



УДК 612.3:591.413.2

## **КОНЦЕПЦІЯ $\text{Ca}^{2+}$ -ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОДИНИЦЬ У ЗАСТОСУВАННІ ДО СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ *CHIRONOMUS PLUMOSUS***

**В. В. Манько**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: vvmanko@franko.lviv.ua*

---

Виходячи з аналізу експериментальних даних, отриманих у ході дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*, запропоновано концепцію  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональних одиниць. Згідно з нею,  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця – це абстрактна модель, яка складається зі системи активного і системи пасивного транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  та мембрани, що забезпечує компартменталізацію цих катіонів.  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональні одиниці є I (системи активного і пасивного транспортування належать одній мембрані) і II типу (системи активного і пасивного транспортування належать різним мембранам однієї клітини). В обох випадках  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця є не статичною структурою, а динамічною системою, яка забезпечує підтримання відповідної  $[\text{Ca}^{2+}]$  у цитозолі та може перебувати у трьох станах. Стан спокою характеризується наявністю динамічної рівноваги між вхідним і вихідним потоками  $\text{Ca}^{2+}$ . У стані активності вхідний (відносно цитозолі) потік  $\text{Ca}^{2+}$  переважає над вихідним, а у стані інактивації – навпаки, переважає вихідний потік. Чинниками, які за рахунок прямого позитивного чи зворотного негативного зв'язку забезпечують перехід  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем між різними станами, слугують катіони  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки активність більшості  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем залежить від їхньої цитозольної концентрації.

Ендоплазматична  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця досліджуваних секреторних клітин об'єднує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу ендоплазматичного ретикулу,  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі та ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали. Як наслідок, 1) додавання ріанодину до середовища інкубування залоз у субмікромолярній концентрації спричиняє збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у їхній тканині; 2) стимуляція  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів запобігає одночасній стимуляції ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів чи навпаки; 3) гепарин спричиняє збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз, оброблених сапоніном, але лише за наявності у середовищі ріанодину в активуючій ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів концентрації.

$\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю плазматичної мембрани формують потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани.

Це припущення базується на тому факті, що між потенціалкерованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником, з одного боку, та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою плазматичної мембрани, з другого, існують тісні функціональні зв'язки навіть за умов внутрішньоклітинної перфузії. До певної міри стан цієї  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці визначається залежністю  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну від активності  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи. Її характерною ознакою є також залежність від рівня мембранного потенціалу, а не лише від цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Певні  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи можуть входити до кількох  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональних одиниць. Ендоплазматично-мітохондріальна  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця складається з каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  ендоплазматичного ретикулу та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій, оскільки дія на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині слинних залоз ріанодину та рутенію червоного, а також  $\text{I}\Phi_3$  та рутенію червоного за умов поєднання їх у середовищі інкубації є неадитивною.

Постульовану концепцію можна розглядати як робочу гіпотезу для з'ясування ролі, яку відіграє узгодженість функціонування різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації і не лише у секреторних клітинах екзокринних залоз.

**Ключові слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональні одиниці,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа, потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали,  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали,  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, секреторні клітини, концепція.

## **$\text{Ca}^{2+}$ -FUNCTIONAL UNITS CONCEPTION CONCERNING TO SECRETORY CELL OF *CHIRONOMUS PLUMOSUS* LARVAE SALIVARY GLAND**

**V. V. Manko**

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

On the basis of analysis of experimental data received during investigation of  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting systems of secretory cells of salivary glands of *Chironomus plumosus* larvae, a conception of  $\text{Ca}^{2+}$ -functional units has been proposed. According to this conception,  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit is an abstract model which consists of with active and passive  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting systems and cellular membrane providing  $\text{Ca}^{2+}$  cations compartmentalisation. There are type I (active and passive transporting systems located in the same membrane) and type II (active and passive transporting systems located in different membranes of the same cell)  $\text{Ca}^{2+}$ -functional units. In both cases,  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit is not a static structure, but a dynamic one, that ensure proper  $[\text{Ca}^{2+}]$  support in cytosol. It may be in three states: 1) resting state the is characterised by a dynamic balance between the influx and efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  flow; 2) active state of  $\text{Ca}^{2+}$  influx (regarding cytosol) prevailing over the efflux; 3) inactive state (oppositely,  $\text{Ca}^{2+}$  efflux prevailing over its influx). Factors which due to direct positive or negative feedback are supporting  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting systems transition

between different states, are Ca<sup>2+</sup> cations, since the activity of majority of Ca<sup>2+</sup>-transporting systems depends on cytosol concentration of Ca<sup>2+</sup>.

Endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-functional unit of investigated secretory cells combines Ca<sup>2+</sup>-pump of endoplasmic reticulum, InsP<sub>3</sub>Rs and RyRs. As a result of 1) ryanodine adding to incubatory medium of glands in submicromolar concentration causes Ca<sup>2+</sup> content increasing in their tissue; 2) InsP<sub>3</sub>Rs stimulation prevents simultaneous RyRs stimulation or contrariwise; 3) heparin causes Ca<sup>2+</sup> content increasing in gland tissue, treated with saponin, but only in ryanodine presence in medium in concentration activating RyRs.

Ca<sup>2+</sup>-functional unit of plasma membrane are formed by voltage-operated Ca<sup>2+</sup>-channels, Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and Ca<sup>2+</sup>-pump of plasma membrane. That assumption is based on the fact that between the voltage-operated Ca<sup>2+</sup>-channel and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, from one side, and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and Ca<sup>2+</sup>-pump of plasma membrane, from the other side, tight functional links are existing even in case of intracellular perfusion. To some extent, condition of this Ca<sup>2+</sup>-functional unit are defined by Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange dependence on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity. Its peculiar feature is also a dependence on membrane potential level, not only on cytosolic [Ca<sup>2+</sup>].

Distinct Ca<sup>2+</sup>-transporting systems may be a part of several Ca<sup>2+</sup>-functional units. Endoplasmic-mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-functional unit consists of Ca<sup>2+</sup>-release channels of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-uniporter, so far as influence of ryanodine and ruthenium red, and also InsP<sub>3</sub> and ruthenium red under the condition of their combination in incubation medium with Ca<sup>2+</sup> content of salivary glands tissue is not additive.

Postulated conception could be positioned as a working hypothesis for identification of the role of different Ca<sup>2+</sup>-transporting systems in coordination of Ca<sup>2+</sup>-signalling in different cells other than secretory cells of exocrine glands.

**Key words:** Ca<sup>2+</sup>-functional unit, Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, Ca<sup>2+</sup>-pump, voltage-operated Ca<sup>2+</sup>-channels, InsP<sub>3</sub>R, RyR, Ca<sup>2+</sup>-uniporter, secretory cells.

## ВСТУП

Використовуючи різні методичні підходи у плазматичній мембрані секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*, ідентифіковано потенціалкеровані Ca<sup>2+</sup>-канали [4, 8, 18], Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник [6, 12, 17] і Ca<sup>2+</sup>-помпу плазматичної мембрани [9, 16]. Доведено також наявність Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулу [13, 16], Ca<sup>2+</sup>-уніпортера мітохондрій [20], IФ<sub>3</sub>-чутливих та ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів [1, 11, 13]. Роль первинного агоніста у слинних залозах комара-дергуна може відігравати АТФ, оскільки на плазматичній мембрані досліджуваних секреторних клітин ідентифіковані P2Y- і P2X-рецептори [14].

