоніну (50 мкг/мл у розрахунку на 0,5 млн клітин) підібрали експериментально. Спочатку клітини інкубували з дигітоніном протягом 10 хв при 37°C у середовищі, наближеному за іонним складом до внутрішньоклітинного (ммоль/л): KCl – 140, MgCl₂ – 1,5, CaCl₂ – 0,0274, EGTA – 0,1 ($[Ca^{2+}] \approx 10^{-7}$ моль/л), HEPES – 10; pH 7,2. Концентрацію вільного Ca²⁺ розраховували за допомогою програми *Maxchelator* (<http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>). Після пермеабілізації клітини двічі промивали наближеним за складом до внутрішньоклітинного розчином без дигітоніну. Ступінь пермеабілізації оцінювали візуально, шляхом фарбування трипановим синім (рис. 1, Б).

Визначення вмісту сумарного Ca²⁺

Після ізолювання клітини (або і пермеабілізації) розділяли на аліквоти й інкубували у середовищі відповідного складу з використанням водяного термостата при 37°C та помірному струшуванні. Після інкубації клітини осаджували шляхом центрифугування 10 с при 1600 g, супернатант зливали та додавали 1 мл бідистильованої води. Отриману суспензію гомогенізували у скляному гомогенізаторі та центрифугували при 1600 g протягом 10 хв. Проби для визначення вмісту Ca²⁺ відбирали з надосадової рідини. Концентрацію Ca²⁺ визначали спектрофотометричним методом із використанням металохромного барвника арсеназо III за допомогою стандартного набору реактивів (*Simko Ltd*, Львів).

Паралельно проводили перерахунок вмісту Ca²⁺ на кількість клітин у пробі і на міліграм білка, проте при його перерахунку на кількість клітин статистична однорідність у межах вибірки виявилася вищою.

Статистичний аналіз результатів досліджень

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом, за статистично достовірні приймали зміни з $P < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування внеску Ca²⁺-помп у підтриманні внутрішньоклітинного Ca²⁺-гомеостазу в секреторних клітинах сльозових залоз ми визначали чутливість Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму до еозину Y.

Високоспецифічні інгібітори Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани поки що невідомі, але синтезовано сполуки, які здатні досить ефективно інгібувати цю транспортну систему. До них належить, насамперед, тетрабромфлуоресцеїн, більше відомий під назвою еозин Y [5, 11]. Еозин Y інгібує функціонування транспортних АТФ-аз за рахунок адсорбції на АТФ-зв'язувальному центрі ферменту. Він є блокатором Ca²⁺-помп гладеньком'язових клітин [5], Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму клітин міометрію [6], Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани еритроцитів [22], слинних залоз личинки дзвінця [7, 8, 9], при цьому практично не впливаючи на функціонування інших Ca²⁺-транспортувальних систем [11, 21].

У першій серії експериментів ми досліджували вплив еозину Y різної концентрації на вміст Ca²⁺ в інтактних і пермеабілізованих клітинах сльозової залози щура після 15-хвилинної інкубації з ним відповідно у позаклітинному (1 ммоль/л Ca²⁺) та наблизеному до внутрішньоклітинного (10⁻⁷ моль/л Ca²⁺) середовищах.

Еозин Y у концентрації 5–20 мкмоль/л істотно не змінює вмісту Ca²⁺ в інтактних секреторних клітинах сльозової залози (рис. 2). За вищої концентрації еозину Y (50 мкмоль/л) вміст Ca²⁺ у клітинах зменшується на 16,22±5,39% ($P < 0,05$, $n = 5$). Це зменшення може бути зумовлене лише інгібуванням Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму (за рахунок зміщення рівноваги у бік транспортування Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулуму та зменшення його акумуляції у депо). Адже інгібування Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани мало б спричинити збільшення (а не зменшення) вмісту Ca²⁺ у клітинах.

На пермеабілізованих дигітоніном клітинах встановлено, що еозин Y дозозалежно зменшує вміст Ca²⁺ за рахунок інгібування Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму. За концентрації інгібітора 5, 10, 20 та 50 мкмоль/л це зменшення становило відповідно 41,74±5,44, 64,58±7,00, 69,37±2,46 та 79,51±5,34% ($P < 0,001$, $n = 6$; рис. 2). Отже, вміст Ca²⁺ у пермеабілізованих клітинах (у яких Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани не функціонує) за всіх тестованих концентрацій еозину Y суттєво зменшується, на відміну від вмісту у клітинах з інтактною плазматичною мембраною.

Відсутність змін вмісту Ca²⁺ в інтактних секреторних клітинах є можливою лише за умови, що спустошення внутрішньоклітинних депо, спричинене інгібуванням еозином Y Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму, нівелюється пригніченням транспортуванням Ca²⁺ з клітини – внаслідок інгібування Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани.

Розглядаючи таку складну систему, якою є клітина, слід виходити з того, що зареєстровані зміни вмісту Ca²⁺ є усередненим результатом функціонування всіх клітинних Ca²⁺-транспортувальних систем – і плазматичної мембрани, і внутрішньоклітинних депо. Фактично ми повинні розглядати певне значення вмісту Ca²⁺ у клітині як результат двох протилежно спрямованих потоків Ca²⁺. *Вхідний потік*

забезпечує надходження позаклітинного Ca^{2+} крізь плазматичну мембрану і реалізується через функціонування Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани, внутрішньоклітинних Ca^{2+} -помп і Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій. Протилежно спрямований *вихідний потік* забезпечує зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах за рахунок його вивільнення із внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} -каналами та виведення у позаклітинне середовище [7], зокрема Ca^{2+} -помпою плазматичної мембрани.

