

УДК 612.3:591.413.2

**ВИКОРИСТАННЯ РІВНЯННЯ ХІЛЛА ДЛЯ КІНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ
Ca²⁺-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН
ЛИЧИНКИ *CHIRONOMUS PLUMOSUS***

В.В.Манько

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

У роботі обґрунтовано використання рівняння Хілла та підібрані критерії для кінетичного аналізу функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем плазматичної мембрани секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна. Розрахунок параметрів рівняння Хілла проводили з використанням модифікованих координат Іді-Хофсті. Жодного застереження не викликає застосування рівняння Хілла для опису залежності амплітуди трансмембранного струму Na⁺-Ca²⁺-обміну від концентрації відповідного ліганду. Але значення коефіцієнта Хілла $n > 1$ залежності вхідного струму Na⁺-Ca²⁺-обміну від [Ca²⁺]_e свідчить не про кооперативність транспортуваних катіонів, а про алостеричну регуляцію обмінника цитозольним Ca²⁺. Постулюється також, що рівняння Хілла можна використовувати і для такої гетерогенної системи, якою є лігандіндуковані зміни вмісту Ca²⁺ у тканині залоз. У цьому випадку слід абстрагуватися від властивостей конкретних Ca²⁺-транспортувальних систем; якщо $n = 1$, то це є свідченням специфічності зв'язування ліганду лише з однією Ca²⁺-транспортувальною системою в заданому діапазоні концентрацій (наприклад, еозину Y з Ca²⁺-помпою плазматичної мембрани). За $n > 1$ можна припустити, що кілька Ca²⁺-транспортувальних систем є задіяні в односпрямованих змінах вмісту Ca²⁺ (наприклад, активація функціонування Na⁺-Ca²⁺-обмінника у зворотному режимі і пригнічення Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани) за умови, що чутливість цих систем до ліганду лежить в одному і тому ж самому діапазоні. І, навпаки, те, що $n < 1$, є наслідком односпрямованих змін різноспрямованих Ca²⁺-транспортувальних систем (наприклад, пригнічення потенціалкерованих Ca²⁺-каналів і Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани).

Ключові слова: секреторні клітини, Na⁺-Ca²⁺-обмінник, Ca²⁺-помпа, потенціалкеровані Ca²⁺-канали, рівняння Хілла, координати Іді-Хофсті, кінетика.

USE OF HILL EQUATION FOR KINETIC ANALYSIS OF Ca^{2+} -TRANSPORTING SYSTEMS OF *CHIRONOMUS PLUMOSUS* LARVAE SECRETORY CELLS

V.V.Manko

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

Hill equation was used for kinetic analysis of functioning plasma membrane Ca^{2+} -transporting systems in salivary gland's secretory cells of *Chironomus plumosus* larvae. For the calculation of Hill equation parameters, modified Eadie-Hofstee plot was used. Hill equation was applied for description of Na^+ - Ca^{2+} exchange transmembrane current dependence on appropriate ligand concentration. However, when the value of Hill coefficient $n > 1$ for Na^+ - Ca^{2+} exchange, inward current dependence on $[\text{Ca}^{2+}]_e$ was found. It testifies to exchanger allosteric regulation by cytosolic Ca^{2+} but not to transported cations cooperativity. It is also postulated that Hill equation may be used to describe such heterogenic system as ligand-induced changing of Ca^{2+} content in the gland tissue. In this case it should be abstracted away from specific Ca^{2+} -transporting systems properties; in case of $n = 1$ it specific ligand linking to only one Ca^{2+} -transporting system is evident at given concentration magnitude (for example, eosin Y with plasma membrane Ca^{2+} -pump). In case of $n > 1$, one can propose several Ca^{2+} -transporting systems to take part in single-directed Ca^{2+} content changes (for example, Na^+ - Ca^{2+} exchanger activation in reverse mode and plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibition) under the condition, when the system sensitivity to ligand is in the same range. Vice versa, if $n < 1$, single-directed changes in different-directed Ca^{2+} -transporting systems can be observed (for example, voltage operated Ca^{2+} -channels and Ca^{2+} -pump of plasma membrane inhibition).

