



УДК 612.3:591.413.2

РОЛЬ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОЇ Ca^{2+} -ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОДИНИЦІ У ПРОЦЕСАХ ТРАНСДУКЦІЇ СИГНАЛУ P2Y-РЕЦЕПТОРІВ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ ДЗВІНЦЯ

О. Ю. Великопольська, В. В. Манько

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

Інгібітор $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів 2-АФБ у низьких концентраціях (1–10 мкмоль/л) спричиняє збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*, які інкубували як у номінально безкальцієвому середовищі, так і в середовищі з фізіологічною концентрацією Ca^{2+} . Цей ефект спричинений блокуванням $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів, зменшенням вхідного (відносно цитозолу) потоку Ca^{2+} і, як наслідок, зміщенням рівноваги ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці в бік нагромадження Ca^{2+} у депо. За інкубування залоз у гіперкальцієвому середовищі 2-АФБ у всіх випадках спричиняє не збільшення, а зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині. Зменшується вміст Ca^{2+} у тканині залоз, незалежно від концентрації Ca^{2+} у середовищі інкубування і за високих концентрацій 2-АФБ (20–100 мкмоль/л). Це 2-АФБ-індуковане зменшення зумовлене пригніченням Ca^{2+} -помпи, що входить до складу ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці, зменшенням вхідного потоку і зміщенням рівноваги у бік вивільнення депонованого Ca^{2+} .

У результаті додавання АТФ чи АДФ до номінально безкальцієвого середовища вміст Ca^{2+} у тканині залоз зменшується внаслідок активації P2Y-рецепторів. Наявність 2-АФБ (10 мкмоль/л) у номінально безкальцієвому середовищі запобігає АТФ-індукованому зменшенню вмісту Ca^{2+} , не впливаючи на його АДФ-індуковане зменшення у тканині. На підставі аналізу даних робиться висновок про наявність у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дзвінця двох підтипів P2Y-рецепторів. Рецептори першого підтипу ($\text{P2Y}_{\text{АТФ}}$) мають вищу спорідненість до АТФ і є спряжені з $\text{I}\Phi_3$ -чутливими Ca^{2+} -каналами. В основі трансдукції сигналу цих рецепторів лежить перехід Ca^{2+} -функціональної одиниці зі стану спокою у стан активації. Рецептори другого підтипу ($\text{P2Y}_{\text{АДФ}}$) мають більшу спорідненість до АДФ та реалізують свою дію через інший механізм. Додавання 2-АФБ до гіперкальцієвого позаклітинного середовища запобігає АТФ- і АДФ-індукованим змінам вмісту Ca^{2+} у тканині залоз внаслідок порушення цілісності ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці.

Ключові слова: 2-АФБ, P2Y- і P2X-рецептори, $\text{I}\Phi_3$ -чутливі Ca^{2+} -канали, Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулуму, ендоплазматична Ca^{2+} -функціональна одиниця, екзокринні секреторні клітини.

ВСТУП

Позаклітинні пурини (АДФ, АТФ) і піримідини (УДФ, УТФ) є важливими сигнальними молекулами, що опосередковують різноманітні біологічні ефекти через пуринові рецептори плазматичної мембрани [11, 12, 25]. Виділяють дві головні родини пуринових рецепторів: аденозинові (або P1; активуються аденозином) рецептори та P2-рецептори, що взаємодіють з АТФ, АДФ, УТФ і УДФ [18, 23]. Ґрунтуючись на різниці в молекулярній структурі та механізмах сигнальної трансдукції, P2-рецептори поділяють на дві родини: лігандкеровані іонні канали, або P2X-рецептори, та зв'язані з G-білками P2Y-рецептори. У ссавців описані сім P2X-рецепторів (P2X1–7) і вісім P2Y-рецепторів (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 і P2Y12, P2Y13, P2Y14) [9, 13, 22].

P2X-рецептори є мембранними іонними каналами, що відкриваються у відповідь на зв'язування з позаклітинними пуринами. Всі P2X-рецептори є проникними для малих моновалентних катіонів, деякі мають значну проникність для Ca^{2+} або аніонів. У багатьох клітинах активація гомомерних P2X7-рецепторів спричинює зростання проникності для великих органічних катіонів, у тому числі деяких флуоресцентних барвників.

Кожна субодиниця P2X-рецепторів має два трансмембранні домени, розділені позаклітинним доменом (~280 амінокислотних залишків). Канали формуються як тримери. Деякі клітини експресують більше, ніж один тип P2X-рецепторів, утворюючи гомо- і гетеротримери. P2X-рецептори ідентифіковані у нейронах, клітинах глії, епітелію, ендотелію, кісток, м'язів і кровотворних тканин [13, 22].

P2Y-рецептори плазматичної мембрани зв'язані з G-білками. Залежно від шляху трансдукції сигналу вони поділяються на кілька підтипів. Активація одних (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 у ссавців), зв'язаних з G_q -білком, призводить до активації фосфоліпази C, посилення синтезу IP_3 та, як наслідок, зростання $[\text{Ca}^{2+}]$ у цитозолі [18, 19]. Можливий також інший механізм трансдукції, при якому відбувається пригнічення аденілатциклази, внаслідок чого зменшується внутрішньоклітинний рівень цАМФ [18, 21]. Ці підтипи P2Y-рецепторів (P2Y12, P2Y13, P2Y14 у ссавців) зв'язані з G_i -білком. P2Y11-рецептори, які зв'язані з G_q - та G_s -білком, крім фосфоліпази C, активують і аденілатциклазу [9, 15, 16, 18].