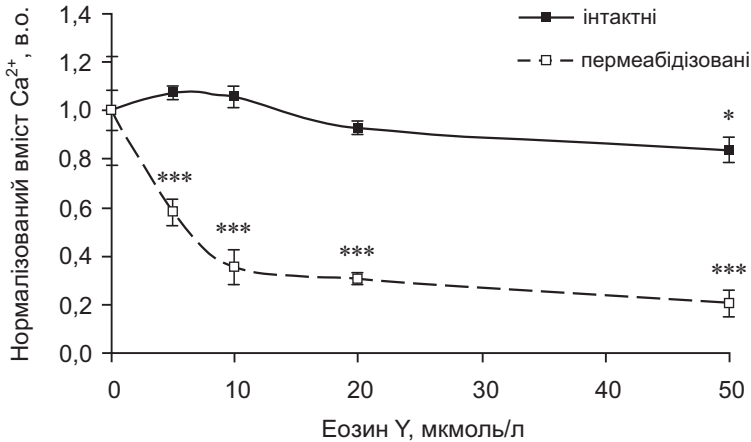


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу еозину Y на вміст Ca^{2+} у інтактних і пермеабілізованих секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слизової залози щура:

вміст Ca^{2+} нормалізували, прийнявши за одиницю його значення за відсутності інгібітора; час інкубації – 15 хв; для інтактних клітин $[\text{Na}^+] = 134$ ммоль/л, $[\text{K}^+] = 6$ ммоль/л, $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ ммоль/л; для пермеабілізованих клітин $[\text{K}^+] = 140$ ммоль/л, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$ моль/л; * – різниця порівняно з контролем відповідної групи достовірна з $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$; $n = 5$ і 6 відповідно

Fig. 2. The influence of eosin Y in different concentrations on Ca^{2+} content in intact and permeabilized secretory cells of rat exorbital lacrimal gland:

The tissue Ca^{2+} content in the absence of inhibitor was normalized to one; incubation time – 15 min; for intact cells $[\text{Na}^+] = 134$ mmol/l, $[\text{K}^+] = 6$ mmol/l, $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ mmol/l; for permeabilized cells $[\text{K}^+] = 140$ mmol/l, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$ mol/l; * – difference compared with control in appropriate group reliable with $P < 0.05$, *** – $P < 0.001$; $n = 5$ and 6 respectively

Між цими двома потоками наявні певні антагоністичні взаємовідносини. Наприклад, пригнічення вхідного потоку як результат інгібування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму додатково підсилюється стимуляцією вихідного потоку – внаслідок активації Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани надлишком цитозольного Ca^{2+} . І, навпаки, інгібування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (пригнічення вихідного потоку) спричиняє збільшення вмісту Ca^{2+} у клітинах внаслідок активації цитозольним Ca^{2+} помпи ендоплазматичного ретикулуму (якщо вона незаблокована), що еквівалентне посиленню вхідного потоку. За одночасного ж пригнічення обох потоків Ca^{2+} (і вхідного, і вихідного) вміст Ca^{2+} у клітинах не змінюється. Цим і зумовлена відсутність змін вмісту Ca^{2+} в інтактних секреторних клітинах за дії інгібітора Ca^{2+} -помп еозину Y.

Результати двофакторного дисперсійного аналізу засвідчують, що вміст Ca^{2+} у клітинах слизових залоз достовірно залежить лише від пермеабілізованості плазматичної мембрани ($P < 0,05$). При цьому вклад пермеабілізованості плазматичної мембрани становить 57,67%, концентрації еозину Y – 26,77%, неврахованих факторів – 15,56%.

У наступній серії дослідів ми порівняли зміни вмісту Ca²⁺ в інтактних клітинах протягом різного часу інкубації в контролі та за наявності у середовищі еозину Y.

Ми з'ясували, що в інтактних клітинах вміст Ca²⁺ протягом часу інкубації статистично достовірно зменшується майже прямолінійно. Так, на 5 хв інкубації це зменшення становило 26,42±6,26%, на 10 хв – 34,22±6,14%, а на 15 хв – 44,65±5,17% ($P < 0,001$, $n = 8$; рис. 3, А). Такий характер залежності може бути зумовлений зменшенням рівня ендogenous АТФ у цитозолі протягом часу інкубації і, відтак, порушенням функціонування Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуому.