Key words: secretory cells, Na^+ - Ca^{2+} exchanger, Ca^{2+} -pump, voltage operated Ca^{2+} -channels, Hill equation, Eadie-Hofstee plot, kinetics.

ВСТУП

Метод аналізу експериментальних даних, який запропонував у 1910 р. англійський фізіолог Арчібальд Вівіан Хілл [18], і сьогодні досить часто використовують в електрофізіологічних дослідженнях. Це пояснюється тим, що коефіцієнт Хілла (n) є визначальним параметром у з'ясуванні ступеня кооперативності зв'язування лігандів з протеїнами. За наявності позитивної кооперативності коефіцієнт n відображає мінімальну кількість взаємодіючих сайтів протеїну [25, 26]. Розробляються й емпіричні принципи інтерпретації коефіцієнта n за негативної кооперативності зв'язування лігандів [11].

Відомі також і обмеження використання цього методу. Особливо обережно слід застосовувати його під час аналізу параметрів гетерогенних систем [3]. Тим не менше, координати Хілла широко використовують для з'ясування особливостей функціонування різних іонтранспортувальних систем [17, 21, 27]. Перед нами стояло завдання підібрати критерії та проаналізувати, використовуючи рівняння Хілла, функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі проаналізовано експериментальні дані, отримані раніше з метою ідентифікації та встановлення властивостей Na^+ - Ca^{2+} -обмінника [5, 14], Ca^{2+} -помпи [9] та потенціалокерованих Ca^{2+} -каналів [6] плазматичної мембрани секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus*. Струм Na^+ - Ca^{2+} -обміну реєстрували у відповідь на раптову гіперполяризацію плазматичної мембрани (детальніше див. [8]); властивості Na^+ - Ca^{2+} -обмінника досліджували також, аналізуючи зміни вмісту Ca^{2+} у тканині залоз після їхнього інкубування у гіпонатрієвих середовищах [8]. Потенціалокеровані Ca^{2+} -канали активували гіперкалієвою деполяризацією плазматичної мембрани [4]. Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани [9] досліджували, додаючи до середовища інкубування залоз її блокатор еозин Y.

Усі розрахунки проводили за допомогою стандартного пакета *Microsoft Excel*. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували із застосуванням методу найменших квадратів [1]. Для цього у *Microsoft Excel* передбачено використання коефіцієнта детермінованості R^2 – нормований показник суми квадратів відхилень експериментальних точок від розрахованих за відповідним рівнянням. Чим ближчий він до одиниці, тим кращою є кореляція між моделлю і фактичними даними. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера; достовірною вважали таку апроксимацію, за якої $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Теоретичні передумови

Взаємодія рецептора (R) з n молекулами лігандів (L) описується рівнянням:



Якщо реакція (1) приводить до активації певного процесу, то рівняння Хілла відображає відношення кількості рецепторів, що провзаємодіяли з лігандами (B), до загальної кількості рецепторів цих лігандів (T):

$$\frac{B}{T} = \frac{[RL_n]}{[R] + [RL_n]}, \quad (2)$$

де
$$[RL_n] = \frac{[R] \cdot [L]^n}{K_d}, \quad (3)$$

тому
$$\frac{B}{T} = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} \quad (4)$$

або
$$\frac{B}{T} = \frac{[L]^n}{K_{0,5}^n + [L]^n}, \quad (5)$$

де $[L]$ – концентрація ліганду; $K_{0,5}$ – концентрація ліганду, за якої $B = \frac{1}{2} T$; n – коефіцієнт Хілла.