У ході дослідження властивостей цих Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем з'ясувалося, що деякі їхні властивості неможливо пояснити без урахування тих складних взаємовідносин, які існують між ними. Так, встановлено, що амплітуда потенціалкерованого Ca<sup>2+</sup>-струму залежить від функціональної активності Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника плазматичної мембрани [5]. У свою чергу, амплітуда вхідного струму Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обміну збільшується внаслідок додавання до внутрішньоклітинного розчину блокатора Ca<sup>2+</sup>-помпи еозину Y [15]. Існують також складні

взаємовідносини між каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо –  $\text{I}\Phi_3$ -чутливими та ріанодинчутливими [1], а також між каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером мітохондрій [2]. Це наштовхнуло нас на думку про необхідність пошуку загальних закономірностей між встановленими фактами.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі проаналізовано експериментальні дані, отримані раніше з метою ідентифікації та встановлення властивостей ріанодинчутливих та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулулу [1, 13], потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [5, 7],  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [15, 19] плазматичної мембрани та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій [2] секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*.

Властивості ріанодинчутливих і  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, а також  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій, досліджували, аналізуючи зміни вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз після їхнього інкубування з відповідним активатором чи блокатором – ріанодином (5 або 500 нмоль/л),  $\text{I}\Phi_3$  (10 мкмоль/л), гепарином (500 мкг/мл) чи рутенієм червоним (10 мкмоль/л) [13, 20].

Струм через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали досліджували з використанням методу фіксації потенціалу за умов внутрішньоклітинної перфузії [4]. Застосовуючи цей метод реєстрували і струм  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну – у відповідь на раптове гіперполяризувальне зміщення мембранного потенціалу плазматичної мембрани (детальніше див. [12]). У цих дослідженнях використовували блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -помп еозин Y (10 мкмоль/л) і  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи уабаїн (25 мкмоль/л), а також АТФ (1 ммоль/л) і відновлений глутатіон (GSH, 1 ммоль/л). Достовірність різниці між двома статистичними групами визначали за Стьюдентом [3]. Інші умови проведення експериментальних досліджень наведені у підписах до рисунків.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

### Концепція $\text{Ca}^{2+}$ -функціональних одиниць

У тих випадках, коли система є досить складною, її треба, для полегшення опису процесів у ній, спростити до „ідеальної системи”. Якщо йдеться про підтримання цитоплазматичної  $[\text{Ca}^{2+}]$ , „ідеальною системою” може бути  **$\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця**.

У найпростішому випадку ця абстрактна модель складається з одного  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу (системи пасивного транспортування),  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи (системи активного транспортування) та мембрани, що забезпечує компартменталізацію катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

Власне будь-яку ділянку клітини цілком доречно абстрагувати до такої  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці. За структурою їх можна поділити на два типи.  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю I типу формують системи активного і пасивного транспортування однієї мембрани, наприклад,  $\text{Ca}^{2+}$ -канали і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулулу або  $\text{Ca}^{2+}$ -канали і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани.

До складу  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці II типу входять система активного і система пасивного транспортування, які належать різним мембранам однієї клітини, наприклад,  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулулу. Принципової відмінності у властивостях між  $\text{Ca}^{2+}$ -функціо-

нальними одиницями двох типів немає (або нам про це нічого невідомо). Тому така класифікація є досить-таки умовною і необхідною для кращого розуміння цього поняття.

Набагато важливіше звернути увагу на те, що Ca<sup>2+</sup>-функціональна одиниця є не статичним утвором (структурою), а динамічною системою, яка забезпечує підтримання відповідної [Ca<sup>2+</sup>] у цитозолі та може перебувати у трьох станах – **спкою, активності й інактивації**. Більше того, збільшення цитозольної [Ca<sup>2+</sup>], яке спостерігається при переході Ca<sup>2+</sup>-функціональної одиниці зі стану спкою у стан активності, є обмежене в просторі та швидкоплинне і називається локальним Ca<sup>2+</sup>-спайком, пафом чи спарком.

У свою чергу, чинниками, які за рахунок прямого позитивного чи зворотного негативного зв'язку забезпечують перехід Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем між різними станами, в основному слугують катіони Ca<sup>2+</sup>, оскільки активність більшості Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем залежить від їхньої цитозольної концентрації.

Рівень Ca<sup>2+</sup> у цитозолі є результатом двох протилежно спрямованих потоків Ca<sup>2+</sup>. **Вхідний потік** (відносно цитозолу,  $P_{in}$ ) забезпечує надходження позаклітинного Ca<sup>2+</sup> через плазматичну мембрану чи його вивільнення з внутрішньоклітинних депо і реалізується функціонуванням пасивних Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем. Протилежно спрямований **вихідний потік** ( $P_{out}$ ) забезпечує зменшення цитозольної [Ca<sup>2+</sup>] за рахунок його активного виведення у позаклітинне середовище і/чи у внутрішньоклітинні депо.

У стані спкою (фізіологічного спкою) між цими потоками існує динамічна рівновага:

$$P_{in} = P_{out}, \quad (1)$$

але **завжди**, на чому слід особливо наголосити, і  $P_{in} > 0$ , і  $P_{out} > 0$ . Тому Ca<sup>2+</sup>-функціональна одиниця є справді динамічною системою.

Дія гормону чи медіатора спричиняє збільшення вхідного потоку, рівновага порушується і Ca<sup>2+</sup>-функціональна одиниця переходить у **стан активності**:

$$P_{in} > P_{out}. \quad (2)$$

Тим не менше, такий стан є короткотривалим (нестабільним), оскільки локальне зростання цитозольної [Ca<sup>2+</sup>] спричиняє збільшення вихідного потоку. Не настає також і рівновага на новому, енергетично вищому рівні, оскільки паралельно до активування цитозольним Ca<sup>2+</sup> систем вихідного потоку відбувається пригнічення ним, за рахунок зворотних негативних зв'язків, систем вхідного потоку – настає **стан інактивації**:

$$P_{in} < P_{out}. \quad (3)$$

Наслідком такого функціонування системи є зниження цитозольної [Ca<sup>2+</sup>] до стану фізіологічного спкою, коли ці катіони не можуть слугувати чинниками ні прямого позитивного, ні зворотного негативного зв'язку. Система повертається до стану динамічної рівноваги, описаної рівнянням (1).

У деяких випадках стан Ca<sup>2+</sup>-функціональної одиниці може визначатися не лише рівнем цитозольного Ca<sup>2+</sup>, але і значенням мембранного потенціалу. Зокрема, тоді, коли до складу Ca<sup>2+</sup>-функціональних одиниць входять Ca<sup>2+</sup>-транспортувальні системи плазматичної мембрани, які мають виражену потенціалозалежність – потенціалкеровані Ca<sup>2+</sup>-канали чи Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник.

За дії будь-якого стимулятора  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця відповідає як єдине ціле. Функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортальної системи не у складі  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці є неефективним, тому що за таких умов не може бути забезпечена дискретність  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу. Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозоль чи внутрішньоклітинними каналами, чи каналами плазматичної мембрани буде супроводжуватися лише статичним збільшенням його концентрації. Аналогічно, збільшення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи чи  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника спричинить лише зниження цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$  до того рівня, наскільки дозволить це зробити їхня спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$ . І лише за узгодженого функціонування систем пасивного й активного транспортування, об'єднаних у  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю, можливим є генерування  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу.

