Biol. Stud. 2010: 4(2); 25–38 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0402.099
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК 612.3: 519.413.2

КАНАБІНОЇДНІ РЕЦЕПТОРИ CB1 ТА CB2 РЕГУЛЮЮТЬ БАЗАЛЬНЕ СЛИНОВИДІЛЕННЯ ТА БІЛКОВО-ЕЛЕКТРОЛІТНИЙ СКЛАД СЛИНИ ШЛЯХОМ МОДУЛЯЦІЇ РОБОТИ АТФ-азних СИСТЕМ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ

О. Нецик[1], О. Копач[2], Н. Федірко[1]

[1]Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: olga.nets@gmail.com

[2]Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця,
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна

З'ясовано, що активація в умовах *in vivo* канабіноїдних рецепторів CB1 та CB2 (CBRs) підщелепної слинної залози їх селективним агоністом WIN 55212-2 призводить до пригнічення базального слиновиділення та зміни складу секретованої слини. Аналогічного характеру зміни спостерігаються як при одноразовому прикладанні ендоканабіноїду, так і за умов тривалої дії агоніста. Максимальний пригнічувальний ефект ендоканабіноїдів спостерігався на 10 хв після активації CBRs як у випадку одноразового введення WIN 55212-2 (~ 45%), так і при багаторазовому введенні агоніста (~ 60%). Пролонгована дія WIN 55212-2 викликає закислення секретованої слини (pH ~ 9,0–8,8), підвищення концентрації кальцію, загального білка й амілазної активності слини. Не виявлено достовірних змін концентрації K^+, Na^+, P^{2+} у секретованій слині за умов довготривалої активації CBRs. Виявлено, що пригнічення базального слиновиділення супроводжується інгібуванням активності Na^+/K^+-АТФ-ази, Ca^{2+}-АТФ-ази ендоплазматичного ретикулуму та посиленням роботи Ca^{2+}-АТФ-ази плазматичної мембрани. Отже, за умов активації CBRs:

i) підвищує активність цАМФ-опосередкована сигнальна система, задіяна у секреції білкової компоненти слини;
ii) порушується трансклітинний транспорт H_2O, що лежить в основі зниження інтенсивності базального слиновиділення;
iii) не змінюється електролітний склад слини, що свідчить про відсутність виражених змін функціонування протокових клітин залози на противагу ацинарним. Виявлені зміни pH слини й активності АТФ-азних систем ацинарних клітин є ймовірною причиною CBRs-опосередкованого пригнічення базального слиновиділення підщелепною слинною залозою.

Ключові слова: канабіноїдні рецептори, WIN 55212-2, підщелепна слинна залоза, слиновиділення, АТФ-азна активність.

ВСТУП

Ендогенні канабіноїди – ліпідна сигнальна система, яка виконує важливі регуляторні функції в організмі всіх хребетних. Ендоканабіноїди ефективно модулюють перебіг фізіологічних процесів шляхом активації специфічних канабіноїдних рецепторів типу CB1 та CB2 [39]. Численні дослідження показали важливу роль ендоканабіноїдної системи у гастро-інтестинальному тракті за фізіологічних і патофізіологічних умов [26]. Зокрема, у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) канабіноїдні рецептори типу CB1 наявні в нейронах ентеричної нервової системи та в чутливих закінченнях блукаючого і спинальних нейронів. Також показано, що активація рецепторів типу CB1 модулює декілька функцій у гастро-інтестинальному тракті, включаючи шлункову секрецію, випорожнення шлунка та кишкову моторику [26]. CB2 рецептори експресуються переважно в селезінці, мигдалинах та імунних клітинах (B-клітини, моноцити і T-клітини), визначаючи роль в імунній функції [39].

Ротова порожнина є початковим відділом ШКТ, і секрет слинних залоз виконує важливу функцію у процесі травлення вуглеводів, а також у забезпеченні здорового стану органів ротової порожнини. Базальне або нестимульоване слиновиділення здійснюється безперервно і є необхідним для зволоження ротової порожнини у період між прийняттями їжі, а також для забезпечення постійного антивірусного й антибактеріального захисту організму [5, 29]. Основну роль у здійсненні базального слиновиділення відіграє підщелепна слинна залоза (ПСЗ), тоді як інша велика слинна залоза – привушна – практично не здійснює постійної секреції рідини у ротову порожнину, а під'язикова залоза – забезпечує менш як 10% від загального об'єму нестимульваного слиновиділення [5]. Зниження інтенсивності базальної секреції слини супроводжується виникненням відчуття сухості у роті (розвиток ксеростомії), а також виникненням ряду таких патологічних ускладнень, як карієс, виразкові запалення та грибкові інфекції [29]. Гіпофункція слинних залоз може виникати і внаслідок медикаментозного лікування, оскільки відомо, що протягом століть різні препарати рослини *Cannabis sativa L.* використовували для лікування таких розладів шлунково-кишкового тракту, як шлунково-кишковий біль, гастроентерити і діарея [26]. Імуногістохімічним методом показано експресію канабіноїдних рецепторів обох типів CB1 та CB2 у ацинарних і протокових клітинах ПСЗ щура, активація яких призводить до пригнічення стимульованого слиновиділення [33]. Незважаючи на наведені клінічні й імуногістохімічні дані, роль канабіноїдних рецепторів у фізіології ПСЗ та у процесах регуляції базального слиновиділення залишається нез'ясованою. Враховуючи це, метою даної роботи було простежити динаміку базального слиновиділення, зміни електролітного й білкового складу секретованої слини за умов одноразової та пролонгованої активації канабіноїдних рецепторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Забір слини з проток підщелепної слинної залози

Експерименти виконували згідно із „Загальними принципами роботи на тваринах", затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001). Вивчення динаміки та визначення показників слиновиділення підщелепною слинною залозою проводили на щурах-самцях лінії Wistar (130–160 г). Тварин анестезували внутрішньом'язовою ін'єкцією суміші кетаміну (150 мг/кг маси) (ВАТ „Фармак", Київ) і лістенону (0,08 мл/кг) (Nycomed GmbH, Austria) та фіксували у дорзально-

горизонтальному положенні на хірургічному столику. Слину відбирали у мікропробірки за допомогою скляної канюлі, впритул підведеної до проток залоз у ротовій порожнині, та перистальтичної помпи зі змінною швидкістю [1]. Забір слини проводили протягом 10 хв перед хірургічним розтином епітелію ділянки шиї, що вкриває залози, та кожні наступні 5 хв після нанесення безпосередньо на поверхню залоз по 20 мкл фізіологічного розчину (контроль) чи розчину агоніста. В окремих групах експериментів ендоканабіноїд аплікували одноразово або з інтервалом 5 хв протягом 30 хв.