Дію лігандів-антагоністів можна охарактеризувати часткою рецепторів, не зв'язаних з ними:

$$\frac{N}{T} = 1 - \frac{[L]^n}{K_{0,5}^n + [L]^n} \quad (6)$$

або

$$\frac{N}{T} = \frac{K_{0,5}^n}{K_{0,5}^n + [L]^n}, \quad (7)$$

де $N = T - B$ – значення показника досліджуваного процесу за дії блокатора у відповідній концентрації ($[L]$); T – значення показника до дії блокатора; $K_{0,5}$ – константа, що дорівнює концентрації блокатора, за якої значення показника зменшується наполовину; n – коефіцієнт Хілла.

Що рахувати?

У ферментативній кінетиці швидкість біохімічної реакції (V) за відповідної концентрації ліганду є тим параметром, за яким можна оцінити (з деякими застереженнями [3]) кількість зв'язаних лігандів (B). Відповідно, за максимальною швидкістю реакції (V_{\max}) можна оцінити загальну кількість лігандів (T). Тому рівняння (5) тут матиме такий вигляд:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[L]^n}{K_{0,5}^n + [L]^n}. \quad (8)$$

В електрофізіології швидкість транспортування іонів характеризується амплітудою трансмембранного струму (кількість перенесеного заряду за одиницю часу). Тому рівняння Хілла за дії лігандів-агоністів можна записати так:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{[L]^n}{K_{0,5}^n + [L]^n}, \quad (9)$$

де I – амплітуда струму за дії агоніста у відповідній концентрації ($[L]$); I_{\max} – розраховане максимальне значення досліджуваної величини; константа $K_{0,5}$ – концентрація агоніста, за якої $I = \frac{1}{2} I_{\max}$; n – розрахований коефіцієнт Хілла.

Набагато складніше оперувати іншими показниками, які не характеризують швидкість перебігу процесу. У цьому випадку величина B (і, відповідно, T) – це лігандіндукована зміна встановленого показника. Так, використовуючи вміст Ca^{2+} у тканині залоз як показник функціонування тієї чи іншої Ca^{2+} -транспортувальної системи, слід піддавати аналізу не сам вміст Ca^{2+} , а його зміни, спричинені відповідним агоністом.

Як рахувати?

Спочатку розглянемо підходи аналізу агоністіндукованих змін досліджуваних показників.

У більшості випадків експериментаторові є доступним із рівняння (5) лише значення величини B за відповідної концентрації ліганду L . Таким чином, невідомими є аж три величини – T , $K_{0,5}$ і n . Їх можна лише розрахувати.

Традиційним способом розрахунку параметрів рівняння Хілла у цьому випадку є трансформація рівняння (5) до виразу

$$\lg \frac{B}{T - B} = n \lg [L] - \lg K_{0,5}^n. \quad (10)$$

Залежність $\lg \frac{B}{T - B}$ від $\lg [L]$ за правильно підбраного значення T – це пряма лінія з нахилом n [3].

Ми використали для розрахунку параметрів рівняння Хілла видозмінені координати Іді-Хофсті.

Метод Іді-Хофсті застосовують для лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен та визначення, відповідно, V_{max} і K_m цієї залежності [3]. Для цього будують графік

у координатах V від $\frac{V}{[S]}$ та лінеаризують його, використовуючи метод найменших квадратів. Причому метод Іді-Хофсті є більш точним, ніж метод Лайнуівера-Берка, оскільки V входить у величини, що відкладаються на обох осях [3].

Подібний підхід ми використали для лінеаризації рівняння Хілла. Для цього рівняння (5) трансформували так:

$$B \cdot K_{0,5}^n + B \cdot [L]^n = T \cdot [L]^n ; \quad (11)$$

$$B \cdot [L]^n = T \cdot [L]^n - B \cdot K_{0,5}^n ; \quad (12)$$

$$B = -K_{0,5}^n \cdot \frac{B}{[L]^n} + T . \quad (13)$$

Залежність B від $\frac{B}{[L]^n}$ за точно підбраного значення коефіцієнта n – це пряма, що перетинає обидві осі в ділянці позитивних значень; вісь ординат пряма перетинає у точці, рівній T , а вісь абсцис – у точці $\frac{T}{K_{0,5}^n}$.