Причому рекомбінантні P2Y-рецептори реалізують свою дію через обмежені сигнальні шляхи трансдукції (переважно через фосфоліпазу C_β і аденілатциклазу), тоді як ендогенні P2-рецептори впливають через значно ширший ряд внутрішньоклітинних сигнальних каскадів (фосфоліпазу C_β , фосфоліпазу D, фосфоліпазу A_2 , аденілатциклазу, MEK/MAP-кіназу систему, Rho-залежну кіназу) [9].

P2Y-рецептори людини поширені у більшості тканин різних органів: збудливих клітинах, нервах, гліальних клітинах і м'язах, імунних клітинах, ендо- й екзокринних клітинах, адипоцитах, кишківнику, печінці та міліарній системі, нирках, сечовому міхурі, легенях, кістках і хрящах, шкірі, ендотеліальних клітинах, органах чуття, тромбоцитах [9, 13, 14].

Попередніми дослідженнями на підставі аналізу АТФ- і АДФ-індукованих змін сумарного вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз личинок комара-дзвінця (*Chironomus plumosus*) показана наявність P2X- і P2Y-рецепторів [6]. Але питання шляхів внутрішньоклітинної трансдукції сигналу, пов'язаного з P2Y-рецепторами плазматичної мембрани цих клітин, залишалось нез'ясованим, що і було метою цієї роботи.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведені на секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дзвінця *Chironomus plumosus* L. Функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем оцінювали за зміною вмісту „мембранозв'язаного” Ca^{2+} у тканині залоз, який визначали за рівнем флуоресценції Ca^{2+} -хлортетрациклінового (Ca^{2+} -ХТЦ) комплексу. Оскільки рівень у цитозолі Ca^{2+} є значно нижчий, ніж депонованого, а спорідненість ХТЦ до Ca^{2+} становить лише 100 мкмоль/л [25], то вважається, що зміни вмісту „мембранозв'язаного” Ca^{2+} відображають його зміни у внутрішньоклітинних депо [5, 25].

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, до якого додавали хлортетрациклін (10 мкмоль/л). Після відмивання залоз від барвника вихідним позаклітинним розчином визначали інтенсивність флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу за довжини хвилі збуджуючого світла ($\lambda_{\text{збуд}}$) 380 нм. Флуоресценцію реєстрували за $\lambda_{\text{ф}}=480\text{--}530$ нм, використовуючи мікроскоп ЛЮМАМ-И1(Росія), при збільшенні 10×15 з діаметром щілини 0,1 мм. Інтенсивність світіння реєстрували за допомогою фотоелектропомножувача ФМЭЛ-1 і стосовно рівня Ca^{2+} не калібрували. Вміст депонованого Ca^{2+} виражали в умовних одиницях (у.о.), проводячи контрольні та дослідні вимірювання почергово (в однакових умовах), за однакової інтенсивності збуджуючого світла й одного і того ж підсилення сигналу від фотоелектропомножувача.

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. Залежно від завдання позаклітинний розчин модифікували: недодавали Ca^{2+} , створюючи номінально безкальцієве позаклітинне середовище, або збільшували його концентрацію до 10 ммоль/л. P2Y-рецептори активували додаванням до позаклітинного розчину АТФ і АДФ у концентрації 100 мкмоль/л. Як блокатор $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів використовували 2-аміноетоксидифенілборат (2-АФБ), який додавали до позаклітинного середовища у концентраціях 1, 10, 20, 50 і 100 мкмоль/л.

Необхідні статистичні обчислення проводили з використанням програмного пакету для персональних комп'ютерів Microsoft Office Excel, достовірність різниці між двома статистичними групами встановлювали за Стьюдентом [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджень визначали чутливість $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів досліджуваних клітин до 2-АФБ. Цю сполуку використовують як досить-таки специфічний блокатор $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів для пригнічення $\text{I}\Phi_3$ -індукованого вивільнення Ca^{2+} [19, 20]. Зокрема, у лінії гладком'язових клітин А7r5 2-АФБ інгібує $\text{I}\Phi_3$ -індуковане вивільнення Ca^{2+} (концентрація напівінгібування 36 мкмоль/л), не впливаючи на зв'язування [^3H] $\text{I}\Phi_3$ з рецептором [20]. Це інгібування не залежить від $\text{I}\Phi_3$, АТФ чи концентрації вільного Ca^{2+} у цитозолі. Але відомо, що 2-АФБ може також пригнічувати депокеровані Ca^{2+} -канали (SOC) [10], Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулуму і стимулювати неспецифічний витік Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [20].

Унаслідок додавання 2-АФБ до номінально безкальцієвого позаклітинного середовища у концентраціях 1 і 10 мкмоль/л спостерігали (рис. 1, крива 1) достовір-

не збільшення флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу у тканині залоз на $42,45 \pm 7,20$ і $61,19 \pm 9,12\%$ відповідно ($n = 8$, $P \leq 0,001$). Під впливом 2-АФБ у вищих концентраціях вміст депонованого Ca^{2+} не збільшувався, а зменшувався на 38–50%.

За фізіологічної концентрації Ca^{2+} у позаклітинному середовищі (рис. 1, крива 2) 2-АФБ статистично достовірно збільшував вміст депонованого Ca^{2+} лише у концентрації 1 мкмоль/л (на $25,24 \pm 3,90\%$; $n = 8$, $P \leq 0,001$). У концентрації 10 мкмоль/л він не спричиняв достовірних змін, а за концентрації 20–100 мкмоль/л – зниження вмісту Ca^{2+} становило 22–33% ($n = 8$, $P \leq 0,001$).