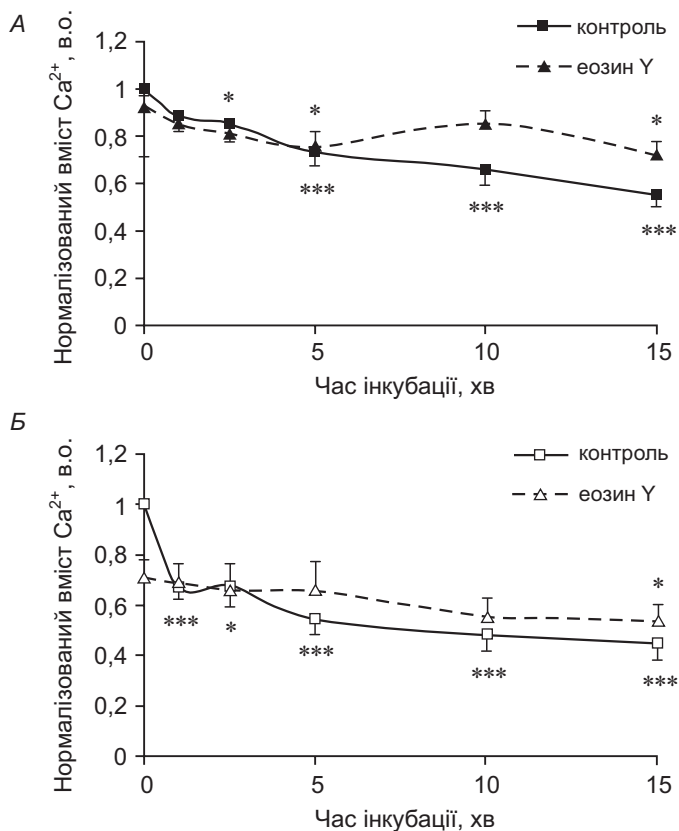


Рис. 3. Зміни вмісту Ca²⁺ у клітинах зовнішньоорбітальної сльозової залози щурів протягом часу інкубації у контролі та під впливом еозину Y:

вміст Ca²⁺ нормалізували, прийнявши за одиницю його вміст у клітинах, які не інкубували (0 хв), та за відсутності інгібітора; А – інтактні клітини, [Na⁺] = 134 ммоль/л, [K⁺] = 6 ммоль/л, [Ca²⁺] = 1 ммоль/л; Б – пермеабілізовані клітини, [K⁺] = 140 ммоль/л, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ ммоль/л; в обох випадках [еозин Y] = 5 мкмоль/л; * – різниця порівняно з вмістом Ca²⁺ у неінкубованих клітинах відповідної групи достовірна з $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$; $n = 6$

Fig. 3. Changes in total Ca²⁺ content in cells of exorbital lacrimal gland of rat during incubation in control and upon the influence of eosin Y:

The tissue Ca²⁺ content in the absence of inhibitor and without incubation (0 min) was normalized to one; A – intact cells, [Na⁺] = 134 mmol/l, [K⁺] = 6 mmol/l, [Ca²⁺] = 1 mmol/l; B – permeabilized cells, [K⁺] = 140 mmol/l, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ mol/l; in both cases [eosin Y] = 5 μmol/l; * – difference compare with Ca²⁺ content in nonincubated cells in appropriate group reliable with $P < 0.05$, *** – $P < 0.001$; $n = 6$

За наявності у середовищі еозину Υ (5 мкмоль/л) вміст Ca^{2+} в інтактних клітинах протягом перших хвилин інкубації теж зменшувався; на 5 хв це зменшення становило $16,05 \pm 4,73\%$ ($P < 0,05$, $n = 6$). На 10 хв інкубації інтактних клітин з еозином Υ спостерігали деяке збільшення вмісту Ca^{2+} , яке на 15 хв змінилося достовірним зменшенням, але тільки на $21,53 \pm 4,45\%$ ($P < 0,05$, $n = 6$; рис 3, А). Отже, наявність у середовищі еозину Υ спричиняє зміщення рівноваги системи в бік нагромадження Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо. Це може бути наслідком або збільшення рівня цитозольного АТФ (як результат інгібування АТФаз), або/чи одночасно того, що помпи плазматичної мембрани мають вищу афінність до еозину Υ , ніж Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулулу.

Швидкість зменшення вмісту Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах протягом часу інкубації виявилася суттєво більшою, ніж у інтактних клітинах. Так, вже на 5 хв інкубації зменшення становило $45,87 \pm 5,79\%$ ($P < 0,001$, $n = 6$), а на 15 хв – $55,42 \pm 6,58\%$ ($P < 0,001$, $n = 6$; рис. 3, Б). За наявності у середовищі еозину Υ зміни вмісту Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах протягом часу інкубації мали таку ж тенденцію, що і в контролі, але виявилися достовірними лише на 15 хв інкубації (на $23,87 \pm 7,05\%$, $P < 0,05$, $n = 6$; рис. 3, Б).

Результати двофакторного дисперсійного аналізу підтвердили, що за відсутності еозину Υ у середовищі обидва чинники – і час інкубації, і пермеабілізованість плазматичної мембрани, суттєво впливають на вміст Ca^{2+} у клітинах. Причому час інкубації на 79,82% визначає вміст Ca^{2+} у клітинах, а пермеабілізованість – лише на 16,08% ($P < 0,01$). Вклад неврахованих факторів становить 4,10%.

За наявності у середовищі еозину Υ на зміни вмісту Ca^{2+} вірогідно впливає лише пермеабілізованість плазматичної мембрани, її вклад становить лише 67,12% ($P < 0,001$). Це підтверджує, що динаміка вмісту Ca^{2+} є однаковою як в інтактних, так і в пермеабілізованих клітинах. Вклад часу інкубації у цьому випадку є незначний і недостовірний.

У пермеабілізованих клітинах, на відміну від інтактних, Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани не забезпечує транспортування Ca^{2+} з клітини. Аналогічним чином діє на інтактні клітини еозин Υ у концентрації 5 мкмоль/л – пригнічує здебільшого Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани. Тим самим він нівелює часозалежне зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах.

Саме по собі зменшення вмісту Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах протягом часу інкубації справді пов'язане з вичерпуванням ендогенного АТФ унаслідок хоча б його вимивання чи вимивання субстратів мітохондріального дихання. У свою чергу, це спричиняє порушення функціонування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулулу і зменшення вмісту депонованого у ньому Ca^{2+} . Це підтверджується тим, що за додавання до середовища екзогенного АТФ (3 ммоль/л) вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах протягом часу інкубації не змінювався ($P > 0,05$, $n = 5$; рис. 4).

Аналогічно, за додавання до середовища сукцинату (5 ммоль/л) вміст Ca^{2+} у клітинах протягом часу інкубації теж не змінювався ($P > 0,05$, $n = 5$).