Визначення параметрів слиновиділення підщелепною слинною залозою

Виділення слини підщелепною слинною залозою оцінювали за такими показниками: швидкість слиновиділення, концентрація білка й електролітів. Швидкість слиновиділення розраховували як об'єм слини, що виділяється через протоки залози за 1 год у перерахунку на 1 кг маси тварини [1]. Концентрацію білка у слині визначали за методом Лоурі, концентрацію кальцію – колориметричним методом з використанням металохромного барвника арсеназо III, загальну концентрацію калію та натрію – з використанням атомно-абсорбційної спектрофотометрії, вміст фосфору – за допомогою хімічного аналізатора „Humalyzer 2000". Секретовану слину наносили на pH-індикаторні стрічки colorpHast (EMD Chemicals Inc, Німеччина) і оцінювали значення pH за стандартною шкалою. Амілолітичну активність секрету ізольованих ацинусів *in vitro* визначали за модифікованим амілокласичним методом Каравея [1]. Активність ферменту перераховували на мг білка в секретованій слині.

Ізолювання ацинарних клітин підщелепної слинної залози

In vitro дослідження впливу ендоканабіноїдів проводили на ізольованих ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів. Ацинуси ізолювали з тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині, який містив колагеназу (тип I, 320 mU/mg), за методикою, описаною раніше [17]. Інкубували ацинуси у зовнішньоклітинному розчині без (контроль) та з вмістом агоніста протягом 15 хв.

Одержання фракції мембранних везикул секреторних клітин слинних залоз

Після інкубації ізольовані ацинуси ресуспензували та гомогенізували з постійним охолодженням за допомогою гомогенізатора Поттера–Ельвейга у *mpic*-HCl-буфері (10 мМ, pH 7,2). Рештки клітин і ядра осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 2 500 *g* [18]. Для отримання мікросомальної фракції, що містить везикули плазматичної мембрани (ПМ) та ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР), пост'ядерний супернатант центрифугували протягом 30 хв при 12 000 *g* .

Визначення АТФ-азних активностей мембранних везикул секреторних клітин слинних залоз

Визначення активності АТФ-азних систем мембрани секреторних клітин проводили за раніше описаною методикою [18]. Na^+, K^+-АТФ-азну активність розраховували за різницею між сумарною та оуабаїн-чутливою (1 ммоль/л оуабаїну в середовищі інкубації) АТФ-азними активностями.

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

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Секрет слинних залоз є рідиною, що містить електроліти і складну суміш білків. Слина формується у два етапи. Первинна рідина, що секретується ацинарними клітинами, є плазмоподібною ізотонічною рідиною (етап 1). Цей NaCl-багатий розчин поступово модифікується при проходженні через протокову систему, де NaCl реабсорбується, коли K^+ та HCO_3^- екскретуються (етап 2) [14]. Оскільки канабіноїдні рецептори наявні в ацинарних клітинах і у протоковій системі ПСЗ, то вони можуть опосередковувати регуляцію двох фундаментальних механізмів секреції слини: секрецію білків і рідини ацинарними клітинами та модифікацію у протоках залози первинної слини.

Для активації канабіноїдних рецепторів типу CB1 та CB2 ми використовували їхній синтетичний агоніст WIN 55212-2 у концентрації 5 мкМ. *In vivo* нами показано, що одноразове нанесення розчину цього агоніста (по 20 мкл) безпосередньо на поверхню залози призводить до статистично достовірного зниження швидкості слиновиділення уже на 5-й і 10-й хв у середньому на 42±11% ($p<0,05$ n=5) та 45±9% ($p<0,01$ n=8) відповідно порівняно з ефектом нанесення фізіологічного розчину на поверхню залози (рис. 1).

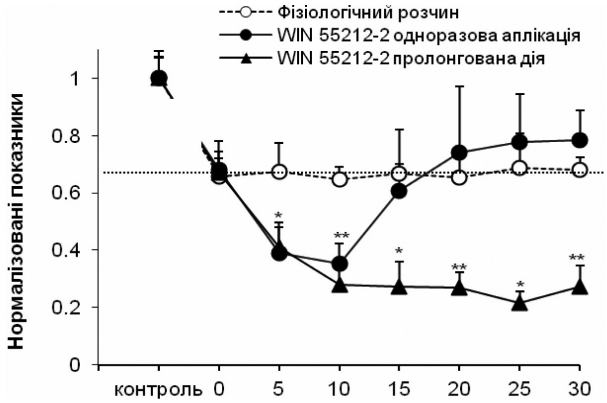

Рис.1. Динаміка базального слиновиділення підщелепною слинною залозою за умов одноразової та тривалої аплікації розчину WIN 55212-2. * – P<0,05, ** – P<0,01 порівняно з аплікацією фізіологічного розчину

Fig. 1. Dynamics of basal salivation by submandibular salivary gland under the conditions of single and prolonged application of WIN 55212-2. * – P<0,05, ** – P<0,01 versus the saline-treated group

У випадку одноразового нанесення агоніста нами виявлено, що починаючи з 10-ї хв після припинення дії WIN 55212-2 швидкість базального слиновиділення протягом 5–10 хв поверталася до контрольного рівня (рис. 1). Отже, одноразова аплікація агоніста канабіноїдних рецепторів обох типів призводить до значного, проте короткочасного пригнічення базального слиновиділення. Недовготривалий ксеростомічний ефект, на нашу думку, зумовлений тим, що, як відомо [39], ендоканабіноїди – це ліпідні молекули і вони тому не нагромаджуються у секреторних везикулах, а їхні синтез і деградація зазнають швидких узгоджених у часі та просторі регуляторних впливів.