Прикладом застосування рівняння (13) є дослідження залежності амплітуди вхідного струму Na^+ - Ca^{2+} -обміну секреторних клітин слинних залоз від $[Ca^{2+}]_e$ (рис. 1).

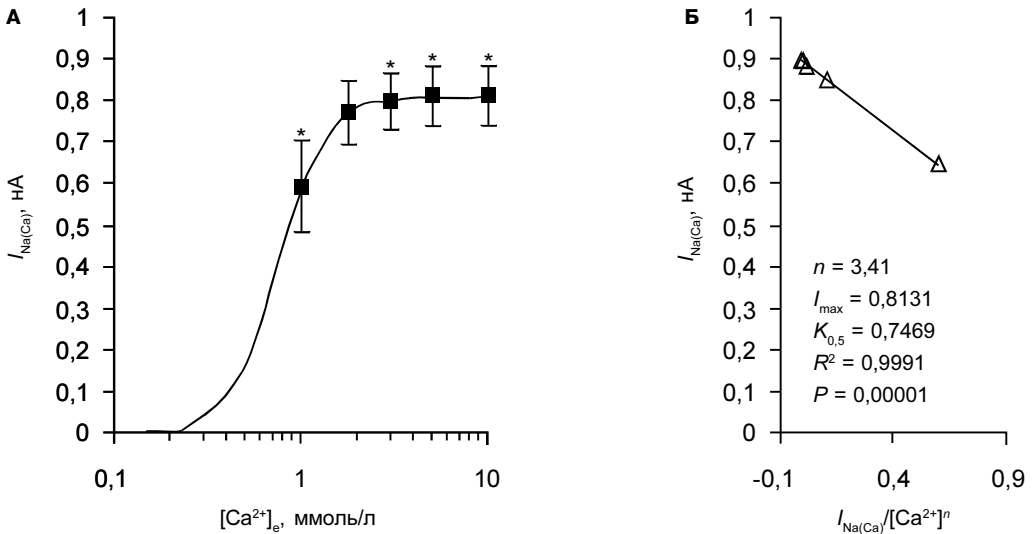


Рис. 1. Залежність амплітуди вхідного струму Na^+ - Ca^{2+} -обміну від $[Ca^{2+}]_e$:

А – концентраційна залежність у напівлогарифмічних координатах, описана рівнянням Хілла

$$I = \frac{I_{max} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_{0,5}^n + [Ca^{2+}]^n} ; \quad \mathbf{Б} - \text{лінійна залежність у видозмінених координатах Іді-Хофсті, яка відповідає}$$

рівнянню $I = -K_{0,5}^n \cdot \frac{I}{[Ca^{2+}]^n} + I_{max}$; фіксований потенціал (ФП) = -20 мВ, тестований потенціал (ТП) = -60 мВ, $[Na^+]_e = 136,9$ ммоль/л, $[Na^+]_i = 16$ ммоль/л; за контроль прийнято амплітуду струму при $[Ca^{2+}]_e = 1,76$ ммоль/л; * – зміна достовірна стосовно контролю з $P < 0,05$; $n = 7$

Особливо зручно використовувати рівняння (13) тоді, коли величина T справді є невідомою і її необхідно розрахувати. Власне, у фізіології, коли встановлюється активність не очищеного ферменту, а ферментного комплексу в гомогенаті тканин чи в інтактних клітинах, майже завжди доцільнішим є розраховувати цей параметр, а не встановлювати його експериментальним шляхом. Це наглядно проілюстровано на рис. 2, де представлено аналіз ефекту еозину Y на вміст Ca^{2+} у тканині залоз. У цьому випадку еозин Y є агоністом, оскільки він спричиняє, блокуючи Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани, збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині. Як видно, цей процес (висхідна частина залежності) досить добре описується рівнянням Хілла, хоча максимальне лігандіндуковане збільшення вмісту Ca^{2+} (за концентрації 5 мкмоль/л) лежить досить-таки далеко від теоретично розрахованого значення T . Це зумовлено, мабуть, тим, що еозин Y у вищих концентраціях пригнічує Ca^{2+} -помпу не лише плазматичної мембрани, але й ендоплазматичного ретикулу. Як наслідок, спостерігається відносне зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині.