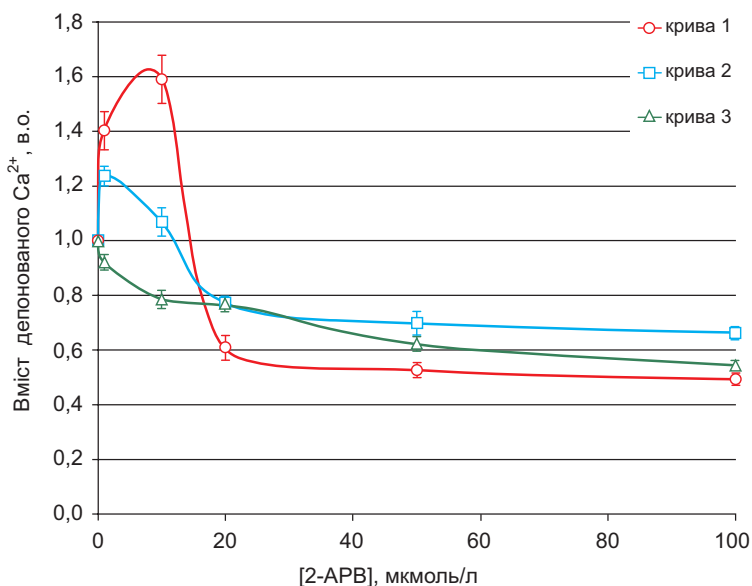


Рис. 1. Залежність 2-АФБ-індукованих змін флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу від концентрації Ca^{2+} у позаклітинному середовищі:

вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його вміст за відсутності блокатора; $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$ ммоль/л (крива 1), 1,76 ммоль/л (крива 2) або 10 ммоль/л (крива 3); $n = 8$

Fig. 1. Dependence of 2-APB-induced fluorescence changes in Ca^{2+} -CTC-complex on the concentration of Ca^{2+} in extracellular medium:

Ca^{2+} content in tissue was normalized, taking Ca^{2+} content in the absence of inhibitor as one unit; $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$ mmol/l (curve 1) and 1,76 mmol/l (curve 2) or 10 mmol/l (curve 3); $n = 8$

Вміст депонованого Ca^{2+} у тканині залоз, інкубованих у гіперкальцієвому позаклітинному середовищі (рис. 1, крива 3), внаслідок додавання 2-АФБ одразу в усіх випадках статистично достовірно зменшувався. За різних концентрацій блокатора це зменшення становило 6–44% ($n = 8$, $P \leq 0,001$).

Очевидно, зменшення вмісту Ca^{2+} за дії 2-АФБ у всіх наведених випадках зумовлене пригніченням Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму; лише внаслідок пригнічення помпи ендоплазматичного ретикулуму (а не плазматичної мембрани) вміст депонованого Ca^{2+} може збільшитися. Наявність Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму у досліджуваних клітинах підтверджена раніше із застосуванням еозину Y і тапсигаргину [5, 7, 8]. Відомо також, що 2-АФБ інгібує не лише If_3 -чутливі Ca^{2+} -канали, а й Ca^{2+} -помпу немітохондріальних Ca^{2+} -депо у лінії гладком'язових клітин A7r5 (напівмаксимальне інгібування за концентрації 91 мкмоль/л) [20].

Слід звернути увагу на те, що характер залежності змін вмісту депонованого Ca^{2+} від концентрації 2-АФБ визначається рівнем Ca^{2+} в позаклітинному середовищі (рис. 1) – зі збільшенням позаклітинної концентрації Ca^{2+} крива цієї залежності зміщується вліво. Це свідчить, на нашу думку, про наявність своєрідної конкуренції інгібування катіонами Ca^{2+} та 2-АФБ одного і того ж процесу.

Такий характер кривих можна пояснити, виходячи з концепції **Ca^{2+} -функціональної одиниці** [4]. Згідно з цією концепцією, Ca^{2+} -функціональна одиниця є динамічною системою, яка забезпечує підтримання відповідної $[\text{Ca}^{2+}]$ у цитозолі. До її складу обов'язково входить система активного і система пасивного транспортування Ca^{2+} , а також мембрана, що забезпечує компартменталізацію Ca^{2+} .

Ендоплазматична Ca^{2+} -функціональна одиниця секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* включає в себе Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулуму, $\text{I}\Phi_3$ -чутливі та р'анодинчутливі Ca^{2+} -канали. Ca^{2+} -функціональна одиниця може перебувати у трьох станах. У стані спокою встановлюється динамічна рівновага між вхідними і вихідними потоками Ca^{2+} . У стані активності вхідний потік (відносно цитозолу) переважає над вихідним, а у стані інактивації – переважає вихідний потік. Іони Ca^{2+} є не тільки катіонами, що транспортуються, але й чинниками, які забезпечують перехід Ca^{2+} -функціональної одиниці з одного стану в інший, оскільки активність Ca^{2+} -транспортувальних систем залежить від їхньої цитозольної концентрації [4].

За інкубування досліджуваних секреторних клітин у фізіологічному та номінально безкальцієвому позаклітинних середовищах ендоплазматична Ca^{2+} -функціональна одиниця перебуває, на нашу думку, у стані спокою, коли підтримується її чутливість до фізіологічних агоністів на високому рівні. Додавання блокатора $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів призводить до зміщення рівноваги у бік нагромадження депонованого Ca^{2+} . Тому за концентрації 2-АФБ 1 мкмоль/л у фізіологічному позаклітинному середовищі та 1 і 10 мкмоль/л у номінально безкальцієвому вміст депонованого Ca^{2+} збільшувався. Зменшення вмісту Ca^{2+} за вищих концентрацій блокатора зумовлені, ймовірно, пригніченням уже системи активного транспортування Ca^{2+} -функціональної одиниці – Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму. Причому інгібування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму – єдиної наявної та критично необхідної системи активного транспортування Ca^{2+} , що входить до складу ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці, остання перестає існувати.