За умов пролонгованої аплікації розчину WIN 55212-2 безпосередньо на поверхню залози спостерігали статистично достовірне пригнічення швидкості слиновиділення на 5, 10, 15, 20, 25, 30 хв у середньому на 39±7% ($p<0,05$ n=7), 57±13% ($p<0,01$ n=8), 59±19% ($p<0,05$ n=4), 59±11% ($p<0,01$ n=10), 68±12% ($p<0,05$ n=3), 60±16% ($p<0,01$ n=7) відповідно порівняно з ефектом прикладання фізіологічного розчину безпосередньо на поверхню залози (рис.1). Слід зазначити відсутність до-

стовірної різниці між інтенсивністю базального слиновиділення у діапазоні 10–30 хв. Отже, навіть за умов пролонгованого введення ендоканабіноїду максимальний пригнічувальний ефект досягається на 10 хв після початку дії WIN 55212-2, проте, на відміну від ефекту однієї аплікації, за умов постійного введення речовини не відбувається відновлення нормального рівня слиновиділення.

Підсумовуючи, за умов тривалої активації канабіноїдних рецепторів обох типів спостерігається більш виражене тривале пригнічення базального слиновиділення ПСЗ. Тобто хронічне введення агоніста CBRs супроводжується вираженим ксеростомічним ефектом. Слід зазначити, що зниження інтенсивності нестимульованого слиновиділення було виявлене у підлітків після вживання марихуани [16, 35, 41]. Згідно з існуючими теоріями механізмів нестимульованого або базального слиновиділення, постійне вивільнення невеликої кількості слини у ротову порожнину зумовлене квантовим вивільненням ацетилхоліну із парасимпатичних нервових закінчень [5]. Враховуючи це, ймовірно, що в основі виявленого пригнічення слиновиділення є CBRs-опосередковане пригнічення вивільнення ацетилхоліну (ретроградний сигнал). Адже відомо, що *in vivo* анандамід пригнічує метахолін-стимульовану секрецію [33], а WIN 55212-2 – пілокарпін-стимульоване слиновиділення [2]. Крім того, іншими авторами показано, що CB1 рецептори опосередковують пресинаптичне інгібування вивільнення ацетилхоліну шляхом модуляції автономної нейротрансмісії до слинних залоз, що призводить до зменшення потоку крові до ПСЗ [19, 28]. Ми припускаємо, що таке зниження кровопостачання буде викликати зменшення водозабезпечення базальної частини ацинарних клітин. Останнє буде призводити до сповільнення транспорту води в ацинарний люмен і спричинювати зниження швидкості базального слиновиділення.

Відомо, що електролітний склад слини підтримує осмолярність на певному рівні та створює оптимальне значення pH, необхідне для роботи ферментів ротової порожнини [29]. Ми показали, що пролонгована активація канабіноїдних рецепторів агоністом WIN 55212-2 призводить до незначного закислення (на 0,5–0,8) секретованої слини підщелепною слинною залозою (рис. 2) порівняно з аплікацією фізіологічного розчину безпосередньо на поверхню залози, що найбільш імовірно

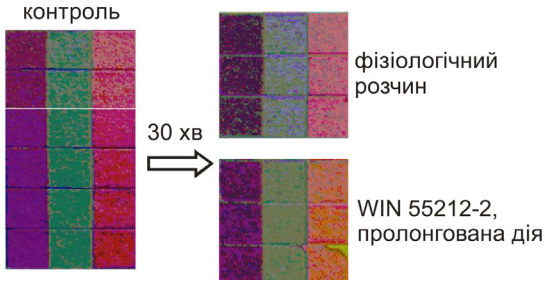

Рис. 2. Вплив пролонгованої аплікації WIN 55212-2 на значення pH секретованої слини підщелепною слинною залозою

Fig. 2. Effect of prolonged application of WIN 55212-2 on the pH of saliiva secreted by submandubular salivary gland

пов'язано зі змінами концентрації електролітів у слині (зокрема, бікарбонатів, які забезпечують її лужність) [29], або зі змінами концентрації протеїнів, що також характеризуються значною буферною ємністю [6]. Крім того, ймовірно, що й інші системи, які забезпечують транспорт іонів через плазматичну мембрану (Ca^{2+}-активовані K^+-канали, Na^+/K^+-АТФ-аза та $Na^+/K^+/2Cl^-$-котранспортер базолатеральної мембрани та Ca^{2+}-активовані Cl^--канали люменальної мембрани) можуть

змінювати свою активність під впливом канабіноїдів, оскільки останні впливають на ліпідну текучість плазматичної мембрани. Причому зміна їхньої активності буде відображатись у змінах pH слини.

Попередніми дослідженнями показано, що активація Ca^{2+} залежних K^+-каналів супроводжується відкриванням Cl^--каналів апікальної мембрани секреторних клітин і витоку Cl^- з клітини в ацинарний люмен. Існуюча модель, яка описує секрецію рідини в клітинах слинних залоз, підкреслює, що нагромадження Cl^- у люмені стимулює транспорт Na^+ в люмен через міжклітинні щільні зв'язки [40, 15, 32], унаслідок чого створюється потужний [NaCl]-опосередкований осмотичний градієнт, який спричиняє витік води з клітин у люмен і формування первинної слини. На підтвердження останнього нами було виявлено істотне транзієнтне зменшення концентрації Na^+ у первинній слині за умов активації канабіноїдних рецепторів [2]. Враховуючи це, у даній роботі ми проводили аналіз ефектів ендоканабіноїдів на неорганічні складові кінцевої слини *in vivo*.