Правда, слід зазначити, саме по собі додавання екзогенного АТФ чи сукцинату до середовища зменшує вміст Ca^{2+} у клітинах ще до проведення інкубації. Ми розцінюємо це як артефакт досліду, оскільки АТФ чи сукцинат досить ефективно утворюють комплексні сполуки з іонізованим Ca^{2+} . Звичайно, повністю відкинути регуляторний вплив АТФ на інші Ca^{2+} -транспортувальні системи (наприклад, на $\text{I}\Phi_3$ -чутливі Ca^{2+} -канали опосередковано через активацію $\text{P}2\Upsilon$ -рецепторів [17, 28]) ми не можемо.

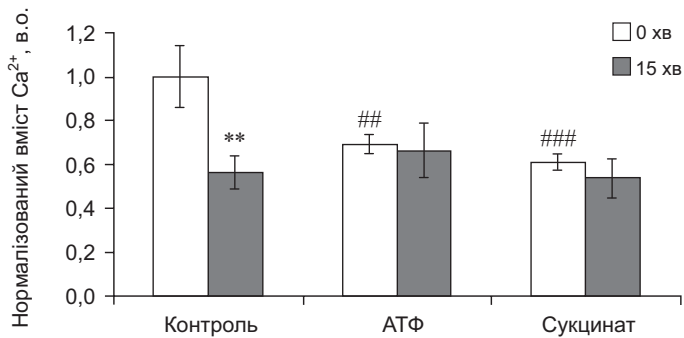


Рис. 4. Вплив АТФ і сукцинату на вміст Ca²⁺ в ізольованих пермеабілізованих дигітоніном секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слізової залози щура протягом часу інкубації: вміст Ca²⁺ у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його вміст у клітинах, які не інкубували (0 хв), та за відсутності екзогенного АТФ; [K⁺] = 140 ммоль/л, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ моль/л; [АТФ] = 3 ммоль/л; [сукцинат] = 5 ммоль/л; ** – різниця стосовно клітин без інкубації (0 хв) достовірна з $P < 0,01$; ## – стосовно відповідної проби у контролі з $P < 0,01$, ### – з $P < 0,001$; $n = 5$

Fig. 4. The influence of ATP and succinate on Ca²⁺ content in isolated digitonin-permeabilized secretory cells of rat exorbital lacrimal gland during incubation time: The tissue Ca²⁺ content in the absence of exogenous ATP and without incubation (0 min) was normalized to one; [K⁺] = 140 mmol/l, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ mol/l; [ATP] = 3 mmol/l; [succinate] = 5 mmol/l; ** – difference compare to cells without incubation (0 min) reliable with $P < 0.01$; ## – on relevant samples in control with $P < 0.01$, ### – з $P < 0.001$; $n = 5$

Встановлено також, що незалежно від наявності АТФ у середовищі інгібувальний ефект еозину Y був однаковим і становив 51,75±4,67% для контролю і 52,89±5,15% для середовища, що містило АТФ ($P < 0,001$, $n = 5$; рис. 5).

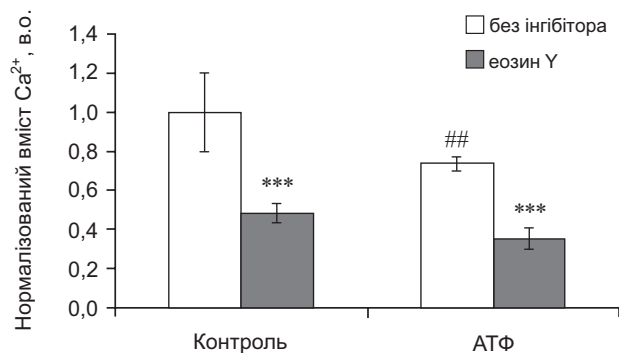


Рис. 5. Вплив еозину Y на вміст Ca²⁺ в ізольованих пермеабілізованих секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слізової залози щура залежно від наявності АТФ у середовищі: вміст Ca²⁺ у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його вміст за відсутності АТФ і еозину Y; час інкубації – 15 хв; [K⁺] = 140 ммоль/л, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ моль/л; [АТФ] = 3 ммоль/л; [еозин Y] = 5 мкмоль/л; *** – зміна за дії інгібітора достовірна з $P < 0,001$, ## – різниця достовірна стосовно проби у контролі з $P < 0,01$; $n = 5$

Fig. 5. The influence of eosin Y on Ca²⁺ content in intact and permeabilized secretory cells of exorbital lacrimal gland of rat dependent on existence of ATP in medium: The tissue Ca²⁺ content in the absence of ATP and eosin was normalized to one; incubation time – 15 min; [K⁺] = 140 mmol/l, [Ca²⁺] = 10⁻⁷ mol/l; [ATP] = 3 mmol/l; [eosin Y] = 5 μmol/l; *** – change by the action of inhibitor reliable with $P < 0.001$, ## – difference compared with control reliable with $P < 0.01$; $n = 5$

Для підтвердження функціонування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму у досліджуваних клітинах ми застосували високоспецифічний інгібітор усіх відомих її ізоформ – тапсигаргін [45]. Відомо, що інгібування тапсигаргіном мікросомальної Ca^{2+} -АТФази клітин привушної [19] та підщепної [37] залози щура призводить до вивільнення Ca^{2+} з $\text{I}\Phi_3$ -чутливого депо і стимулює надходження Ca^{2+} через плазматичну мембрану. Крім того, тапсигаргін (1 мкмоль/л) зменшував вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз личинки дзвінця [8].