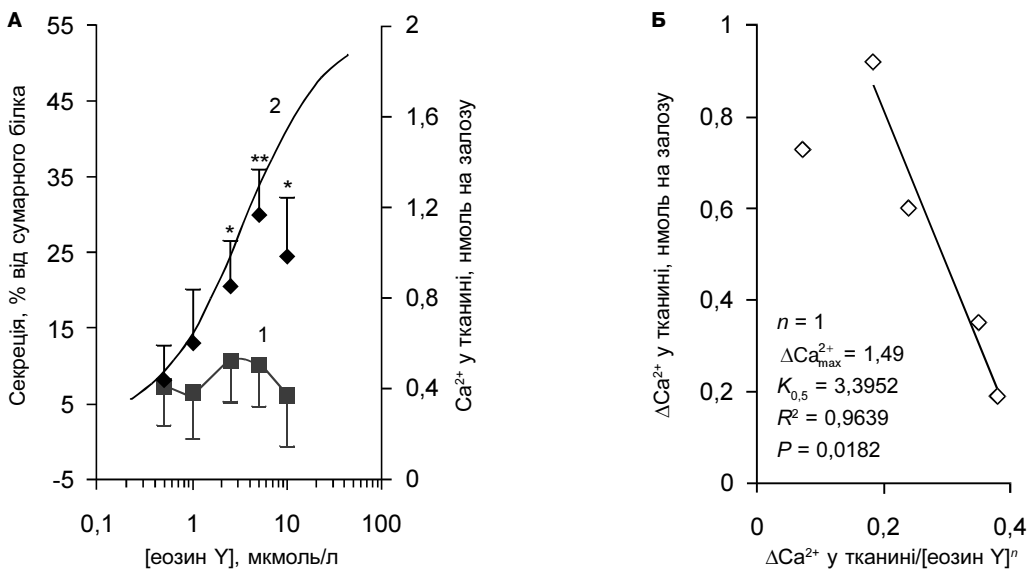


Рис. 2. Вплив еозину Y на секрецію загального білка і вміст Ca^{2+} у тканині залоз:

А – залежність секреції (1) і вмісту Ca^{2+} у тканині (2) від концентрації еозину Y у напівлогарифмічних координатах; висхідна частина кривої 2 описується рівнянням Хілла

$\Delta Ca^{2+} = \frac{\Delta Ca_{max}^{2+} \cdot [eosin Y]^n}{K_{0,5}^n + [eosin Y]^n}$; **Б** – залежність висхідної частини зміни вмісту Ca^{2+} у тканині від концентрації еозину Y у видозмінених координатах Іді-Хофсті, яка відповідає рівнянню

$\Delta Ca^{2+} = -K_{0,5}^n \frac{\Delta Ca^{2+}}{[eosin Y]^n} + \Delta Ca_{max}^{2+}$; * – зміна достовірна стосовно контролю з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$; $n = 8$

У деяких випадках зручніше аналізувати не абсолютні значення відповідних показників, а нормалізовані. На рис. 3 представлена залежність між $[Ca^{2+}]_e$ та спричиненими гіпонатрієвим середовищем змінами вмісту Ca^{2+} у тканині залози, які були нормалізовані до змін вмісту Ca^{2+} у тканині за фізіологічного значення $[Ca^{2+}]_e$ (1,76 ммоль/л).