Нами виявлено відсутність достовірних змін концентрації іонів калію, натрію та фосфатів у вторинній слині, секретованій ПСЗ за умов пролонгованої активації канабіноїдних рецепторів (див. таблицю). Відмінність ефектів ендоканабіноїдів на неорганічний склад первинної та вторинної слини, на нашу думку, зумовлена тим, що активація CBRs ацинарних клітин призводить до пригнічення процесів, пов'язаних із функціонуванням у першу чергу ацинарних клітин, які безпосередньо відповідають за утворення та секрецію рідинного компоненту слини, тоді як функціонування протокових клітин залози, які контролюють електролітний вміст слини, не зазнає змін.

Електролітний склад слини, секретованої підщелепною слинною залозою за умов пролонгованої активації канабіноїдних рецепторів

Electrolyte content of saliva secreted by submandibular salivary gland in the conditions of prolonged activation of cannabinoids receptors

Електроліти, мМ	Фізіологічний розчин					WIN 55212-2, 5мкМ				
	Контроль	0 хв	10 хв	20 хв	30 хв	Контроль	0 хв	10 хв	20 хв	30 хв
K^+	67±5 (n=7)	95±6 (n=6)	94±6 (n=6)	84±6 (n=6)	91±3 (n=6)	63±6 (n=7)	73±6 (n=8)	80±8 (n=7)	86±10 (n=7)	98±10 (n=8)
Na^+	0,9±0,1 (n=8)	1,6±0,1 (n=8)	2,4±0,4 (n=6)	2,3±0,5 (n=5)	3,4±0,9 (n=3)	0,4±0,1 (n=10)	1,9±0,2 (n=9)	3,5±0,4 (n=9)	4,2±0,7 (n=7)	5,8±0,9 (n=8)
Ca^{2+}	0,54±0,07 (n=11)	0,85±0,15 (n=6)	0,84±0,09 (n=10)	0,82±0,09 (n=8)	0,72±0,07 (n=10)	0,48±0,07 (n=11)	0,82±0,12 (n=9)	0,97±0,18 (n=14)	1,19±0,19* (n=8)	1.21±0,28* (n=8)
P^{2+}	0,20±0,03 (n=6)	0,28±0,05 (n=6)	0,24±0,04 (n=6)	0,23±0,07 (n=6)	0,25±0,06 (n=5)	0,21±0,07 (n=6)	0,23±0,04 (n=7)	0,25±0,05 (n=7)	0,25±0,06 (n=7)	0,31±0,07 (n=6)

Примітка. * – P<0,05 порівняно з аплікацією фізіологічного розчину.
* – P<0,05 versus the saline-treated group.

Також відомо, що епітеліальний трансклітинний транспорт кальцію важливий у підтриманні кальцієвого гомеостазу організму. Функціональну важливість транспортування кальцію в екзокринну рідину виявлено у секреторному епітелії молочної залози з поживною метою (концентрація кальцію в молоці кролика може сягати 100 мМ) [36]. Однак для інших типів секреторного епітелію показано, що внаслідок преципітації кальцію формуються кальцієві камені, які виявлено у протоках печінки [22], жовчному міхурі [20], в підшлунковій залозі [30] та протоках слинних залоз [11].

Ca^{2+}, що вивільняється в ацинарний люмен, може діяти як посередник, котрий впливає на прилягаючі клітини через взаємодію з Ca^{2+}-чутливим рецептором. Зокрема, Рікарді та співавт. [10] показали, що кальцій, який вивільняється з ацинарних клітин підшлункової залози, регулює секрецію рідини епітеліальними протоковими клітинами, в яких присутній кальцієвий рецептор. Крім того, нещодавно було показано наявність трансепітеліального транспорту Ca^{2+} після агоніст-індукованої стимуляції слизової шлунка [13]. Так, Каропо та співавт., використовуючи розташовані у базолатеральній і люменальній частині ацинарної клітини Ca^{2+}-чутливі мікроелектроди, виміряли зміни концентрації кальцію на базолатеральному боці та в люмені епітелію. Ними показано наявність потоку Ca^{2+} з крові до люмену і висловлено припущення про те, що Ca^{2+}, який досягає люмен, має здатність діяти як міжклітинний месенджер, який здатний модифікувати функціонування сусідніх клітин шляхом активації Ca^{2+}-сенсорного рецептора [9, 13].

У слині концентрація катіонів кальцію становить близько 1 мМ [27]. За умов пролонгованої активації канабіноїдних рецепторів підщелепної слинної залози розчином WIN 55212-2 (аплікація кожні 5 хв) ми спостерігали достовірне зростання концентрації кальцію в секретованій слині на 20 і 30 хв у середньому на 47±5% ($p<0,05$ $n=8$) та 64±7% ($p<0,05$ $n=7$) відповідно порівняно з аплікуванням фізіологічного розчину контрольній групі тварин (рис.3).

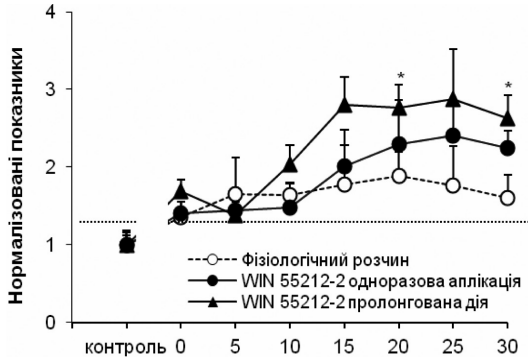

Рис. 3. Динаміка зміни концентрації кальцію в секретованій слині підщелепною слинною залозою за умов одноразової та пролонгованої аплікації розчину WIN 55212-2. * – P<0,05 порівняно з аплікацією фізіологічного розчину

Fig. 3. Dynamics of changes in calcium concentration in final saliva screted by submandibular salivary gland under the conditions of prolonged application of WIN 55212-2. * – P<0,05 versus the saline-treated group

За умов одноразової аплікації розчину агоніста безпосередньо на поверхню залози достовірних змін концентрації катіонів кальцію слини нами не було виявлено.