Збільшення позаклітинної концентрації Ca^{2+} обов'язково спричиняє збільшення його рівня в цитозолі, оскільки це зміщує термодинамічну рівновагу між електрхімічними градієнтами Na^+ та Ca^{2+} , і, як наслідок, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани, який також наявний у плазматичній мембрані секреторних клітин *Chironomus plumosus* [3], починає функціонувати у зворотному режимі, транспортуючи Ca^{2+} у клітину [2]. Крім того, збільшення концентраційного градієнта Ca^{2+} повинно змінити функціонування і Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Унаслідок збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} за інкубування залоз у гіперкальцієвому позаклітинному середовищі ендоплазматична Ca^{2+} -функціональна одиниця перейде в стан стаціонарної інактивації, коли *постійний* (нетранз'єнтний) надлишок цитозольного Ca^{2+} знижує чутливість рецепторів до агоністів. Проте за таких умов знижується чутливість не лише до природних агоністів ($\text{I}\Phi_3$), але й до інгібіторів цих рецепторів (2-АФБ). Тому за гіперкальцієвого позаклітинного середовища реєструвати зміну активності $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів неможливо. Реєструється лише (за всіх концентрацій 2-АФБ) зменшення вмісту Ca^{2+} внаслідок блокування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулуму.

За фізіологічної та збільшеної позаклітинної концентрації Ca^{2+} зменшення вмісту Ca^{2+} під впливом 2-АФБ у концентрації 10 мкмоль/л, спричинене інгібуванням $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів, маскується за рахунок переходу ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці у стан стаціонарної інактивації. Очевидно, він маскується і за вищих концентрацій 2-АФБ, коли блокатор діє також на Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулулу. Але за концентрації 2-АФБ 10 мкмоль/л інгібувальний ефект на Ca^{2+} -помпу є суттєво меншим, ніж на $\text{I}\Phi_3$ -чутливі Ca^{2+} -канали. Тому у подальших дослідженнях ми використовували з метою блокування $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів 10 мкмоль/л 2-АФБ.

Наступним завданням було встановити роль $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів у внутрішньоклітинній трансдукції сигналу при активації P2Y -рецепторів плазматичної мембрани їхніми агоністами – АТФ та АДФ.

За інкубування залоз у позаклітинному середовищі з фізіологічною концентрацією Ca^{2+} під впливом АТФ і АДФ вміст Ca^{2+} не змінився (рис. 2). Аналогічні дані були отримані нами у попередніх дослідженнях, проведених з вимірюванням

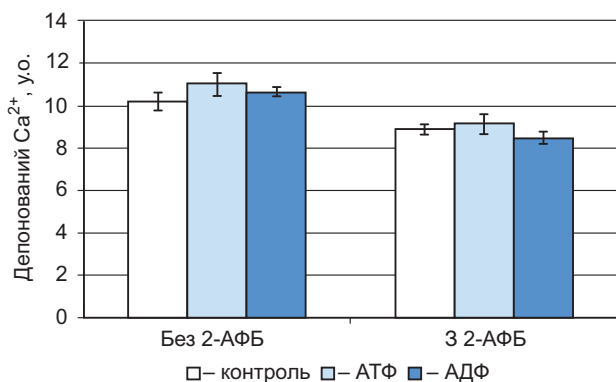


Рис. 2. Вміст депонованого Ca^{2+} за дії АТФ і АДФ у позаклітинному середовищі з фізіологічним вмістом Ca^{2+} :

вміст Ca^{2+} у депо представлений в абсолютних одиницях; $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,76$ ммоль/л, $[\text{АТФ}]_e = 100$ мкмоль/л, $[\text{АДФ}]_e = 100$ мкмоль/л, $[\text{2-АФБ}]_e = 10$ мкмоль/л; $n = 8$

Fig. 2. Content of stored Ca^{2+} under the action of ATP and ADP in the extracellular medium with physiological Ca^{2+} content:

Ca^{2+} content in the store is presented in absolute units; $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,76$ mmol / l, $[\text{ATP}]_e = 100$ micromol/l, $[\text{ADP}]_e = 100$ micromol/l, $[\text{2-APB}]_e = 10$ micromol/l; $n = 8$

сумарного вмісту Ca^{2+} у тканині залоз за допомогою арсеназо III [6]. Причиною цього є те, на нашу думку, що за фізіологічного градієнта Ca^{2+} його вивільнення з внутрішньоклітинного депо (внаслідок активації P2Y -рецепторів) компенсується його надходженням з позаклітинного середовища (внаслідок активації P2X -рецепторів).

Крім того, додавання АТФ і АДФ на фоні 2-АФБ також не призводить до змін вмісту Ca^{2+} (рис. 2). Правда, за дії 2-АФБ середньоарифметичне значення флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу дещо зменшилось у всіх випадках, проте ці зміни не досягли першого рівня достовірності ($P \geq 0,05$).

Для того, щоб вилучити процеси, пов'язані з активацією іонотропних P2X -рецепторів, залози інкубували у номінально безкальцієвому позаклітинному середовищі. За відсутності концентраційного градієнта Ca^{2+} між поза- і внутрішньо-

клітинним середовищем позаклітинні пурини спричиняють зміни вмісту Ca^{2+} у тканині залоз опосередковано через активацію лише метаботропних P2Y-рецепторів.