### Ендоплазматична $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця

У секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна  $\text{IF}_3$ -чутливі та ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали разом з  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою мембрани ендоплазматичного ретикулуму формують **ендоплазматичну  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю**, яка за структурою належить до I типу (рис. 1). За відсутності агоніста спонтанне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  ріанодинчутливими каналами у цитозоль ( $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ ) компенсується його транспортуванням помпою у люмен ендоплазматичного ретикулуму, тому фізіологічна відповідь не виникає. Встановлюється певна **динамічна рівновага** між двома **постійними** потоками  $\text{Ca}^{2+}$ .

Звичайно, такі принципи організації функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем передбачають витрати великої кількості енергії. Але власне завдяки цьому локальне збільшення цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$  підтримує чутливість  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці до  $\text{IF}_3$  (і, відповідно, цілої клітини до агоніста) на досить високому рівні (рис. 1, А). Як наслідок, навіть незначне зростання  $\text{IF}_3$  у цитозолі спричиняє зміщення рівноваги у бік вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із депо (рис. 1, Б).

Однак цей процес обмежений у часі, оскільки високі  $[\text{Ca}^{2+}]$  пригнічують обидва типи каналів (рис. 1, В), запобігаючи надмірному спустошенню депо.

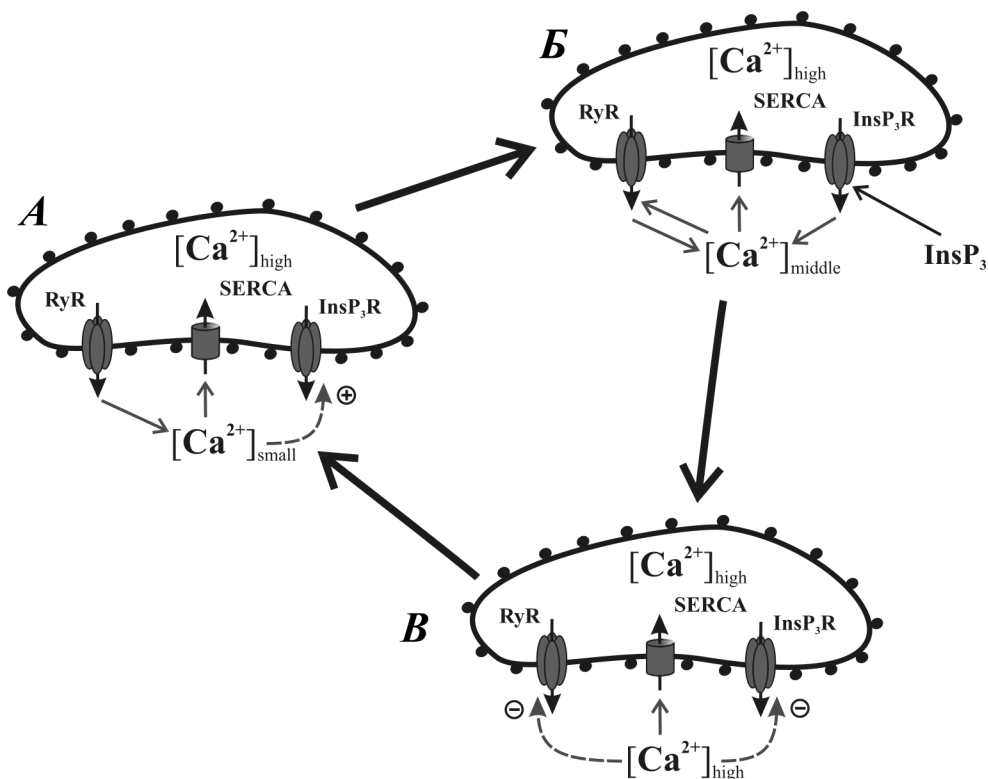
Наше припущення співзвучне з гіпотезою Канцели та співавт. [26], якою постулюється наявність **осциляторної одиниці**, що складається з ріанодинчутливого та  $\text{IF}_3$ -чутливого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Власне функціонування такої осциляторної одиниці забезпечує генерацію, на думку авторів,  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль у цитоплазмі.

Гіпотеза про об'єднання  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем певної ділянки цитоплазми у  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю дає змогу глибше зрозуміти механізми взаємозв'язку між цими системами. Крім того, поняття  **$\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця** є значно ширшим, ніж **осциляторна одиниця**, оскільки його можна застосувати до набору  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем будь-якої ділянки цитоплазми, у тому числі і тих, діяльність яких не пов'язана з генерацією  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль (осциляціями  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Виходячи із наведених вище принципів організації ендоплазматичної  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, можна пояснити раніше отримані нами результати, трактування яких раніше викликало деякі труднощі.

По-перше, ріанодин у високих концентраціях (500 нмоль/л; рис. 2) збільшує, діючи у стані спокою (рис. 1, А), вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз унаслідок зміщення рівноваги в бік транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у люмен ендоплазматичного ретикулуму.

По-друге, додавання ріанодину до середовища інкубації у низькій концентрації (5 нмоль/л; рис. 3) спричиняє вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$ . Якщо викид



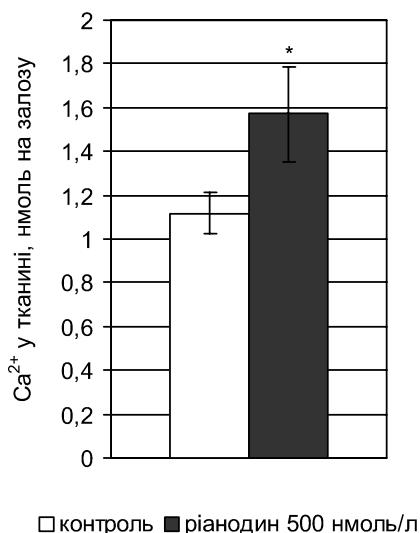
**Рис. 1.** Цикл активності ендоплазматичної  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*:

**A** – **стан спокою**  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, за якого підтримується висока чутливість до  $\text{I}\Phi_3$ ; **Б** – **стан активності**  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, який досягається завдяки дії агоніста на  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали і тригерній активації ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів; **В** – **стан інактивації**  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, протягом якого рівновага зміщується в бік депонування  $\text{Ca}^{2+}$  і система переходить у стан спокою; RyR – ріанодинчутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал,  $\text{InsP}_3\text{R}$  –  $\text{I}\Phi_3$ -чутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулуму;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{small}}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{middle}}$  і  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{high}}$  – низька, середня і висока цитозольна концентрація катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{InsP}_3$  –  $\text{I}\Phi_3$

**Fig. 1.** Activity cycle of endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit of *Chironomus plumosus* larvae secretory cells of salivary glands:

**A** – **resting state** of  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit, in which high sensitivity to  $\text{InsP}_3$  is supporting; **B** – **activated state** of  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit is achieved due to agonist effect to  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  and trigger activation RyRs; **B** – **inactivated state** of  $\text{Ca}^{2+}$ -functional unit, balance displacement in the side of  $\text{Ca}^{2+}$  deposition and as a result system pass to a resting state

$\text{Ca}^{2+}$  внаслідок цього не досягає певного критичного рівня, то це супроводжується незначною активацією  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів завдяки підвищенню чутливості системи до ендогенного  $\text{I}\Phi_3$ , який, очевидно, продовжує спонтанно утворюватися за умов досліду. Як наслідок, за наявності ріанодину у середовищі інкубації гепарин, пригнічуючи  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, спричиняє збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз (рис. 3, Б). У контрольних умовах (без ріанодину) ефект гепарину ми зареєструвати не змогли [13].