Аналогічно, для лінеаризації рівняння (7), що описує лігандіндуковане зменшення відповідного показника, ми його трансформували до виразу

$$N = -\frac{N \cdot [L]^n}{K_{0,5}^n} + T \quad (14)$$

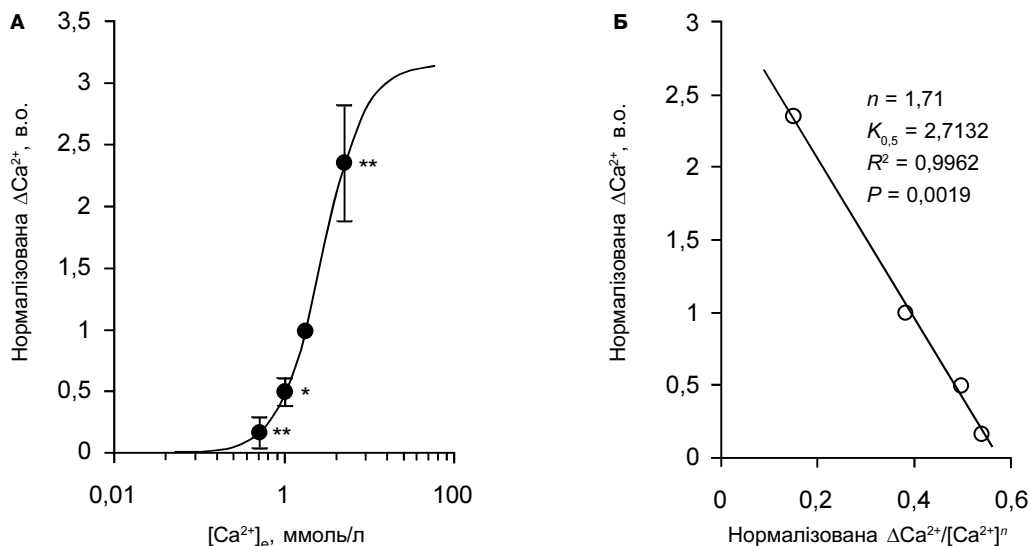


Рис. 3. Залежність нормалізованих змін вмісту Ca²⁺ у тканині залоз, індукованих гіпонатрієвим середовищем (35 ммоль/л), від [Ca²⁺]_e:

А – залежність у напівлогарифмічних координатах, описана рівнянням $\Delta Ca^{2+} = \frac{\Delta Ca_{max}^{2+} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_{0,5}^n + [Ca^{2+}]^n}$;

Б – ця ж залежність у модифікованих координатах Іді-Хофсті, отримана за рівнянням

$$\Delta Ca^{2+} = -K_{0,5}^n \frac{\Delta Ca^{2+}}{[Ca^{2+}]^n} + \Delta Ca_{max}^{2+}, \text{ де } \Delta Ca^{2+} - \text{різниця між вмістом Ca}^{2+} \text{ у тканині за відповідної } [Ca^{2+}]_e$$

та за [Ca²⁺]_e = 0 ммоль/л; дані нормалізували до змін вмісту Ca²⁺ за [Ca²⁺]_e = 1,76 ммоль/л (до контролю); * – зміна достовірна відносно контролю з P < 0,05, ** – з P < 0,01; n = 7

У цьому випадку пряма повинна описувати експериментальні дані в координатах {N; N·[L]ⁿ}. Тим не менше, у багатьох випадках використовувати рівняння (14) недоцільно, оскільки T – значення досліджуваного параметра за відсутності блокатора (у контролі), і немає потреби її розраховувати. Рівняння (14) краще представити у вигляді

$$\frac{N}{T} = -\frac{1}{K_{0,5}^n} \cdot \frac{N \cdot [L]^n}{T} + 1. \tag{15}$$

Відповідно експериментальні дані слід апроксимувати прямою в координатах

$\left\{ \frac{N}{T}, \frac{N \cdot [L]^n}{T} \right\}$ за умови, що вона перетинає вісь ординат у точці 1. Досить показовим

у цьому випадку є рис. 4, на якому наведено зменшення амплітуди вхідного струму Na⁺-Ca²⁺-обміну під впливом катіонів La³⁺ за фізіологічної (1,76 ммоль/л) та підвищеної до 10 ммоль/л [Ca²⁺]_e. Амплітуда струму у контролі (до дії блокатора) в обох випадках відома. Крім того, це дві різні серії дослідів, тому амплітуда струму в контролі може відрізнятись, але це не має впливати на інтерпретацію результатів досліджень.