З'ясувалося, що за наявності у середовищі інкубації тапсигаргину (1 мкмоль/л) вміст Ca^{2+} в ацинарних клітинах слюзових залоз, пермеабілізованих дигітоніном, зменшився на $47,64 \pm 13,42\%$ ($P < 0,05$, $n = 4$). На фоні екзогенного АТФ (3 ммоль/л) тапсигаргін спричиняв зменшення вмісту Ca^{2+} в ацинарних клітинах лише на $22,36 \pm 6,85\%$ ($P < 0,05$, $n = 4$; рис. 6). Така своєрідна конкуренція між тапсигаргіном і АТФ є не зовсім зрозуміла, тим більше, що ефект еозину Y був однаковим як за відсутності, так і за наявності екзогенного АТФ у середовищі.

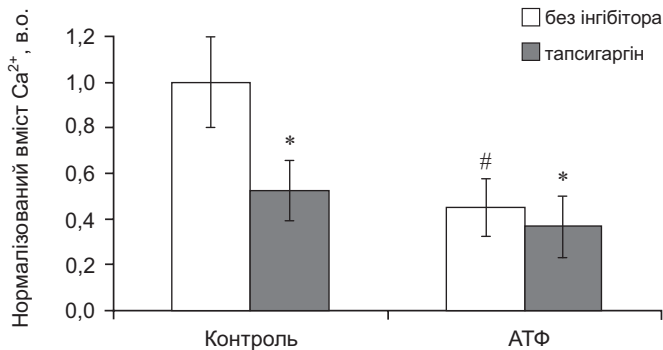


Рис. 6. Вплив тапсигаргину на вміст Ca^{2+} в ізольованих пермеабілізованих секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура залежно від наявності АТФ у середовищі:

вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його вміст за відсутності АТФ і тапсигаргину; час інкубації – 15 хв; $[\text{K}^+] = 140$ ммоль/л, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$ моль/л; $[\text{АТФ}] = 3$ ммоль/л; $[\text{тапсигаргін}] = 1$ мкмоль/л; * – зміна за дії інгібітора достовірна з $P < 0,05$; # – різниця достовірна стосовно проби у контролі з $P < 0,05$; $n = 4$

Fig. 6. The influence of thapsigargin on Ca^{2+} content in isolated permeabilized secretory cells of rat exorbital lacrimal gland dependent on existence of ATP in solution:

The tissue Ca^{2+} content in the absence of ATP and thapsigargin was normalized to one; incubation time – 15 min; $[\text{K}^+] = 140$ mmol/l, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$ mol/l; $[\text{ATP}] = 3$ mmol/l; $[\text{thapsigargin}] = 1$ $\mu\text{mol/l}$; * – change by the action of inhibitor reliable with $P < 0.05$; # – difference compared with control reliable with $P < 0.05$; $n = 4$

Зменшення вмісту Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах за дії специфічного інгібітора Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму – тапсигаргину (1 мкмоль/л) у контролі виявилось таким же, як і за дії інгібітора Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани та Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму – еозину Y (5 мкмоль/л). Це підтверджує, з одного боку, ефективність пермеабілізації плазматичної мембрани досліджуваних клітин, яка унеможливилує транспортну функцію Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. З іншого боку, це є свідченням високої чутливості Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози до еозину Y.

ОБГОВОРЕННЯ

У секреторних клітинах таких залоз, як слинні залози личинки *Chironomus plumosus* і *Drosophila melanogaster*, підщелепні залози щурів, шлункові залози морських свинок, підшлункова залоза та печінка щурів тощо, ідентифіковано Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму [1, 4, 7–9, 12, 20, 40, 41, 47]. Тим не менше, ролі Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани у функціонуванні секреторних клітин не відводиться належного їй місця. Зокрема, у дослідженнях на ацинарних клітинах підшлункової залози більшу увагу приділяють Ca²⁺-помпі ендоплазматичного ретикулуму та її значенню для наповнення кальцієм депо. Зокрема, вважають, що надходження Ca²⁺ крізь базальну частину плазматичної мембрани відбувається депокерованими Ca²⁺-каналами, Ca²⁺-помпою він нагнітається в ендоплазматичний ретикулум базального полюса клітини і транспортування тунелями ендоплазматичного ретикулуму до депо апікального полюса (тунельна гіпотеза) [38, 42].

Тривлий час вважали, що Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани міститься лише на базальному полюсі секреторних клітин [47], а у люмен ацинуса Ca²⁺ виводиться секреторними гранулами [23]. Згодом встановили, що важливу роль у цьому процесі відіграє також і Ca²⁺-помпа апікальної частини плазматичної мембрани секреторних клітин підшлункової [14, 32] та слинних залоз [32].

У подальшому досліджено кінетичні характеристики Ca²⁺-помп клітин підщелепної слинної залози щурів, встановлено здатність еозину Y їх інгібувати [1]. Діючи на інтактні секреторні клітини слинних залоз личинки дзвінця, еозин Y за низьких концентрацій (1–5 мкмоль/л) спочатку пригнічує Ca²⁺-помпу плазматичної мембрани, а за вищих – і Ca²⁺-помпу ендоплазматичного ретикулуму [9].