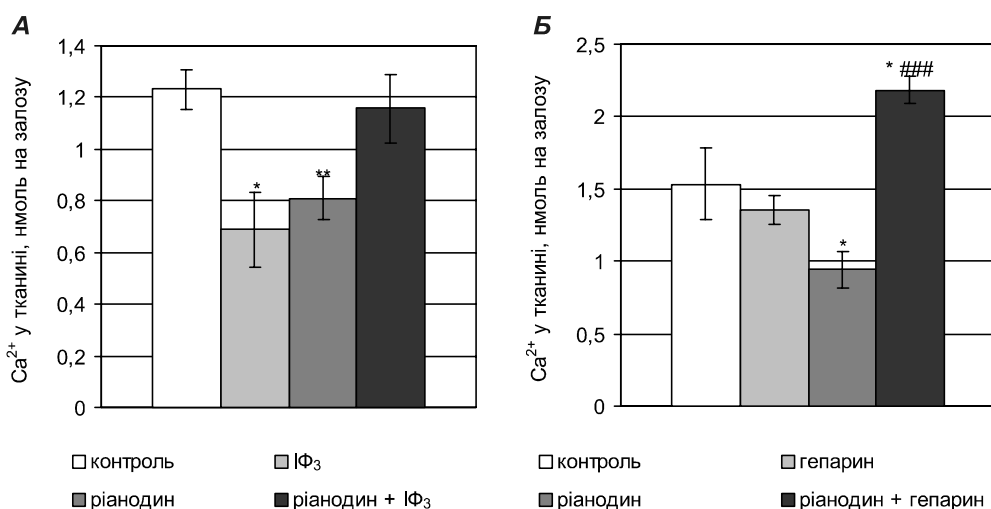


**Рис. 2.** Зміна вмісту Ca<sup>2+</sup> у тканині слинних залоз, оброблених сапоніном, під впливом ріанодину у концентрації 500 нмоль/л [1, 13]:

[Na<sup>+</sup>] = 15,3 ммоль/л, [K<sup>+</sup>] = 129,94 ммоль/л; \* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,05$ , n = 7

**Fig. 2.** Ca<sup>2+</sup>-content changes in tissue of salivary glands, treated with saponin, under the influence of ryanodine in concentration 500 nmol/l [1, 13]:

[Na<sup>+</sup>] = 15.3 mmol/l, [K<sup>+</sup>] = 129.94 mmol/l; \* – difference is significant in comparison to control with  $P < 0.05$ ; n = 7



**Рис. 3.** Залежність функціонування IФ<sub>3</sub>-чутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів від стану ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів [1]: зміни вмісту Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз, оброблених сапоніном, під впливом IФ<sub>3</sub> (А) та гепарину (Б) за відсутності і наявності ріанодину у середовищі інкубації; залози інкубували у номінально безкальцієвому середовищі; [Na<sup>+</sup>] = 15,3 ммоль/л, [K<sup>+</sup>] = 129,94 ммоль/л; [IФ<sub>3</sub>] = 10 мкмоль/л, [гепарин] = 500 мкг/мл, [ріанодин] = 5 нмоль/л; \* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ , ### – різниця порівняно з гепаринвмісним достовірна з  $P < 0,001$ ; n = 6

**Fig. 3.** InsP<sub>3</sub>R functioning dependence on RyRs state [1]: Ca<sup>2+</sup>-content changes in tissue of salivary glands, treated with saponin, under the influence of InsP<sub>3</sub> (A) and heparin (B) at absence and presence of ryanodine in the incubatory medium; glands were treated in nominal Ca<sup>2+</sup> free medium; [Na<sup>+</sup>] = 15.3 mmol/l, [K<sup>+</sup>] = 129.94 mmol/l; [InsP<sub>3</sub>] = 10 μmol/l, [heparin] = 500 μg/ml, [ryanodine] = 5 nmol/l; \* – difference is significant in comparison to control with  $P < 0.05$ , \*\* –  $P < 0.01$ , ### – difference is significant in comparison to heparin-containing medium with  $P < 0.001$ ; n = 6

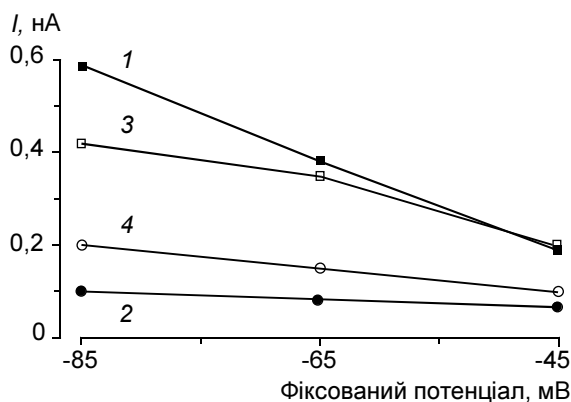


І по-третє. У випадку, коли вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо ріанодином у часі збігається з активацією його вивільнення екзогенним  $\text{IФ}_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця переходить у стан інактивації (рис. 1, В), що, мабуть, і спостерігалось у представленому на рис. 3, А експерименті.

### $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця плазматичної мембрани

Метод внутрішньоклітинної перфузії дає змогу здійснювати, як вважається, повний контроль над концентраційними градієнтами іонів, що проникають через мембрану. Тим не менше, нами встановлено, що між потенціалкерованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником плазматичної мембрани існують тісні функціональні зв'язки навіть за умов внутрішньоклітинної перфузії [5].

На рис. 4 криві 1 і 2 відображають залежність амплітуди  $\text{Ca}^{2+}$ -струму від наявності натрієвого градієнта за різних значень фіксованого потенціалу і використання внутрішньоклітинного розчину без  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ЕГТА-буфера; криві 3 і 4 – відображають цю ж залежність за внутрішньоклітинного розчину зі стабілізованою  $[\text{Ca}^{2+}]$  на рівні 10 мкмоль/л. Звертає на себе увагу, що за стабілізованого рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  залежність амплітуди потенціалкерованого  $\text{Ca}^{2+}$ -струму як від рівня фіксованого потенціалу, так і від концентраційного натрієвого градієнта є менш вираженою. Аналізуючи ці дані, ми зробили висновок, що залежність амплітуди  $\text{Ca}^{2+}$ -струму від наявності натрієвого градієнта зумовлена не підвищеною проникністю  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів для одновалентних катіонів, а залежністю їхньої провідності від функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [10].



**Рис. 4.** Залежність амплітуди вхідного потенціалкерованого  $\text{Ca}^{2+}$ -струму від натрієвого концентраційного градієнта за різних значень фіксованого потенціалу та  $[\text{Ca}^{2+}]$  у цитозолі [5, 7]:  $[\text{Na}^+]_e = 136,9$  (криві 1 і 3) або 16 (криві 2 і 4) ммоль/л,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,76$  ммоль/л,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  ммоль/л;  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 10$  мкмоль/л (криві 3 і 4;  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ЕГТА-буфер) або не задавали (криві 1 і 2); фіксований потенціал -85, -65 або -45 мВ, тестований – -25 мВ; n = 6