Додавання АТФ і АДФ до номінально безкальцієвого позаклітинного середовища зумовило зниження рівня флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу на $9,21 \pm 2,91$ та $13,60 \pm 3,78\%$ відповідно ($n = 8$, $P \leq 0,001$; рис. 3). При вимірюванні сумарного Ca^{2+} у тканині залоз, проведеному нами раніше [6], ми також зареєстрували зменшення вмісту Ca^{2+} за дії позаклітинних пуринів із більш вираженим ефектом АДФ.

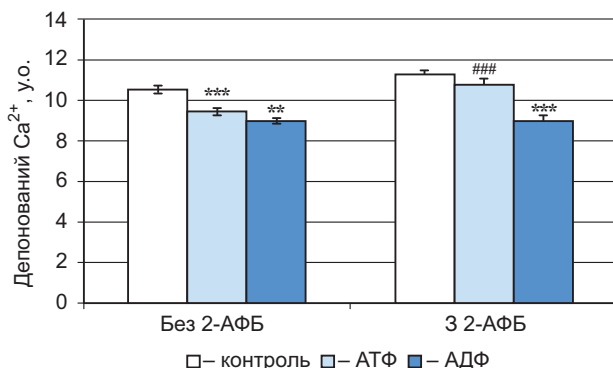


Рис. 3. АТФ- і АДФ-індуковане зменшення вмісту депонованого Ca^{2+} у тканині залоз за відсутності й наявності 2-АФБ у номінально безкальцієвому позаклітинному середовищі:

$[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$ ммоль/л; $[\text{АТФ}]_e = 100$ мкмоль/л; $[\text{АДФ}]_e = 100$ мкмоль/л; ** – різниця порівняно з контролем достовірна з $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; ### – статистично достовірна різниця з $P \leq 0,001$ щодо відповідного значення без 2-АФБ; $n = 8$

Fig. 3. ATP and ADP-induced decreasing of stored Ca^{2+} content in the glands tissue in the absence and presence of 2-APB in nominally Ca^{2+} -free extracellular medium:

$[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$ mmol/l, $[\text{ATP}]_e = 100$ micromol/l, $[\text{ADP}]_e = 100$ micromol/l, ** – difference compared with control with reliable $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; ### – statistically significant difference with $P \leq 0,001$ regarding the appropriate value without 2-APB; $n = 8$

АТФ- і АДФ-індуковані зміни вмісту депонованого Ca^{2+} на фоні 2-АФБ дещо відрізнялися від таких змін без нього: додавання АТФ за цих умов не спричинило статистично достовірних змін ($n = 8$, $P \geq 0,05$), тоді як за дії АДФ зареєстровано зменшення вмісту Ca^{2+} на $18,58 \pm 3,61\%$ ($n = 8$, $P \leq 0,001$). Правда, у цьому випадку статистично достовірної різниці між показниками рівня флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу без дії блокатора та за його присутності не було.

Отже, у номінально безкальцієвому середовищі додавання 2-АФБ запобігає АТФ-індукованому зменшенню вмісту Ca^{2+} , суттєво не впливаючи на ефект, спричинений дією АДФ. Ми можемо зробити висновок про існування в досліджуваних клітинах двох різних підтипів P2Y-рецепторів з різною чутливістю до АТФ і АДФ та різними шляхами трансдукції.

У гіперкальцієвому позаклітинному середовищі додавання АТФ і АДФ призвело до зростання вмісту Ca^{2+} (рис. 4) на $12,64 \pm 4,23$ та $22,58 \pm 3,74\%$ відповідно. Тобто АДФ-індуковані зміни були більш вираженими. При вимірюванні сумарного Ca^{2+} ми отримали аналогічні результати [6]. Очевидно, при гіперкальцієвому середовищі Ca^{2+} -функціональна одиниця перебуває у стані стаціонарної інактивації та зареєстроване збільшення є наслідком активації P2X-рецепторів плазматичної мембрани.

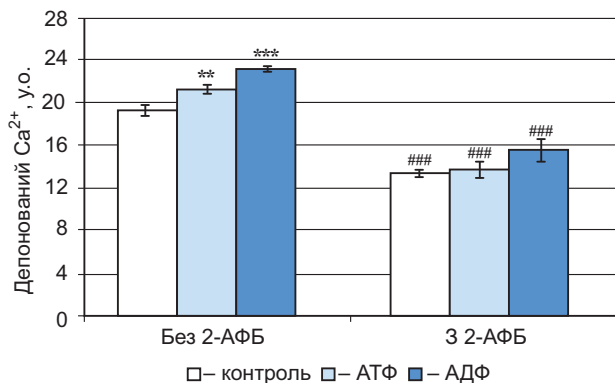


Рис. 4. Збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} у тканині залоз під дією АТФ і АДФ за відсутності й наявності 2-АФБ у гіперкальцієвому позаклітинному середовищі:

$[\text{Ca}^{2+}]_e = 10$ ммоль/л; $[\text{АТФ}]_e = 100$ мкмоль/л; $[\text{АДФ}]_e = 100$ мкмоль/л; ** – різниця порівняно з контролем достовірна з $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; ### – статистично достовірна різниця з $P \leq 0,001$ щодо відповідного значення без 2-АФБ; $n = 8$

Fig. 4. Increasing of stored Ca^{2+} content in the glands tissue under the influence of ATP and ADP in the absence and presence of 2-ABP in the hyper Ca^{2+} extracellular medium:

$[\text{Ca}^{2+}]_e = 10$ mmol/l, $[\text{ATP}]_e = 100$ micromol/l, $[\text{ADP}]_e = 100$ micromol/l, ** – difference comparably to control is reliable, $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$; ### – statistically significant difference with $P \leq 0,001$ relatively to the respective value without 2-ABP; $n = 8$

Додавання 2-АФБ до гіперкальцієвого середовища зумовило достовірне зниження флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу в усіх випадках ($P \leq 0,001$), за рахунок блокування, мабуть, Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулу.