На відміну від підшлункової та слинних залоз, про Ca²⁺-помпи секреторних клітин сльозових залоз відомо мало. На основі даних літератури можна стверджувати лише про наявність Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму. Зокрема, показано, що у клітинах сльозових залоз мишей тапсигаргін у концентрації 1 мкмоль/л індукує вивільнення внутрішньоклітинного Ca²⁺ і його надходження крізь плазматичну мембрану [31]. Причому тапсигаргініндукована мобілізація Ca²⁺ в ізольованих секреторних клітинах сльозових залоз мишей залежить від рівня IФ₃ та інгібується гепарином [44]. Згідно з отриманими нами даних Ca²⁺-помпа ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин сльозових залоз із високою ефективністю інгібується не лише тапсигаргіном, а й еозином Y.

Крім того, важливу роль у підтриманні Ca²⁺-гомеостазу секреторних клітин сльозових залоз зовнішньорбітальної сльозової залози щура відіграє також і Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани. Про це свідчить той факт, що вміст Ca²⁺ в інтактних клітинах, на відміну від пермеабілізованих, практично не змінювався за дії еозину Y у досить широкому діапазоні концентрацій. Крім того, еозин Y у концентрації 5 мкмоль/л запобігав часозалежному зменшенню вмісту Ca²⁺ в інтактних клітинах сльозових залоз. Фактично в обох випадках інгібування активного виведення Ca²⁺ з клітини нівелює ефект, спричинений інгібуванням Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулуму або еозином Y, або зменшенням рівня АТФ у цитозолі. І цією структурою, яка забезпечує активне виведення Ca²⁺ з клітини, є еозин Y-чутлива Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани.

ВИСНОВОК

Встановлено, що Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулулу секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози ефективно інгібується еозином Y (10 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л).

Важливу роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу досліджуваних секреторних клітин відіграє і Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани. Це підтверджується тим, що еозин Y (5 мкмоль/л) запобігав часозалежному зменшенню вмісту Ca^{2+} в інтактних клітинах, а також тим, що на відміну від пермеабілізованих клітин, вміст Ca^{2+} в інтактних клітинах практично не змінювався під впливом еозину Y (5–20 мкмоль/л). В обох випадках інгібування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани нівелює ефект пригнічення функціонування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулулу.

Отже, еозин Y-чутлива Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу відіграють важливу роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура.

ПОДЯКА

Автори висловлюють подяку старшому науковому співробітнику кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка, кандидату біологічних наук Дрелю Віктору Ростиславовичу за допомогу у фотографуванні секреторних клітин.

1. Вац Ю.О., Клевець М.Ю., Федірko Н.В. Кінетичні характеристики Ca^{2+} , Mg^{2+} , АТФаз клітин підщелепної слинної залози щурів. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(6): 44–54.
2. Великопольська О.Ю., Манько Б.О., Манько В.В. Ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+} -функціональна одиниця: залежність дихання секреторних клітин від активності рi-анодин- та $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів. **Укр. біохім. журнал**, 2012; 84(5): 76–88.
3. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Е. **Курс варіаційної статистики**. Київ: Вища школа, 1977. 206 с.
4. 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. Київ, 2006. 39 с.
5. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. **Укр. біохім. журнал**, 1996; 68(6): 50–61.
6. Костерин С.А., Бурдыга Н.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} в миомерии. **Успехи соврем. биологии**, 1993; 113(4): 485–506.
7. Манько В.В. **Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз**: монографія. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. 271 с. [Серія «Біологічні Студії»].
8. Манько В.В., Бичкова С.В., Клевець М.Ю. Ідентифікація каналів вивільнення Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(1): 65–71.
9. Манько В.В., Клевець М.Ю., Федірko Н.В., Король Т.В. Вплив хлорпромазину на Ca^{2+} -транспортні системи плазматичної мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. **Укр. біохім. журнал**, 2000; 72 (2): 36–41.
10. Мерлавський В.М., Манько Б.О., Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну. **Біологічні Студії / Studia Biologica**, 2010; 4(3): 15–22.

11. Слінченко Н.М., Черниш І.Г., Костерін С.О. Використання очищеної Ca²⁺, Mg²⁺-АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію. **Укр. біохім. журнал**, 2003; 75(2): 33–38.
12. Чорна Т., Манько В., Клевець М. Системи транспортування Ca²⁺ у слинних залозах личинки *Drosophila melanogaster*. **Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2009; 49: 182–189.
13. Шлыков С.Г., Бабиц Л.Г., Костерин С.А. Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума миометрия. **Биохимия**, 1997; 62: 1666–1671.
14. Belan P.V., Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. Localization of Ca²⁺ extrusion sites in pancreatic acinar cells. **J. Biol. Chem.**, 1996; 271(13): 7615–7619.
15. Botelho S.Y., Goldstein A.M., Martinez E.V. Norepinephrine-responsive beta-adrenergic receptors in rabbit lacrimal gland. **Am. J. Physiol.**, 1973; 224(5): 1119–1122.
16. Dartt D.A. Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review. **Curr Eye Res**, 1989; 8(6): 619–636.
17. Dartt D.A., Hodges R.R. Cholinergic agonists activate P2X₇ receptors to stimulate protein secretion by the rat lacrimal gland. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 2011; 52(6): 3381–3390.
18. Ding C., Walcott B., Keyser K. Sympathetic neural control of the mouse lacrimal gland. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 2003; 44(4): 1513–1520.
19. Foskett J. K., Roifman C. M., Wong D. Activation of calcium oscillations by thapsigargin in parotid acinar cells. **J. Biol. Chem.**, 1991; 266(5): 2778–2782.
20. Foskett J., Wong D. Calcium oscillations in parotid acinar cells induced by microsomal Ca²⁺-ATPase inhibition. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, 1992; 262(3): C656–C663.
21. Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. **Biochemistry**, 1995; 34(3): 965–972.
22. Gatto C., Milanick M.A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, 1993; 264(6): 1577–1586.
23. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Belan P.V., Petersen O.H. Inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. **Cell**, 1996; 84(3): 473–480.
24. Godfrey P.P., Putney J.W. Jr. Receptor-mediated metabolism of the phosphoinositides and phosphatidic acid in rat lacrimal acinar cells. **Biochem. J.**, 1984; 218(1): 187–195.
25. Goldstein A.M., de Palau A., Botelho S.Y. Inhibition and facilitation of pilocarpine-induced lacrimal flow by norepinephrine. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 1967; 6(5): 498–511.
26. Harmer A.R., Smith P.M., Gallacher D.V. Local and global calcium signals and fluid and electrolyte secretion in mouse submandibular acinar cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 2005; 288(1): G118–G124.
27. Herzog V., Sies H., Miller F. Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation. **J. Cell Biol.**, 1976; 70: 692–706.
28. Hodges R.R., Vrouvlianis J., Shatos M.A., Dartt D.A. Characterization of P2X₇ purinergic receptors and their function in rat lacrimal gland. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 2009; 50(12): 5681–5689.
29. Horbay R.O., Manko B.O., Manko V.V. et al. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. **Cell Biol. Int.**, 2012; 36(1): 71–77.
30. Iwabuchi Y., Masuhara T. Effects of cholinergic and adrenergic agonists on the secretion of fluid and protein by submandibular glands of the hamster and the rat. **Comp. Biochem. Physiol. C**, 1992; 103(2): 277–283.
31. Kwan C.Y., Takemura H., Obie J.F. et al. Effects of MeCh, thapsigargin, and La³⁺ on plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ transport in lacrimal acinar cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, 1990; 258(6 Pt 1): C1006–C1015.