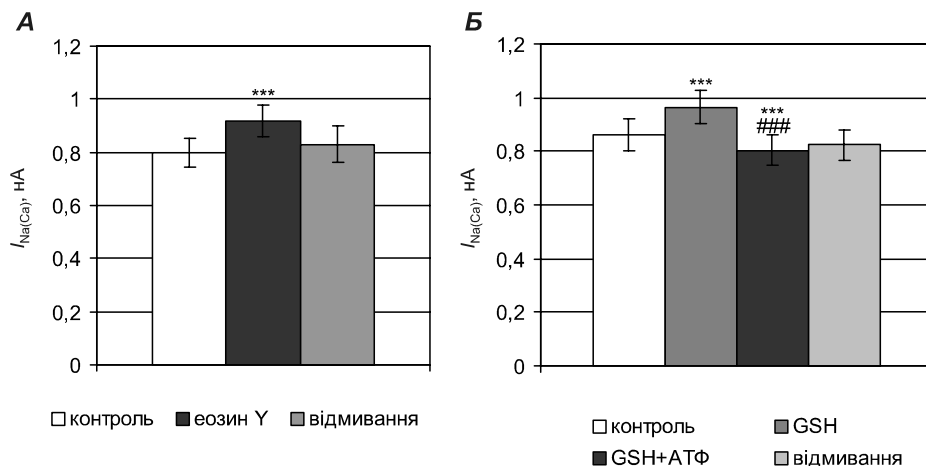
**Fig. 4.** Inward voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -current dependence on sodium concentration gradient in different values of holding potential and  $[\text{Ca}^{2+}]$  in cytosol [5, 7]:  $[\text{Na}^+]_e = 136.9$  (curves 1 and 3) or 16 (curves 2 and 4) mmol/l,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1.76$  mmol/l,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  mmol/l;  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 10 \mu\text{mol/l}$  (curves 3 and 4;  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -EGTA-buffer) or nominal  $\text{Ca}^{2+}$  free solution (curves 1 and 2); holding potential -85, -65 or -45 mV, tested potential – -25 mV; n = 6

Встановлено також [15], що внаслідок додавання до внутрішньоклітинного розчину блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи еозину Y амплітуда вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну

дещо збільшувалася (рис. 5, А). Аналогічно діє й інший блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ортованадат у концентрації 10 мкмоль/л, стимулюючий ефект якого, правда, зменшувався за концентрації 100 мкмоль/л. Відомо, що еозин Y є досить-таки специфічним інгібітором  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежних систем активного транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  та не пригнічує  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник [21]. Тим більше, він не може активувати функціонування обмінника. Тому збільшення амплітуди вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну (катиони  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язуються з внутрішньоклітинного боку плазматичної мембрани) зумовлене пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани (і, відповідно, збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у внутрішньоклітинному примембранному просторі).

А введення в клітину АТФ на фоні 1 ммоль/л GSH супроводжується зменшенням амплітуди вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну (рис. 5, Б). Причиною зменшення струму у цьому випадку є, на нашу думку, стимуляція надлишком АТФ функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани, оскільки порушення акумулювання  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях чи вивільнення його з депо не впливало на амплітуду струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну. Цілком можливо, що це зумовлено особливостями локалізації цих  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем чи органел, які їх містять. Стимулювання  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи призводить до зменшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі і, відтак, до пригнічення функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника.

Отже, тісні функціональні зв'язки існують і між  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником та  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою плазматичної мембрани. Тому ми маємо підстави говорити про наявність  **$\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани**. На відміну від вищеприписаної ендоплазматичної  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, катиони  $\text{Ca}^{2+}$  у цьому



**Рис. 5.** Зміна амплітуди вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну внаслідок блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи еозином Y (А) та її стимулювання аденозинтрифосфатом за наявності у середовищі відновленого глутатіону (Б) [15]:

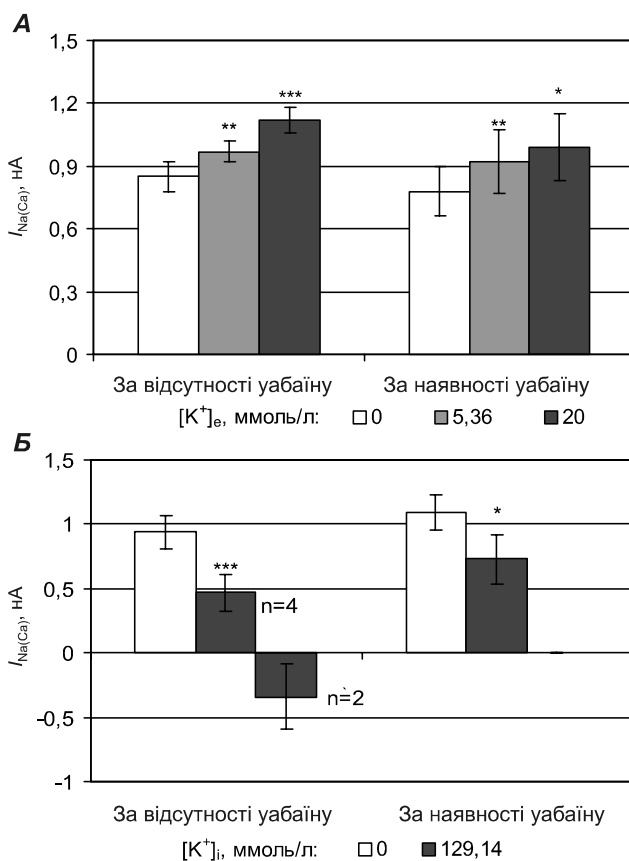
$[\text{Na}^+]_e = 136,9$  ммоль/л,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,76$  ммоль/л,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  ммоль/л; [еозин Y] $_e = 10$  мкмоль/л;  $[\text{GSH}]_i = 1$  ммоль/л,  $[\text{АТФ}]_i = 1$  ммоль/л; фіксований потенціал -20 мВ, тестований - -60 мВ; \*\*\* і ### – зміна достовірна відповідно відносно контролю та відносно GSH з  $P < 0,001$ ;  $n = 6$  і 10

**Fig. 5.** Inward current amplitude change of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange as a result of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump inhibition with eosin Y (A) and its stimulation with ATP in presence reduced glutathione (B) [15]:

$[\text{Na}^+]_e = 136.9$  mmol/l,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1.76$  mmol/l,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  mmol/l; [eosin Y] $_e = 10$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $[\text{GSH}]_i = 1$  mmol/l,  $[\text{ATP}]_i = 1$  mmol/l; holding potential -20 mV, tested potential -60 mV; \*\*\* and ### – difference is significant in comparison to control and GSH with  $P < 0.001$ ;  $n = 6$  and 10

випадку не депонуються в обмеженому просторі, а виводяться у позаклітинне середовище. Але для розуміння значення цієї  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці принципового значення це не має.

До певної міри стан  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани визначається залежністю  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну від активності  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи: наявність у середовищі убаїну дещо *нівелювало* ефект збільшення позаклітинної чи внутрішньоклітинної концентрації  $\text{K}^+$  (рис. 6), а також *підсилювало* ефект зменшення позаклітинної концентрації  $\text{Na}^+$  на амплітуду вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну [19].