За дії АТФ чи АДФ у цьому випадку не зареєстровано жодних статистично достовірних змін вмісту Ca^{2+} ($n = 8$; $P \geq 0,05$). Це підтверджує наше припущення, що додавання до гіперкальцієвого середовища 2-АФБ навіть у низьких концентраціях спричиняє блокування Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулу (рис. 1, крива 3). Тому Ca^{2+} , що надійшов у цитозоль через P2X-рецептори, не акумулюється у цьому депо.

Отже, у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дзвінця існує два підтипи P2Y-рецепторів з різними механізми трансдукції сигналу та різною чутливістю до агоністів.

В основі трансдукції сигналу P2Y_{АТФ}-рецепторів (рис. 5), які характеризуються більшою спорідненістю до АТФ, ніж АДФ, лежить активація фосфоліпази С, генерування $\text{I}\Phi_3$ і, відтак, зміщення рівноваги ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці у бік вивільнення депонованого Ca^{2+} . Власне, лише такий перехід Ca^{2+} -функціональної одиниці зі стану спокою у стан активності і призводить до генерування фізіологічного Ca^{2+} -сигналу.

P2Y-рецептори іншого підтипу (P2Y_{АДФ}) активуються АДФ. Але процеси трансдукції сигналу, які запускаються позаклітинним АДФ, залишаються нез'ясованими. Можливо, вони включають у себе залучення системи цАМФ, як це характерно для P2Y11 протокових клітин підшлункової залози [21].

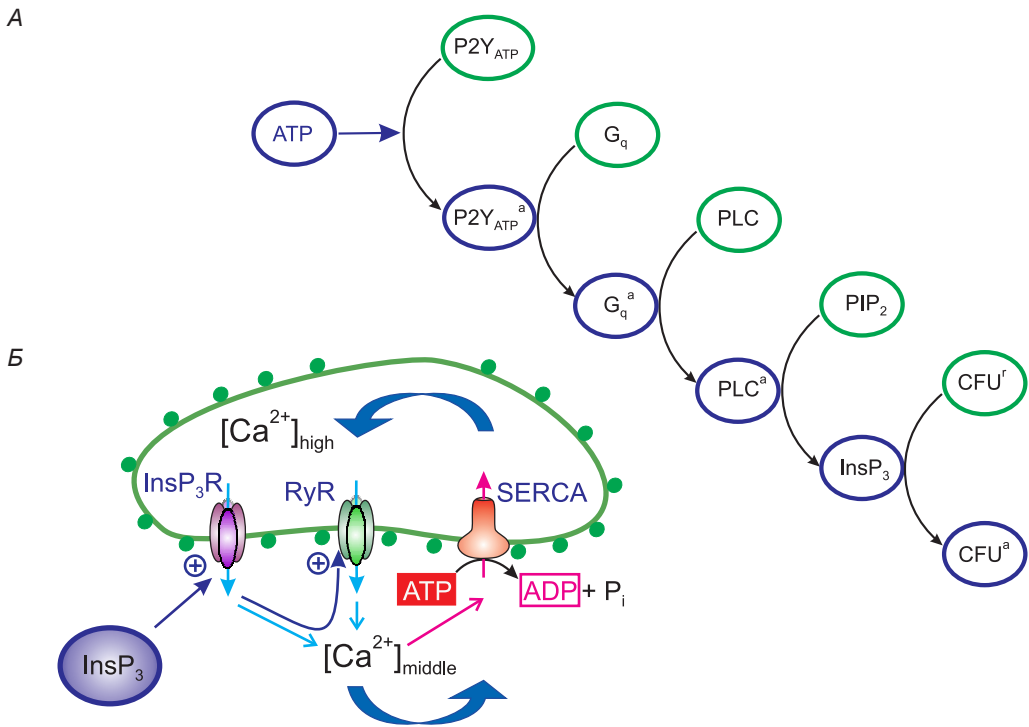


Рис. 5. Гіпотетичний каскад трансдукції Ca²⁺-сигналу (А) при активації P2Y_{ATP}-рецепторів секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* і роль у ньому ендоплазматичної Ca²⁺-функціональної одиниці (Б):

позаклітинний аденозинтрифосфат (АТФ), взаємодіючи із P2Y_{ATP}-рецепторами на плазматичній мембрані (P2Y_{ATP}), активує G_q-білки, що спричиняє, у свою чергу, активацію фосфоліпази С (PLC), яка генерує інозитолтрифосфат (InsP₃) із фосфатиділінозитолдифосфату (PIP₂); збільшення цитозольної концентрації інозитолтрифосфату зумовлює перехід ендоплазматичної Ca²⁺-функціональної одиниці (CFU) зі *стану спокою* у *стан активності*; в основі такого переходу лежить активація ІФ₃-чутливих Ca²⁺-каналів (InsP₃R), локальне збільшення цитозольної [Ca²⁺] і, відтак, активація ріанодинчутливих Ca²⁺-каналів (RyR); із цитозолу катіони Ca²⁺ ефективно транспортуються у люмен ендоплазматичного ретикулуму Ca²⁺-помпою (SERCA), тому внаслідок активації Ca²⁺-функціональної одиниці інтенсифікуються не лише процеси вивільнення депонованого Ca²⁺, але й його акумулювання – виникає не статичне зростання цитозольної [Ca²⁺], а транзйентний Ca²⁺-сигнал (зірочкою позначені молекули або структури, які перебувають в активному стані)