У секреторному епітелії кальцій вивільняється в люмен через апікальну мембрану шляхом екзоцитозу секреторних везикул або активним транспортом Ca^{2+}. Транспорт кальцію можливий і через парацелюлярний шлях, який тканинно-специфічно корелює із цитозольною концентрацією цього катіона [6].

Згідно з даними літератури, вивільнення кальцію із клітин агоністстимульованої підшлункової залози корелює з інтенсивністю секреції ними білка, що вказує на вивільнення кальцію в основному за екзоцитозним механізмом [25, 38]. Слід зазначити, що чималий вміст кальцію у секреторних везикулах різних екзокринних клітин є дуже високим. Останнє свідчить про те, що екзоцитоз секреторних везикул може робити важливий внесок у трансклітинний транспорт кальцію. Зокрема, процес вивільнення кальцію шляхом екзоцитозу секреторних везикул прямо показаний в ацинарних клітинах ПСЗ, з використаням індикатор-декстранового методу.

Швидкість екзоцитозного вивільнення кальцію була неочікувано високою: кілька сотень мікромоль загального клітинного кальцію за хв [7]. Іншим механізмом екструзії кальцію з апікальної мембрани клітин секреторного епітелію може бути його вивільнення за рахунок роботи Ca^{2+}-АТФ-ази ПМ. Показано, що вивільнення кальцію опосередковане кальцієвими помпами, переважно відбувається з апікальних частин ацинарних клітин підшлункової залози. Імунофлюоресцентним методом показано найвищу щільність Ca^{2+}-АТФ-аз ПМ у люмінальній, а також у латеральних частинах панкреатичних ацинарних клітин [24]. Подібний розподіл Ca^{2+}-помп виявлено в ацинарних і протокових клітинах ПСЗ [24]. Обидва типи транспорту охарактеризовано в ацинарних клітинах ПСЗ [7].

Нами за умов пролонгованої аплікації розчину WIN 55212-2 на поверхню залози виявлено достовірне зростання концентрації загального білка в секретованій слині уже на 10 хв, яке в середньому становило 52±9% ($p<0,05$, n=10) порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4). За цих же умов на 15, 20 і 25 хв зростання концентрації загального білка у слині було більш вираженим і становило в середньому 88±15% ($p<0,05$, n=4), 72±9% ($p<0,01$, n=9) та 89±14% ($p<0,05$, n=3) відповідно порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4). Причому ми не спостерігали достовірних змін концентрації білка у секретованій слині за умов одноразової аплікації розчину агоніста.

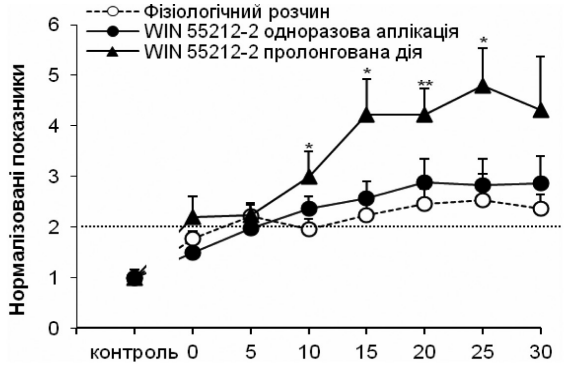

Рис. 4. Динаміка зміни концентрації загального білка в секретованій слині підщелепною слинною залозою за умов одноразової та постійної аплікації розчину WIN 55212-2. * – P<0,05, ** – P<0,01 порівняно з аплікацією фізіологічного розчину

Fig. 4. Dynamics of changes in total protein concentration in saliva secreted by submandibular salivary gland in the conditions of single and prolonged application of WIN 55212-2. * – P<0,05, ** – P<0,01 versus the saline-treated group

Значна частина кальцію в екзокринних секреторних рідинах (слина, панкреатичний сік) буферується, залишаючи лише частину кальцію в іонізованому стані. Відомо, що певний мінімальний рівень вільного кальцію необхідний для ефективного травлення. Зокрема, вільний кальцій є необхідним для активації амілази, яка секретується слинними та підшлунковою залозами [4, 34, 37]. Враховуючи це, ми визначали активність α-амілази, секретованої ізольованими ацинарними клітинами в умовах *in vitro.* Нами виявлено зростання активності α-амілази на 15-й хв інкубування ацинарних клітин у базовому зовнішньоклітинному розчині, що містив WIN 55212-2 (5 мкМ) у середньому на 25±5% ($P<0,05$, n=12) порівняно з контролем (рис. 5).

Відомо, що внаслідок β-адренергічної стимуляції в ацинарних клітинах підвищується цитозольний вміст цАМФ, що призводить до стимуляції секреції слини та протеїнів. *In vivo* анандамід пригнічує норепінефрин-індуковану секрецію слини ПСЗ та *in vitro* значно зменшує форсколін-індуковане зростання вмісту цАМФ [33].

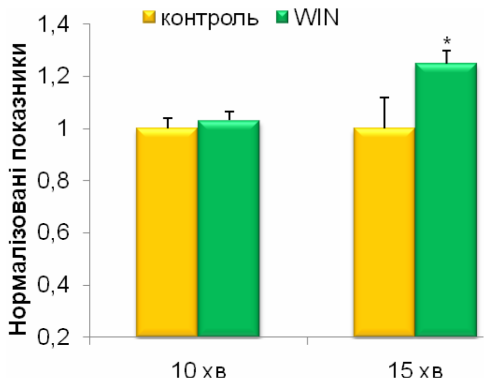

Рис. 5. Вплив WIN 55212-2 на активність α-амілази, секретованої ізольованими ацинусами підщелепної слинної залози. * – P<0,05 порівняно з контролем

Fig. 5. Effect of WIN 55212-2 on the activity of α-amylase in saliva secreted by acinar cells of submandibular salivary gland. * – P<0,05 versus control

Також показано, що анандамід не впливає на базальний рівень цАМФ у тканині ПСЗ щурів [33]. Крім того, існують протиріччя у даних різних авторів щодо впливу канабіноїдів на аденілатциклазний сигнальний шлях. Так численними дослідженнями [21] показано здатність канабіноїдів пригнічувати активність аденілатциклази шляхом зниження клітинного рівня цАМФ. Однак іншими дослідженнями показано, що канабіноїди збільшують акумуляцію базальної цАМФ у різних системах [31, 21]. Цікавий факт, що анандамід індукує концентраційно-залежне зростання цАМФ і збільшення вивільнення α-амілази, але пригнічує Na^+, K^+-АТФ-азну активність мембранних везикул секреторних клітин привушної слинної залози, опосередковане через активацію СВ1 типу канабіноїдних рецепторів [12].