**Рис. 6.** Залежність амплітуди вхідного струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну від позаклітинної (А) і внутрішньоклітинної (Б)  $[\text{K}^+]$  за наявності і відсутності убаїну в середовищі [19]: негативні значення амплітуди – вхідний напрям струму, позитивні – вихідний напрям;  $[\text{Na}^+]_e = 120$  ммоль/л,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,76$  ммоль/л,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  ммоль/л;  $[\text{K}^+]_i = 0$  ммоль/л (А),  $[\text{K}^+]_e = 5,36$  ммоль/л (Б); [убаїн] = 25 мкмоль/л; фіксований потенціал -20 мВ, тестований – -60 мВ; за контролю прийнято амплітуду струму за відсутності  $\text{K}^+$  у середовищі; \* – зміна достовірна відносно контролю з  $P < 0,05$ ; \*\* – з  $P < 0,01$ ; \*\*\* – з  $P < 0,001$ ; n = 7 і 6

**Fig. 6.** Inward current amplitude dependence of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange on extracellular (A) and intracellular (B)  $[\text{K}^+]$  in presence and absence ouabain in medium [19]: negative amplitude values – inward current, positive – outward current;  $[\text{Na}^+]_e = 120$  mmol/l,  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1.76$  mmol/l,  $[\text{Na}^+]_i = 16$  mmol/l;  $[\text{K}^+]_i = 0$  mmol/l (A),  $[\text{K}^+]_e = 5.36$  mmol/l (B); [ouabain] = 25  $\mu\text{mol/l}$ ; holding potential -20 mV, testing potential -60 mV; current amplitude in absence of  $\text{K}^+$  was taken as a control; \* – difference is significant in comparison to control with  $P < 0.05$ ; \*\* – with  $P < 0.01$ ; \*\*\* – with  $P < 0.001$ ; n = 7 and 6

Очевидно, така організація взаємовідносин між  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами плазматичної мембрани відіграє важливу роль для генерування фізіологічного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу у **базальному кальцієвому домені** – примембранному просторі базальної (базо-латеральної) частини секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*, відокремленому [2] від іншої частини цитоплазми надзвичайно щільним шаром мітохондрій.

Характерною ознакою  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани є її **залежність від рівня мембранного потенціалу**, а не лише від цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Власне деполяризація плазматичної мембрани внаслідок активації молекулою АТФ P2X-рецепторів спричиняє перехід цієї  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці у стан активності, що досягається активацією потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Такий висновок можна зробити, якщо, звичайно, не включати P2X-рецептори до складу  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани (у нас немає експериментальних даних, які б свідчили, що P2X-рецептори входять до складу цієї одиниці, хоча повністю відкидати таку можливість не можна).

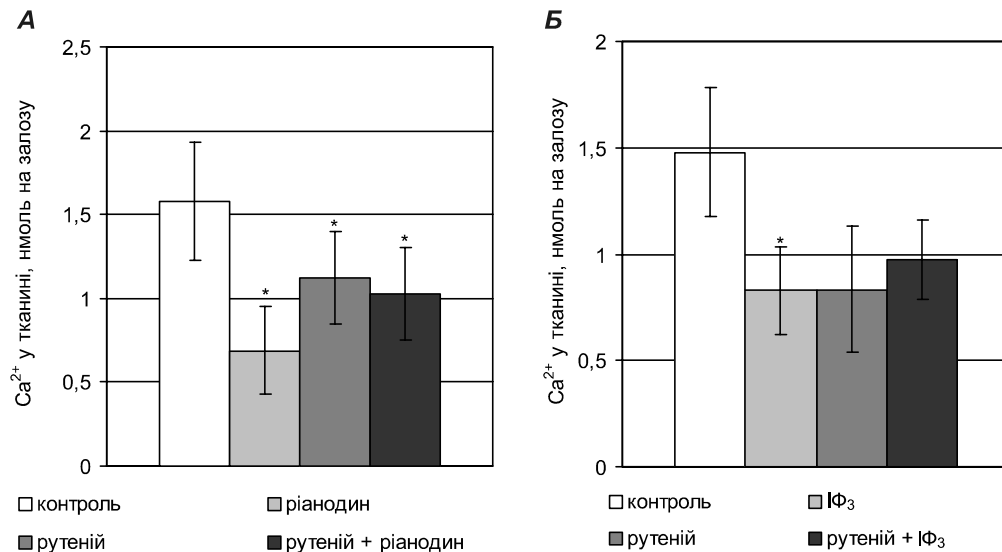
Обмеження надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозоль (**інактивація  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці**) теж реалізується не лише збільшенням цитозольної  $\text{Ca}^{2+}$ , а й подальшою деполяризацією плазматичної мембрани, тобто внаслідок не лише  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної, а й потенціалозалежної інактивації  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Крім того, деполяризація мембрани має часове обмеження для розвитку кальцієвої відповіді ще й за рахунок активації високопорогових потенціалкерованих  $\text{K}^+$ - і  $\text{Cl}^-$ -каналів. Гіперполяризація мембрани, що виникає внаслідок виходу катіонів  $\text{K}^+$  потенціалкерованими  $\text{K}^+$ -каналами (калієвий електрохімічний градієнт спрямований з клітини) та входу аніонів  $\text{Cl}^-$  потенціалкерованими  $\text{Cl}^-$ -каналами (хлорний електрохімічний градієнт спрямований у клітину), обмежує в часі можливість  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника транспортувати  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину. Тому головне значення  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, як і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани, є виведення  $\text{Ca}^{2+}$  у позаклітинне середовище і, тим самим, переведення  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани у стан спокою.

### **Ендоплазматично-мітохондріальна $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця**

У секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* можна виділити ще одну, **ендоплазматично-мітохондріальну  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю**, яка складається з каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  ендоплазматичного ретикулу та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій.

Базується цей висновок, перш за все, на тому, що ефекти ріанодину в активуючій ріанодинчутливій  $\text{Ca}^{2+}$ -канали та рутенію червоного за умови поєднання їх у середовищі інкубації мають **неадитивний** характер (рис. 7, А) [2]. Слід зазначити, що ефекти цих речовин повинні бути адитивними, якщо функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулу та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій не залежить одне від одного.

Виявлений ефект підтверджує модифікуючу дію мітохондрій на ріанодиндуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу. Відомо також, що рутеній червоний може пригнічувати вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  ріанодинчутливими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами [24]. Але у встановленому нами випадку такий механізм є неможливим, оскільки тоді рутеній червоний повністю запобігав би вивільненню  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу під впливом ріанодину.



**Рис. 7.** Зміни вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині слинних залоз, оброблених сапоніном, за одночасної дії ріанодину та рутенію червоного (А) й інозитолтрифосфату та рутенію червоного (Б) відповідно [2]:  $[\text{Na}^+] = 15,3$  ммоль/л,  $[\text{K}^+] = 129,94$  ммоль/л; [рутеній червоний] = 10 мкмоль/л, [ріанодин] = 5 нмоль/л;  $[\text{I}\Phi_3] = 10$  мкмоль/л; \* – різниця порівняно з контролем статистично достовірна з  $P < 0,05$ ;  $n = 6$  і 7

**Fig. 7.** Changes of  $\text{Ca}^{2+}$  content in tissue of salivary glands treated with saponin, simultaneous action of ryanodine and ruthenium red (A) or  $\text{InsP}_3$  and ruthenium red (B) respectively [2]:  $[\text{Na}^+] = 15.3$  mmol/l,  $[\text{K}^+] = 129.94$  mmol/l; [ruthenium red] = 10  $\mu\text{mol/l}$ , [ryanodine] = 5 nmol/l;  $[\text{InsP}_3] = 10$   $\mu\text{mol/l}$ ; \* – difference is significant in comparison to control with  $P < 0.05$ ;  $n = 6$  and 7

По-друге, за стимуляції  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів додаванням до середовища інкубації  $\text{I}\Phi_3$  та за одночасного пригнічення функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій рутенієм червоним (рис. 7, Б) не спостерігалось статистично достовірних змін вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз, оброблених сапоніном, порівняно з контролем (середовище, яке не містило ні рутенію червоного, ні  $\text{I}\Phi_3$ ). Хоча застосування  $\text{I}\Phi_3$  викликало статистично достовірне зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз, оброблених сапоніном, на  $43,78 \pm 11,82$  % ( $P = 0,042$ ,  $n = 7$ ) відносно контролю, і цей ефект неодноразово підтверджувався нами у попередніх експериментах. Таким чином, блокування рутенієм червоним процесу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями запобігає активуванню вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{I}\Phi_3$ -чутливого депо.