Fig. 5. Hypothetical cascade of Ca²⁺-signal transduction (A) after the activation of P2Y_{ATP} receptors of secretory cells of *Chironomus plumosus* larvae salivary glands and the role of endoplasmic reticulum Ca²⁺-functional unit (B) in it:

extracellular adenosine triphosphate (ATP), interacting with P2Y_{ATP} receptors of plasma membrane, activates G_q-proteins, causing, afterwards, activation of phospholipase C (PLC), which generates inositol-3-phosphat (InsP₃) from phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP₂); increase of inositol-3-phosphate cytosolic concentration causes endoplasmic reticulum Ca²⁺-functional units (CFU) transition from the steady state in active state, in the basis of such transition lies activation of IP₃-sensitive Ca²⁺ channels (InsP₃R), local increase of cytosolic [Ca²⁺] and, hence, ryanodyn-sensitive Ca²⁺-channels (RyR) activation; Ca²⁺ cations are effectively transported from the cytosol in the lumen of endoplasmic reticulum with Ca²⁺-pump (SERCA), thereby, due to activation of Ca²⁺-functional unit are intensified as processes of the stored Ca²⁺ release, as it's accumulation – not a static increase in cytosolic [Ca²⁺], but transient Ca²⁺-signal takes place (asterisk marked molecules or structures are in active state)

1. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. **Курс варіаційної статистики**. Київ: Вища школа, 1977. 206 с.
2. Костерин С.А. **Транспорт кальція в гладких м'язках**. Київ: Наук. думка, 1990. – 216 с.
3. Манько В.В. Методологічні підходи до дослідження Na^+ – Ca^{2+} -обміну в екзокринних секреторних клітинах. **Укр. біохім. журн**, 2006; 78(1): 43–62.
4. Манько В.В. Концепція Ca^{2+} -функціональних одиниць у застосуванні до секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*. **Біологічні студії / Studia Biologica**, 2008; 2(1): 33–50.
5. Манько В.В. **Системи трансмембранного транспортування кальцію у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironimus plumosus* Linnaeus**. Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. Київ, 2008. 44 с.
6. Манько В., Великопольська О. Ідентифікація пуринових рецепторів у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біол.**, 2005; 40: 134–139.
7. Манько В.В., Бичкова С.В., Клевець М.Ю. Ідентифікація каналів вивільнення Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна. **Укр. біохім. журн**, 2004; 76(1): 65–71.
8. Манько В.В., Клевець М.Ю., Федірко Н.В., Король Т.В. Вплив хлорпромазину на Ca^{2+} -транспортні системи плазматичної мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. **Укр. біохім. журн**, 2000; 72 (2): 36–41.
9. Abbraccio M.P., Burnstock G., Voeynaems J.-M. et al. International union of pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol. Rev**, 2006; 58: 281–341.
10. Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. **FASEB J**, 2002; 16: 1145–1150.
11. Burnstock G. Purinergic signalling. **Br. J. Pharmacol**, 2006; 147(1): S172–S181.
12. Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. **J. Physiol**, 2008; 586(14): 3307–3312.
13. Burnstock G., Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. **J. Pharmacol. Experiment. Therap**, 2000; 295(3): 862-869.
14. Cattaneo M., Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, 1999; 19: 2281–2285.
15. Honda S., Sasaki Y., Ohsawa K. et al. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through $G_{i/o}$ -coupled P2Y receptors. **J. Neurosci**, 2001; 21(6): 1975–1982.
16. Jacobson K.A., Hoffmann C., Kim Y.C. et al. Molecular recognition in P2 receptors: ligand development aided by molecular modeling and mutagenesis. **Prog. Brain Res**, 1999; 120: 119–132.
17. Jacobson K.A., Kim S-K., Costanzi S., Gao Z-G. Purine receptors: GPCR structure and agonist design. **Molecular Interventions**, 2004; 4: 337–347.
18. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C. et al. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. **Pharmacol. Rev**, 2001; 53: 107–118.
19. Lazarowski E.R., Boucher R.C., Harden T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. **Mol. Pharmacol**, 2003; 64: 785–795.
20. Maruyama T., Kanaji T., Nakade S. et al. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membranepenetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}-3$ -induced Ca^{2+} release. **Japan. J. Biochem**, 1997; 122: 498–505.
21. Missiaen L., Callewaert G., De Smedt H., Parys J.B. 2-aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca^{2+} pump and the non-specific leak from the non-mitochondrial Ca^{2+} stores in permeabilised A7r5 cells. **Cell Calcium**, 2001; 29: 111–116.
22. Nguyen T.D., Meichle S., Kim U.S. et al. P2Y(11), a purinergic receptor acting via cAMP, mediates secretion by pancreatic. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**, 2001; 280(5): G795–804.

23. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol. Rev.**, 2002; 82: 1013–1067.
24. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, 1998; 50: 413–492.
25. Tribe R.M., Borin M.L., Blaustein M.P. Functionally and spatially distinct Ca²⁺ stores are revealed in cultured vascular smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1994; 91: 5908–5912.
26. Vallon V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, 2008; 294: F10–F27.