На нашу думку, аденілатциклазний сигнальний шлях унаслідок активації канабіноїдних рецепторів ПСЗ найбільш імовірно не зазнає пригнічення, а навпаки – призводить до посилення секреції амілази. Такий ефект можливий унаслідок активації депокерованого надходження Ca^{2+} у клітини при активації канабіноїдних рецепторів обох типів [3]. Адже відомо, що депокерований вхід Ca^{2+} в ацинарні клітини привушної слинної залози мишей може збільшувати внутрішньоклітинний рівень цАМФ, опосередковано через Ca^{2+}-чутливу аденілатциклазу типу 8 [42]. Цей ефект також спостерігався і в інших типах клітин [29].

Таким чином, підвищення активності α-амілази та концентрації секретованого білка може зумовлювати вивільнення кальцію у слину через трансклітинний екзоцитозний шлях із вмістом секреторних везикул ацинарних клітин ПСЗ.

Також нами показано, що внаслідок інкубування ізольованих ацинарних клітин ПСЗ протягом 15 хв у базовому зовнішньоклітинному розчині із вмістом WIN 55212-2 (5мкМ) відбувається достовірне зростання активності Ca^{2+}-АТФ-ази ПМ секреторних клітин у середньому на 26±6% (P<0,05, n=6) порівняно з контролем (рис. 6). Це свідчить про задіяння і активного транспорту у трансклітинне вивільнення Ca^{2+} в люмен слинної залози за умов активації канабіноїдних рецепторів. Проте нами також виявлено, що внаслідок інкубації ізольованих ацинарних клітин ПСЗ протягом 15 хв з WIN 55212-2 відбувається достовірне пригнічення активності Na^+/K^+-АТФ-ази ПМ та Ca^{2+}-АТФ-ази ЕПР у середньому на 41±6% (P<0,05, n=7) та 44±6% (P<0,05, n=6) відповідно порівняно з контролем (рис. 6).

Одержані дані свідчать, що активація канабіноїдних рецепторів призводить до пригнічення секреції рідинного компоненту слини внаслідок інгібування активності

іон-транспортувальних систем як ПМ, так і ЕПР. Одержані нами дані узгоджуються з даними інших авторів. Зокрема, показано, що пригнічення активності Na^+-K^+- та Mg^{2+}-Ca^{2+}-АТФ-ази під впливом (−)-Δ^9-ТНС у субклітинних фракціях мозку миші [8], а також Na^+-K^+-АТФ-ази тонкої кишки щура – під впливом D-тетрагідроканабінолу [23].

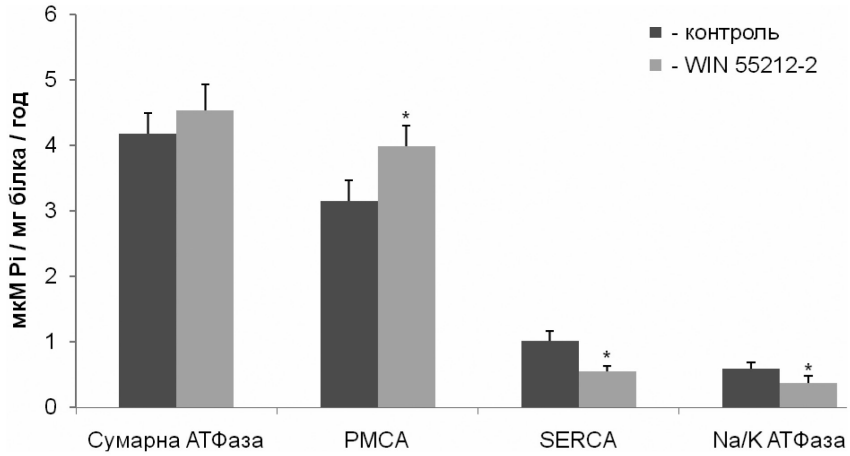

Рис. 6. Вплив WIN 55212-2 на АТФ-азні активності мембранних везикул секреторних клітин підщелепної слинної залози. * – P<0,05, ** – P<0,01 порівняно з контролем. PMCA – Ca^{2+}-АТФ-аза плазматичної мембрани, SERCA – Ca^{2+}-АТФ-аза ендоплазматичного ретикулуму

Fig. 6. Effect of WIN 55212-2 on the ATP-ase activity measured in membrane vesicles of submandibular salivary gland. * – P<0,05, ** – P<0,01 versus control. PMCA – Ca^{2+}-ATP-ase of plasma membrane, SERCA – Ca^{2+}-ATP-ase of endoplasmic reticulum

Отже, активація канабіноїдних рецепторів обох типів призводить до пригнічення секреції рідкої компоненти слини, що супроводжується інгібуванням Na^+/K^+-АТФ-ази та Ca^{2+}-АТФ-ази ЕПР, зміною електролітного складу слини та посиленням секреції білкової компоненти.

1. *Копач О., Федірко Н.* Кальцій-залежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз у разі дії агоністів холінергічної природи. **Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол**, 2004; 37: 205–212.
2. *Нецик О., Гричан Н., Копач О., Федірко Н.* Роль канабіноїдних рецепторів у регуляції слиновиділення підщелепною слинною залозою щурів. **Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол**, 2009; 50: 131–143.
3. *Нецик О., Федірко Н.* Ендоканабіноїди регулюють процеси слиновиділення через модуляцію процесів кальцієвої сигналізації. **Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол**, 2010; 52: 152–162.
4. *Agarwal R.P., Henkin R.I.* Metal binding characteristics of human salivary and porcine pancreatic amylase. **J. Biol. Chem**, 1987; 262: 2568– 2575.
5. *Ambudkar I.S.* Regulation of calcium in salivary gland secretion. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med**, 2000; 11(1): 4–25.
6. *Ashby M.C., Tepikin A.V.* Polarized calcium and calmodulin signaling in secretory epithelia**. Physiol. Rev**, 2002; 82: 701–734.