У досліджуваних клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер перебуває, мабуть, у стані динамічної рівноваги з розміщеними поруч каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо, і за відсутності стимуляції між цими структурами відбувається обмін іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Ці системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  і формують ендоплазматично-мітохондріальну  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональну одиницю, яка належить до II типу. У стані спокою внутрішньоклітинні  $\text{Ca}^{2+}$ -канали вивільняють певну кількість  $\text{Ca}^{2+}$ , які транспортуються не тільки поміпою назад у люмен ендоплазматичного ретикулуму, а й уніпортером у матрикс мітохондрій, тому не відбувається генерація клітинної відповіді. Заблокувавши уніпортер мітохондрій, ми спричинили, очевидно, локальне підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]$

поруч розташованого  $\text{I}\Phi_3$ -чутливого депо. Відомо, що на  $\text{I}\Phi_3$ -чутливому рецепторі наявні інгібіторні й активуючі сайти зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  [22, 25]. Відбувається, ймовірно, швидке зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з інгібіторними сайтами  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Це призводить до пригнічення, за принципом негативного зворотного зв'язку, подальшого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо. Тому одночасне застосування  $\text{I}\Phi_3$  та рутенію червоного не викликає зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз.

Оскільки функціонування ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів теж залежить від  $[\text{Ca}^{2+}]$  у цитозолі [41], то, аналогічно, за одночасної дії ріанодину та рутенію червоного зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз є менш вираженим, ніж за дії одного лише ріанодину. Можна припустити також, зважаючи на взаємозв'язок між вивільненням катіонів  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{I}\Phi_3$ -чутливими та ріанодинчутливими каналами (рис. 3), що пригнічення  $\text{I}\Phi_3$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  послаблює активацію його вивільнення з ріанодинчутливого депо. Для активації ріанодинчутливого депо необхідно, щоб  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали не були ані заблокованими, ані активованими.

Про чутливість мітохондрій до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{I}\Phi_3$ -чутливого і ріанодинчутливого депо  $\text{Ca}^{2+}$  існує достатньо даних, отриманих на різних клітинах, у тому числі секреторних: мітохондрії регулюють спряження  $\text{Ca}^{2+}$  – екзоцитоз у хромафінних клітинах [28], у пермеабілізованих клітинах слинних залоз м'ясної мухи вони здійснюють негативний контроль над частотою  $\text{I}\Phi_3$ -індукованих осциляцій  $\text{Ca}^{2+}$ , визначають тривалість міжспайкового інтервалу і, таким чином, перекодовують стимул, що модулюється амплітудою вивільнення  $\text{I}\Phi_3$ , у частоту цитозольних осциляцій  $\text{Ca}^{2+}$  [40]. Взаємодія між внутрішньоклітинними каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  та мітохондріями має відмінне значення залежно від розміщення самих мітохондрій у клітині. Таким чином мітохондрії здійснюють комплексний вплив на регулювання  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів у секреторних клітинах.

## ПІДСУМОК

Загальноприйняте положення, що цитозольний рівень  $\text{Ca}^{2+}$  визначається його потоками через плазматичну мембрану і мембрану ендоплазматичного ретикулуму, на сьогодні є недостатнім. Спричинило цю недостатність відкриття: а) локальних  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль [39] і б) локальних кальцієвих мікродоменів [23, 34, але див. 38], виникнення яких неможливо пояснити, виходячи із „макроцитозольної” позиції.

Локальні  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі – це **обмежені у просторі** та **часі** повторювані підвищення цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Найпростіші локальні  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали є двох типів:  $\text{Ca}^{2+}$ -спарки (sparks), які зумовлені активацією лише ріанодинових  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, наприклад, у кардіоміоцитах [27], і  $\text{Ca}^{2+}$ -пафи (puffs), зокрема, в ооцитах шпорцевої жаби [39], які спричинені активацією лише  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів. Інший приклад локального  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу характерний для апікального полюса секреторних клітин, наприклад, екзокринних клітин підшлункової залози [37]. Тут він характеризується повільнішим часом наростання амплітуди ( $>1$  с) і значнішим поширенням, до 10 мкм [31], що відрізняє їх від „класичних”  $\text{Ca}^{2+}$ -пафів. За певних умов  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиля, яка виникла на апікальному полюсі секреторної клітини, поширюється до базального полюса – локальний  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал перетворюється на

глобальний. Але для того, щоб таке перетворення відбулося, потрібне не лише узгоджене функціонування  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих і ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулуму –  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиля повинна подолати кордон із мітохондрій [35]. Встановлено також, що мітохондрії модулюють вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму, запобігаючи його позитивному зворотному впливу на  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали [29], і така взаємодія можлива лише за рахунок близького розташування цих двох органел [38]. Показана і важлива роль периферичних примембранних мітохондрій у депокерованому вході  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину [32, 35, 36].

Отже, навіть такий поверховий огляд дає змогу зробити висновок, що генерування  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль є неможливим без **узгодженості функціонування** різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, які належать різним клітинним мембранам.  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи не дублюють одні одних, їхнє функціонування є **взаємодоповнюючим**. Крім того, функціонування різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем є **взаємозалежним** за рахунок **позитивних прямих і негативних зворотних зв'язків** між ними. Ці зв'язки значною мірою реалізуються через зміну локальної  $[\text{Ca}^{2+}]$  біля устя  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу (**локальних кальцієвих мікродоменів**), оскільки функціонування багатьох  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем також є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом. Але загальної (уніфікованої) теорії, яка б задовільно пояснила роль **узгодженості функціонування** різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації, на сьогодні немає. Тому як робочу гіпотезу ми пропонуємо **концепцію  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональних одиниць**.

Оскільки прямі та зворотні зв'язки між  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами є обмежені в просторі та часі, ми дійшли висновку, що у клітині формуються цілі їхні ансамблі –  **$\text{Ca}^{2+}$ -функціональні одиниці**, з принципово новими властивостями і новими функціями, виконати які неможливо, якщо виходити з властивостей окремих їхніх складових частин. Обов'язковою умовою формування  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональні одиниці є входження до її складу **системи пасивного** і **системи активного** транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  та мембрани, що забезпечує компартменталізацію цих катіонів. Одні і ті ж самі транспортувальні системи (і мембрани) можуть входити до складу різних  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональних систем, що визначається особливостями певної клітини та доцільністю для процесів, які відбуваються у її різних частинах. Власне на цьому етапі організації  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації виникають такі властивості, притаманні функціонуванню  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, як нестатичність (динамічність), неадитивність, висока чутливість до агоністів, самопідсилення, самообмеження у часі тощо.

Лише виходячи із таких позицій, можна пояснити ті експериментальним чином встановлені факти, які важко було пояснити в рамках панівної парадигми. Це стосується і особливостей функціонування певної  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальної системи, і генерації  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі загалом. Звичайно, адекватне застосування концепції для трактування особливостей  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації (чи розвитку цієї концепції) можливе після проведення досліджень з використанням реєстрації цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$  за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих флуоресцентних зондів.