32. Lee M.G., Xu X., Zeng W., Diaz J. et al. Polarized expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves. **J. Biol. Chem**, 1997; 272 (25): 15771–15776.
33. Manko B.O., Klevets M.Y., Manko V.V. An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under in situ conditions. **Cell Biochem. Funct**, 2012; DOI: 10.1002/cbf.2864 [Epub ahead of print].
34. Mauduit P., Jammes H., Rossignol B. M₃ muscarinic acetylcholine receptor coupling to PLC in rat exorbital lacrimal acinar cells. **Am. J. Physiol**, 1993; 264(6 Pt 1): C1550–C1560.
35. Mauduit P., Herman G., Rossignol B. Protein secretion in lacrimal gland: Alpha 1-beta-adrenergic synergism. **Am. J. Physiol**, 1986; 250(5, Pt. 1): C704–C712.
36. Melvin J.E., Yule D., Shuttleworth T., Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu. Rev. Physiol**, 2005; 67: 445–469.
37. Métioui M., Grosfils K., Dehaye J.P. Regulation by thapsigargin and carbachol of the intracellular calcium concentration in rat submandibular glands. **Gen Pharmacol**, 1994; 25(7): 1353–1359.
38. Mogami H., Nakano K., Tepikin A.V., Petersen O.H. Ca²⁺ flow via tunnels in polarized cells: recharging of apical Ca²⁺ stores by focal Ca²⁺ entry through basal membrane patch. **Cell**, 1997; 88(1): 49–55.
39. Moreno M., de Victoria M., López M. Effect of sympathetic stimulation on salivary secretion in submandibular gland in the rabbit stimulated by pilocarpine. **Rev. Esp. Fisiol**, 1984; 40(1): 15–18.
40. Ogi M., Yokomori H., Inao M. et al. Hepatic stellate cells express Ca²⁺ pump-ATPase and Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase in plasma membrane of caveolae. **J. Gastroenterol**, 2000; 35(12): 912–918.
41. Petersen C.C., Petersen O.H., Berridge M.J. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. **J. Biol. Chem**, 1993; 268(30): 22262–22264.
42. Petersen O.H., Verkhatsky A. Endoplasmic reticulum calcium tunnels integrate signalling in polarised cells. **Cell Calcium**, 2007; 42(4–5): 373–378.
43. Quissell D.O., Barzen K.A., Deisher L.M. Rat submandibular and parotid protein phosphorylation and exocytosis: effect of site-selective cAMP analogs. **Crit. Rev. Oral Biol. Med**, 1993; 4(3–4): 443–448.
44. Smith M.M., Gallacher D.V. Thapsigargin-induced Ca²⁺ mobilization in acutely isolated mouse lacrimal acinar cells is dependent on a basal level of Ins(1,4,5)P₃ and is inhibited by heparin. **Biochem. J**, 1994; 299(Pt 1): 37–40.
45. Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O. et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. **Agents Action**, 1989; 27(1–2): 17–23.
46. Thorn P., Lawrie A.M., Smith P.M. et al. Local and global cytosolic Ca²⁺ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. **Cell**, 1993; 74(4): 661–668.
47. Toescu E.C., Petersen O.H. Region-specific activity of the plasma membrane Ca²⁺-pump and delayed activation of Ca²⁺ entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca²⁺ signals in exocrine cells. **J. Biol. Chem**, 1995; 270(15): 8528–8535.
48. Turner R.Y., Sugiyama H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis**, 2002; 8(1): 3–11.
49. Watson E.L., Abel P.W., DiJulio D. et al. Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 1996; 271(3): C905–C913.
50. Zoukhri D., Hodges R.R., Rawe I.M. et al. Ca²⁺ signaling by cholinergic and alpha1-adrenergic agonists is up-regulated in lacrimal and submandibular glands in a murine model of Sjögren's syndrome. **Clin. Immunol. Immunopathol**, 1998; 89(2): 134–140.