7. *Belan P., Gardner J., Gerasimenko O.* et al. Isoproterenol evokes extracellular Ca^{2+} spikes due to secretory events in salivary gland cells. **J. Biol. Chem**, 1998; 273: 4106–4111.
8. *Bloom A.S., Haavik C.O., Strehlow D.* Effects of D^9-tetrahydrocannabinol on ATPases in mouse brain subcellular fractions. **Life Sci**,1978; 23:1399–404.
9. *Brown E.M., MacLeod R.J.* Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. **Physiol. Rev,** 2001; 81: 239–297.
10. *Bruce J.I., Yang X., Ferguson C.J.* et al. Molecular and functional identification of a Ca^{2+} (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. **J. Biol. Chem,** 1999; 274: 20561–20568.
11. *Burnstein L.S., Boskey A.L., Tannenbaum P.J* et al. The crystal chemistry of submandibular and parotid salivary gland stones. **J. Oral. Pathol**, 1979; 8: 284–291.
12. *Busch L., Sterin-Borda L., Borda E.* Expression and biological effects of CB1 cannabinoid receptor in rat parotid gland. **Biochemical Pharmacology**, 2004; 68: 1767–1774.
13. *Caroppo R., Gerbino A., Debellis L*e t al. Asymmetrical, agonist-induced fluctuations in local extracellular [Ca^{2+}] in intact polarized epithelia. **EMBO J,** 2001; 20: 6316–6326.
14. *Catalan M.A., Nakamoto T., Melvin J.E.* The salivary gland fluid secretion mechanism. **The Journal of Medical Investigation**, 2009; 56: 192–196.
15. *Cook D.I., Van Lennep E.W., Roberts M.L., Young J.A*. Secretion by the major salivary glands. **Physiology of the Gastrointestinal Tract.** Ed. LR Johnson, New York: Raven Press, 1994. 1061–17 p.
16. *Darling M.R*. Cannabis abuse and oral health care: review and suggestions for management. **SADJ,** 2003; 58(5): 189–90.
17. *Fedirko N., Klevets M., Vats Ju.* Isolated acini as an object for the investigation of the Ca^{2+}-transporting system of the secretory cell membranes. **Neurophysiology**, 2000; 32 (3): 183–184.
18. *Fedirko N.V., Kruglikov I.A., Kopach O.V.* et al. Changes in functioning of rat submandibular salivary gland under streptozotocin-induced diabetes are associated with alterations of Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} transporting pumps. **BBA**, 2006; 1762: 294–303.
19. *Fernandez-Solari J., Prestifilippo J.P., Vissio P.* et al. Anandamide injected into the lateral ventricle of the brain inhibits submandibular salivary secretion by attenuating parasympathetic neurotransmission. **Braz. J. Med. Biol. Res**, 2009; 42(6): 537–544.
20. *Gleeson D., Hood K.A., Murphy G.M., Dowling R.H.* Calcium and carbonate ion concentrations in gallbladder and hepatic bile. **Gastroenterology**, 1992; 102: 1707–1716.
21. *Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I.* et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol. Rev**, 2002; 54(2): 161–202.
22. *Kim M.H., Sekijima J., Lee S.P.* Primary intrahepatic stones. **Am. J. Gastroenterol**, 1995; 90: 540–548.
23. *Laurent B., Roy P.E., Gailis L.* Inhibition by D 1-tetrahydrocannabinol of a Na^+-K^+ transport ATPase from rat ileum. Preliminary report. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, 1974; 52: 1110–1113.
24. *Lee M.G., Xu X., Zeng W.* et al. Polarized expression of Ca^{2+} pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of $[Ca^{2+}]_i$ waves. **J. Biol. Chem**, 1997; 272: 15771–15776.
25. *Marteau C., Gerolami A.* Influence of hypercalcemia on ionized calcium concentration in pancreatic juice of the dog. **J. Lab. Clin. Med**, 1994; 123: 565–573.
26. *Massa F., Storr M., Lutz B.* The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. **J. Mol. Med**, 2005; 83: 944–954.
27. *Matsuo S., Lagerlof F.* Relationship between total and ionized calcium concentrations in human whole saliva and dental plaque fluid. **Arch. Oral. Biol**, 1991; 36: 525–527.
28. *McConnel W.R., Borzelleca J.F*. A study of the mechanism of transport of delta^9-tetrahydrocannabinol in the rat submaxillary gland *in vitro*. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther,** 1978; 235(2): 180–186.