THE ROLE OF ENDOPLASMIC Ca²⁺-FUNCTIONAL UNIT IN P2Y-RECEPTORS SIGNAL TRANSDUCTION PROCESSES IN *CHIRONOMUS PLUMOSUS* LARVAE SECRETORY CELLS OF SALIVARY GLANDS

O. Yu. Velykopolska, V. V. Manko

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

IP₃-dependent Ca²⁺-channels inhibitor 2-APB in low concentrations (1–10 μmol/l) causes increase of stored Ca²⁺ content in salivary glands of *Chironomus plumosus* larvae, both incubated as in nominally calcium-free medium and in the medium with physiological Ca²⁺ concentration. This effect is caused by inhibition of IP₃-dependent Ca²⁺-channels, decreasing of Ca²⁺-release from endoplasmic reticulum which results in shift of endoplasmic Ca²⁺-functional unit equilibrium in the direction of Ca²⁺ accumulation in the intracellular stores. After incubation of glands with 2-APB in hypercalcium medium decrease of Ca²⁺ content in secretory cells was observed. Presence of high concentration of 2-APB (20–100 μmol/l) in incubation medium leads to decrease of Ca²⁺ content in secretory cells independently of Ca²⁺ concentration. This effect most probably is caused by the inhibition of SERCA Ca²⁺-pump, which is a part of endoplasmic Ca²⁺-functional unit, decrease of Ca²⁺ uptake resulting in shift of equilibrium in direction of release of stored Ca²⁺.

Application of ATP or ADP in the nominal Ca²⁺-free medium induces a decrease of Ca²⁺ content in the secretory cells as a result of P2Y-receptors activation. At the same time, presence of 2-APB (10 μmol/l) in nominally Ca²⁺-free medium abolishes the ATP-induced Ca²⁺ release of Ca²⁺, and did not influence ADP-induced decrease of Ca²⁺ concentration in the secretory cells. According to the obtained data, we assume the presence of two subtypes of P2Y-receptors in secretory cells of *Chironomus plumosus* larvae salivary glands. Receptors of the first subtype (P2Y_{ATP}) have higher affinity to ATP and are coupled with IP₃-dependent Ca²⁺-channels. Activation of endoplasmic Ca²⁺-functional unit is a basic mechanism of the signal transduction following activation of this subtype of receptors. Receptors of the second subtype (P2Y_{ADP}) have higher affinity to ADP and exert their functions through other mechanism. Addition of 2-APB to hypercalcium media abolishes the ATP- and ADP-induced changes in Ca²⁺ content in glands' tissue due to changes in the integrity of endoplasmic Ca²⁺-functional unit.

Key words: 2-APB, P2Y and P2X, IP₃-dependent Ca²⁺-channels, Ca²⁺-pump of endoplasmic reticulum, endoplasmic Ca²⁺-functional unit, exocrine secretory cells.

РОЛЬ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ Ca^{2+} -ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЕДИНИЦЫ В ПРОЦЕССАХ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА P2Y-РЕЦЕПТОРОВ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ЛИЧИНКИ ЗВОНЦА

О. Ю. Великопольская, В. В. Манько

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

Ингибитор IF_3 -чувствительных Ca^{2+} -каналов 2-АФБ в низких концентрациях (1–10 мкмоль/л) вызывает увеличение содержания Ca^{2+} в ткани слюнных желез личинки *Chironomus plumosus*, инкубированных как в номинально бескальциевой среде, так и в среде с физиологической концентрацией Ca^{2+} . Этот эффект обусловлен блокированием IF_3 -чувствительных Ca^{2+} -каналов, уменьшением входного (относительно цитозоля) потока Ca^{2+} и, как следствие, смещением равновесия эндоплазматической Ca^{2+} -функциональной единицы в сторону накопления Ca^{2+} в депо. При инкубации желез в гиперкальциевой среде 2-АФБ во всех случаях вызывает не увеличение, а уменьшение содержания Ca^{2+} в ткани. Уменьшается содержание Ca^{2+} в ткани желез, независимо от концентрации Ca^{2+} в среде инкубации, и при высоких концентрациях 2-АФБ (20–100 мкмоль/л). Это уменьшение обусловлено угнетением Ca^{2+} -насоса, который входит в состав эндоплазматической Ca^{2+} -функциональной единицы, уменьшением входного потока и смещением равновесия в сторону высвобождения депонированного Ca^{2+} .

В результате добавления АТФ или АДФ к номинально бескальциевой среде содержание Ca^{2+} в ткани желез уменьшается вследствие активации P2Y-рецепторов. Наличие 2-АФБ (10 мкмоль/л) в номинально бескальциевой среде предотвращает АТФ-индуцированное уменьшение содержания Ca^{2+} , не влияя на его АДФ-индуцированное уменьшение в ткани. На основании анализа данных делается вывод о наличии в секреторных клетках слюнных желез личинки *Chironomus* двух подтипов P2Y-рецепторов. Рецепторы первого подтипа ($P2Y_{ATP}$) имеют высшее сродство к АТФ и сопряжены с IF_3 -чувствительными Ca^{2+} -каналами. В основе трансдукции сигнала этих рецепторов лежит переход Ca^{2+} -функциональной единицы из состояния покоя в состояние активации. Рецепторы второго подтипа ($P2Y_{ADP}$) имеют большее сродство к АДФ и реализуют свое действие благодаря другому механизму. Добавление 2-АФБ в гиперкальциевую внеклеточную среду предотвращает АТФ- и АДФ-индуцированные изменения содержания Ca^{2+} в ткани желез вследствие нарушения целостности эндоплазматической Ca^{2+} -функциональной единицы.

Ключевые слова: 2-АФБ, P2Y- и P2X-рецепторы, IF_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы, Ca^{2+} -помпа эндоплазматического ретикулума, эндоплазматическая Ca^{2+} -функциональная единица, экзокринные секреторные клетки.

Одержано: 15.10.2009