Ca²⁺ TRANSPORTING SYSTEMS IN SECRETORY CELLS OF THE RAT EXORBITAL LACRIMAL GLAND

I. Ca²⁺ PUMPS OF PLASMA MEMBRANE AND ENDOPLASMIC RETICULUM

A. B. Kotliarova, V. V. Manko

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

The mechanism of secretion by lacrimal glands, the innervation and orientation effects, and the mechanism of transduction of primary agonists are similar to the major salivary glands. However, unlike the major salivary glands, about organization of Ca²⁺ signalling and Ca²⁺-transporting systems contribution to Ca²⁺ homeostasis maintenance in secretory cells of the lacrimal glands is not totally clear yet. The purpose of the work was to investigate the role of plasma membrane (PMCA) and endoplasmic reticulum (SERCA) Ca²⁺ pumps in maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the secretory cells of the lacrimal glands.

The study was performed on intact and digitonin-permeabilized secretory cells of exorbital lacrimal glands of rats. The functioning of the Ca²⁺-transporting systems was estimated by changes of Ca²⁺ content in cells, after incubation with agonists or antagonists. Ca²⁺ content was determined using metalochromic dye Arsenazo III.

The baseline Ca²⁺ content in intact and permeabilized cells decreases during incubation time. This decrease is caused by dysfunction of SERCA. This pump is high effectively inhibited by eosin Y (10 μmol/l) and thapsigargin (1 μmol/l).

PMCA plays important role in maintaining of Ca²⁺ homeostasis in the lacrimal gland secretory cells. Thus, the content of Ca²⁺ in intact cells of rat lacrimal glands did not change under inhibition by eosin Y in wide concentration range (5–20 μmol/l) (unlike digitonin-permeabilized cells). In addition, eosin Y (5 μmol/l) prevented time-dependent reduction of Ca²⁺ content in intact cells. In both cases, inhibition of PMCA eliminates the effect of inhibition of SERCA.

Results of two-factor analysis of variance confirmed that in the absence of eosin Y incubation time and permeabilization of plasma membrane significantly affect the content of Ca²⁺ in cells. At the same time, in the presence of eosin Y (5 μmol/l) only permeabilization of plasma membrane reliably affects of the changes of Ca²⁺ content. Because in permeabilized cells, as well as eosin Y influence in concentration 5 μmol/l, PMCA does not transport Ca²⁺ from the cell.

Keywords: eosin Y, Ca²⁺ transport systems, Ca²⁺ pump of plasma membrane (PMCA), Ca²⁺ pump of endoplasmic reticulum (SERCA), lacrimal gland, secretory cells.

Ca²⁺-ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК ВНЕГЛАЗНИЧНЫХ СЛЕЗНЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫСЫ.

I. Ca²⁺-НАСОСИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

А. Б. Котлярова, В. В. Манько

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

Слезные железы по механизму секреции, иннервации, направленности эффектов и механизму трансдукции первичных агонистов аналогичны большим слюнным железам. Об организации соотношения Ca²⁺-сигнализации и вкладе разных Ca²⁺-транспортных систем в поддержании Ca²⁺-гомеостаза в секреторных клетках слезных желез, в отличие от больших слюнных желез, известно недостаточно. Поэтому целью работы было исследование роли Ca²⁺-насосов плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума в поддержании Ca²⁺-гомеостаза в секреторных клетках слезных желез.

Исследование проведено на интактных и пермеабилizированных дигитонином секреторных клетках внеглазничной слезной железы крысы. Функционирование Ca²⁺-транспортных систем оценивали по изменению содержания Ca²⁺ в клетках, который определяли с помощью металохромного красителя арсеназо III.

Установлено, что в контроле содержание Ca²⁺ в интактных и пермеабилizированных клетках в течение времени инкубации (15 мин) уменьшается. Это уменьшение обусловлено нарушением функционирования Ca²⁺-насоса эндоплазматического ретикулума, который с высокой эффективностью ингибируется эозином Y (10 мкмоль/л) и тапсигаргином (1 мкмоль/л).

Важную роль в поддержании Ca²⁺-гомеостаза исследуемых секреторных клеток играет и Ca²⁺-насос плазматической мембраны. Это подтверждается тем, что содержание Ca²⁺ в интактных клетках слезных желез крысы практически не менялся под влиянием эозина Y в широком диапазоне (5–20 мкмоль/л) концентраций (в отличие от пермеабилizированных дигитонином клеток). Кроме того, эозин Y (5 мкмоль/л) предотвращал времязависимое уменьшение содержания Ca²⁺ в интактных клетках. В обоих случаях ингибирование Ca²⁺-помпы плазматической мембраны нивелирует эффект угнетения функционирования Ca²⁺-помпы эндоплазматического ретикулума.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа подтвердили, что при отсутствии в среде эозина Y как время инкубации, так и пермеабилizированность плазматической мембраны существенно влияют на содержание Ca²⁺ в клетках. При наличии эозина Y (5 мкмоль/л) на содержание Ca²⁺, вероятно, влияет только пермеабилizированность плазматической мембраны, поскольку в пермеабилizированных клетках, как и при действии эозина Y в концентрации 5 мкмоль/л, Ca²⁺-насос плазматической мембраны не обеспечивает транспорт Ca²⁺ с клетки.

Ключевые слова: эозин Y, Ca²⁺-транспортные системы, Ca²⁺-насос плазматической мембраны, Ca²⁺-насос эндоплазматического ретикулума, слезные железы, секреторные клетки.

Одержано: 27.07.2012