29. *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.
30. *Moore E.W., Verine H.J.* Pancreatic calcification and stone formation: a thermodynamic model of calcium in pancreatic juice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol**, 1987; 252: G707–G718.
31. *Pertwee R.G.* The central neuropharmacology of cannabinoids. **Pharmacol. Ther,** 1988; 36: 189–261.
32. *Petersen O.H., Petersen C.C.H., Kasai H.* Calcium and hormone action. **Ann. Rev. Physiol**, 1994; 56: 297–319.
33. *Prestifilippo J.P., Fernandez-Solari J., de la Cal, Iribarne M.* et al. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptor. **Exp Biol Med**., 2006; 231: 1421–1429.
34. *Rinderknecht H.* Pancreatic secretory enzymes. In: **The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease**. Ed. by Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E. Reber H.A. and Scheele G.A. New York: Raven, 1993. 219 p.
35. *Schramm W., Smith R.H., Craig P.A., Kidwell D.A.* Drugs of abuse in saliva: a review. **J. Anal. Toxicol,** 1992; 16(1): 1–9.
36. *Shennan D.B., Peaker M.* Transport of milk constituents by the mammary gland. **Physiol. Rev**., 2000; 80: 925–951.
37. *Sky-Peck H.H., Thuvasethakul P.* Human pancreatic alpha-amylase. II. Effects of pH, substrate and ions on the activity of the enzyme. **Ann. Clin. Lab. Sci**, 1977; 7: 310–317.
38. *Teufel H., Stock P., Rohrmoser H., Forell M.M.* Calcium secretion in the isolated perfused canine pancreas**. Res Exp Med**., 1979; 176: 51–68.
39. **The endocannabinoid system.** Handbook. ECSN, 2009. 96 p. http://www.endocannabinoid.net/ECSHandbook
40. *Turner R.J.* Mehanisms of fluid secretion by salivary glands. **Ann. NY Acad. Sci**, 1993; 694: 24–35.
41. *Verstraete A.G.* Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. **Forensic Sci. Int**, 2005; 150(2–3): 143–150.
42. *Watson E.L., Jacobson K.L., Singh J.C.* et al. The type 8 adenylyl cyclase is critical for Ca^{2+} stimulation of cAMP accumulation in mouse parotid acini. **J. Biol. Chem**, 2000; 275: 14691–91469.

CB1 AND CB2 CANNABINOIDS RECEPTORS REGULATE BASAL SALIVATION AND PROTEIN-ELECTROLYTE SALIVA CONTENT VIA MODULATION OF ATPase SYSTEMS FUNCTIONING IN THE ACINAR CELLS FROM SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND

O. Netsyk[1], O. Kopach[2], N. Fedirko[1]

[1]Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: olga.nets@gmail.com
[2]O. O. Bohomoletz Institute of Physiology, 4, Bogomoletz St., Kyiv 01024, Ukraine

We showed that activation *in vivo* of CB1 та CB2 cannabinoids receptors (CBRs) of submandibular salivary gland with selective agonist WIN 55212-2 caused suppression of basal salivation and alteration of saliva content. Similar type of changes were observed after single administration of endocannabinoid and in the conditions of prolonged agonist use. Maximal suppression we observed at 10 min after single application of WIN 55212-2 (~ 45%) and ~ 60% – in the conditions of prolonged administration of

an agonist. Prolonged treatmnent with WIN 55212-2 leads to acidification of secreted saliva (pH ~ 9.0-8.8), increase in saliva Ca^{2+} and protein concentration as well as α-amylase activity. Any significant changes of K^+, Na^+, P^{2+} concentrations in saliva were observed upon activation of CBRs. We also showed that decrease of basal salivation is accompanied by inhibition of Na^+/K^+-ATPase and endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase but increased activity of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase. Therefore upon activation of CBRs: i) c-AMP-mediated signaling system that contribute to the protein secretion increases activity; ii) transcellular H_2O transport that contribute to the fluid secretion is reduced forming the base of inbition of basal salivation; iii) electrolyte saliva content remains unaltered that can be attributed to the unaltered functioning of the ductal cells unlike acinar cells. Concluding, we suggest that observed changes of saliva pH and activity of ATPase systems in acinar cells contribute to the CBRs-mediated inhibition of basal salivation provided by submandibular salivary gland.

Key words: cannabinoid receptors, WIN 55212-2, submandibular salivary gland, salivation, ATPase activity.

КАННАБИНОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ CB1 И CB2 РЕГУЛИРУЮТ БАЗАЛЬНОЕ СЛЮНОВЫДЕЛЕНИЕ, А ТАКЖЕ БЕЛКОВО-ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ СОСТАВ СЛЮНЫ ПУТЕМ МОДУЛЯЦИИ РАБОТЫ АТФ-азных СИСТЕМ АЦИНАРНЫХ КЛЕТОК ПОДЧЕЛЮСТНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О. Нецык[1], О. Копач[2], Н. Федирко[1]

[1]Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: olga.nets@gmail.com

[2]Институт физиологии им. А. А. Богомольца,
ул. Богомольца, 4, Киев 01024, Украина

Установлено, что активация в условиях *in vivo* CB1 и CB2 каннабиноидных рецепторов (CBRs) подчелюстной слюнной железы их селективным агонистом WIN 55212-2 приводит к угнетению базального слюновыделения, а также к изменению состава секретированной слюны. Изменения аналогичного характера наблюдаются как при одноразовом приложении эндоканнабиноида, так и при условии продолжительного действия агониста. Максимальный угнетающий эффект эндоканнабиноидов наблюдался на 10 мин после активации CBRs как в случае одноразового введения WIN 55212-2 (~ 45%), так и при многоразовом введеннии агониста (~ 60%). Продолжительное действие WIN 55212-2 вызывает закисление секретированной слюны (pH ~ 9.0–8.8), повышение концентрации кальция, общего белка, а также амилазной активности слюны. Не обнаружены достоверные изменения концентраций K^+, Na^+, P^{2+} в секретированной слюне при условии продолжительной активации CBRs. Обнаружено, что угнетение базального слюновыделения сопровождается ингибированием активности Na^+/K^+-АТФ-азы, Ca^{2+}-АТФ-азы эндоплазматического ретикулума и усилением работы Ca^{2+}-АТФ-азы плазматической мембраны. Таким образом, при условиях активации CBRs: i) повышается активность цАМФ-опосредованной сигнальной системы, задействованной в секреции

белкового компонента слюны; ii) нарушается трансклеточный транспорт H_2O, что является причиной снижения интенсивности базального слюновыделения; iii) не меняется электролитный состав слюны, что свидетельствует об отсутствии существенных изменений в функционировании протоковых клеток железы в отличие от ацинарных клеток. Обнаруженные изменения pH слюны а также активности АТФ-азных систем ацинарных клеток, являются вероятной причиной CBRs-опосредованного угнетения базального слюновыделения подчелюстной слюнной железой.

Ключевые слова: каннабиноидные рецепторы, WIN 55212-2, подчелюстная слюнная железа, слюновыделение, АТФ-азная активность.

Одержано: 10.09.2010