Цілком можливо, що із встановленням нових експериментальних даних запропонована концепція буде трансформуватися. Зокрема це стосується залежності функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем від активності інших іонтранспортувальних систем. Особливо актуальною є проблема виявлення

чинника, який забезпечує прямий і зворотний зв'язок між окремими складовими частинами  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, оскільки не завжди його вдається коректно ідентифікувати (досить показовим у цьому аспекті є проблема узгодженості активації потенціалкерованих і ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у кардіоміоцитах [30]). Таким чинником для  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці плазматичної мембрани може бути зміна мембранного потенціалу. В інших випадках цю роль можуть виконувати, на нашу думку,  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальні білки [див. 33].

1. Бичкова С.В., Манько В.В. Ріанодиніндуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2004; 35: 244–250.
2. Бичкова С., Манько В., Клевець М., Кулачковський О. Роль мітохондрій у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації секреторних клітин травних залоз. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2007; 44: 3–14.
3. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. **Курс варіаційної статистики**. Київ: Вища школа, 1977. 206 с.
4. Клевець М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин. **Физиол. журнал**, 1992; 38(3): 70–75.
5. Клевець М.Ю., Манько В.В. Вивчення натрієвого градієнта для реєстрації струму через кальцієві потенціалозалежні канали мембрани секреторних клітин. **XIV з'їзд Українського фізіологічного товариства**: Тези доп. Київ, 1994: 10–11.
6. Клевець М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В. **Дослідження нагромадження кальцію секреторними клітинами ізольованих слинних залоз личинки хірономуса та його значення для секреторного процесу** (Львів. ун-т). Львів, 1996. 22 с. Укр. Деп. в Укр. ІНТЕІ 29.10.96, № 87 – Ук 96.
7. Клевець М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В. та ін. Кальцій і плазматична мембрана секреторних клітин екзокринних залоз. **Вісн. Київ. ун-ту. Фізіологія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій**, 2000; 6: 9–13.
8. Король Т., Манько В., Клевець М. Вплив блокаторів потенціалозалежних кальцієвих каналів на стимульований гіперкалієвою деполяризацією вхід  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини екзокринних залоз та їх секреторну відповідь. **Галицький лікарський вісник**, 1998; 5(3): 46–48.
9. Король Т.В., Манько В.В., Клевець М.Ю. Дослідження активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. **Біологія тварин**, 2000; 2(1): 92–97.
10. Манько В.В. Характеристика струмів потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Київ, 1995. 21 с.
11. Манько В.В.  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи внутрішньоклітинних депо секреторних клітин малоклітинних залоз. I. Ідентифікація. **Матеріали міжнародної конференції, присвяченої пам'яті професора Шостаковської Ірини Василівни** (11–12 жовтня 2002 р., м. Львів). Львів, 2002: 28–33.
12. Манько В.В. Методологічні підходи до дослідження  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну в екзокринних секреторних клітинах. **Укр. біохім. журнал**, 2006; 78 (1): 43–62.
13. Манько В.В., Бичкова С.В., Клевець М.Ю. Ідентифікація каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(1): 65–71.
14. 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.



15. Манько В.В., Клевец М.Ю., Ларина О.А. Зависимость амплитуды тока  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмена мембраны секреторных клеток от функциональной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса в условиях внутриклеточной перфузии. II съезд биофизиков России (23–27 августа 1999 г., Москва): Тез. докл. Москва, 1999; 2: 537–538.
16. Манько В.В., Клевец М.Ю., Ларина О.А., Стельмах С.В. Слинні залози личинки *Chironomus plumosus* як об'єкт для досліджень  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем секреторних клітин екзокринних залоз. **Біологіч. вестн**, 2001; 5 (1–2): 133–136.
17. Манько В.В., Клевец М.Ю., Федірко Н.В. Методичні підходи для виявлення трансмембранного струму натрій-кальцієвого обміну. **Нейрофізіологія / Neurophysiology**, 1998; 30(4/5): 275–278.
18. Манько В.В., Король Т.В., Клевец М.Ю., Демків О.Т. Дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем секреторних клітин екзокринних залоз з використанням хлортетрацикліну. **Вісн. Харк. ун-ту, № 488. Біофіз. вісн**, 2000; 6(1): 79–81.
19. Манько В., Ларина О., Клевец М. Залежність струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну плазматичної мембрани екзокринних секреторних клітин від функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2001; 27: 218–224.
20. Манько В.В., Стельмах С.В. Вплив рутенію червоного на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2002; 29: 171–176.
21. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Черныш И.Г. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток. **Биохимия**, 1998; 63(6): 812–819.
22. Adkins C.E., Taylor C.W. Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . **Current Biol**, 1999; 9: 1115–1118.
23. Ashby M.C., Craske M., Park M.K., Gerasimenko O.V. et al. Localized  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging reveals polarized distribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release sites: mechanism of unidirectional  $\text{Ca}^{2+}$  waves. **J. Cell. Biol**, 2002; 158: 283–292.
24. Beutner G., Sharma V.K., Lin L. et al. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: characterization of the subtype. **Biophys. J**, (Annual Meeting Abstracts), 2002; 82: 110.
25. Bootman M. D., Lipp P. Calcium signalling: ringing changes to the „bell-shaped curve”. **Current Biol**, 1999; 9: R876–878.
26. Cancela J.M., Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V. et al. Two different but converging messenger pathways to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. **EMBO J**, 2000; 19(11): 2549–2557.
27. Cannell M.B., Soeller C. Sparks of interest in cardiac excitation-contraction coupling. **Trends Pharmacol. Sci**, 1998; 19: 16–20.
28. Giovannucci D.R., Groblewski G.E., Sneyd J., Yule D.I. Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized  $\text{Ca}^{2+}$  release and shapes oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals. **J. Biol. Chem**, 2000; 275(43): 33704–33711.
29. Hajnoczky G., Hager R., Thomas A.P. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by  $\text{Ca}^{2+}$ . **J. Biol. Chem**, 1999; 274: 14157–14162.
30. Inoue M., Bridge J.H.B.  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in rabbit ventricular myocytes evoked by action potentials. Involvement of clusters of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **Cell. Biol**, 2003; 92: 532–538.
31. Kidd J.F., Fogarty K.E., Tuft R.A., Thorn P. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  feedback in shaping  $\text{InsP}_3$ -evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells. **J. Physiol**, 1999; 520: 187–201.
32. Knot H.J., Laher I., Sobie E.A. et al. Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. **Molecular Interventions**, 2005; 5: 112–127.

33. Li Q., Luo X., Muallem S. Functional mapping of Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in plasma membrane microdomains of polarized cells. **J. Biol. Chem**, 2004; 279(27): 27837–27840.
34. Lipscombe D., Madison D.V., Poenie M. et al. Imaging of cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients arising from Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> channels in sympathetic neurons. **Neuron**, 1988; 1: 355–365.
35. Park M.K., Ashby M.C., Erdemli G. et al. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. **EMBO J**, 2001; 20(8): 1863–1874.
36. Petersen O.H. Localization and regulation of Ca<sup>2+</sup> entry and exit pathways in exocrine gland cells. **Cell Calcium**, 2003; 33: 337–344.
37. Petersen O.H., Burdakov D., Tepikin A.Y. Polarity in intracellular calcium signaling. **BioEssays**, 1999; 21: 851–860.
38. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. **Physiol. Rev**, 2006; 86: 369–408.
39. Yao Y., Choi J., Parker I. Quantal puffs of intracellular Ca<sup>2+</sup> evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. **J. Physiol**, 1995; 482: 533–553.
40. Zimmermann B. Control of Ins P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. **J. Physiol**, 2000; 525(3): 707–719.
41. Zucchi R., Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. **Pharmacol. Reviews**, 1997; 49(1): 1–52.

Одержано: 10.06.2008