Ще один випадок використання рівняння (15) продемонстровано на рис. 5. У цьому випадку рівняння Хілла задовільно описує пригнічення катіонами La³⁺ стимульоване гіперкалієвою деполяризацією збільшення вмісту Ca²⁺ у тканині залоз, опосередковане активацією потенціалокерованих Ca²⁺-каналів плазматичної мембрани.

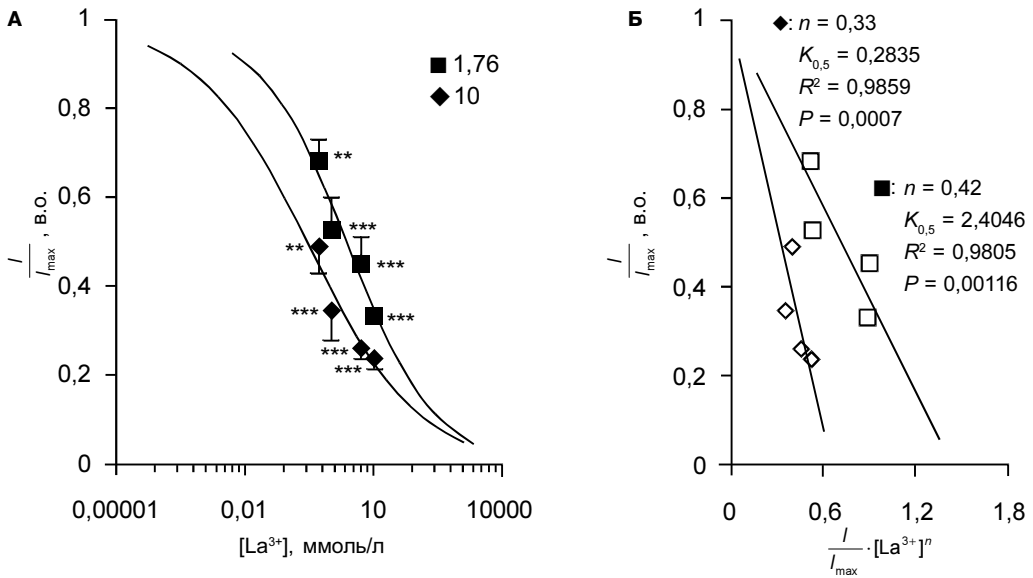


Рис. 4. Зменшення амплітуди вхідного струму Na^+ – Ca^{2+} -обміну за фізіологічної (1,76 ммоль/л) та підвищеної до 10 ммоль/л $[\text{Ca}^{2+}]_e$ під впливом катіонів La^{3+} :

А – концентраційна залежність ефекту La^{3+} в напівлогарифмічних координатах, в обох випадках описується рівнянням Хілла $\frac{I}{I_{\max}} = \frac{K_{0,5}^n}{K_{0,5}^n + [\text{La}^{3+}]^n}$; **Б** – лінійна залежність у видозмі-

нених координатах Іді-Хофсті, яка відповідає рівнянню $\frac{I}{I_{\max}} = -\frac{1}{K_{0,5}^n} \cdot \frac{I \cdot [\text{La}^{3+}]^n}{I_{\max}} + 1$; ФП = -20 мВ, ТП = -60 мВ, $[\text{Na}^+]_e = 136,9$ ммоль/л, $[\text{Na}^+]_i = 16$ ммоль/л; ** – зміна достовірна стосовно контролю з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$; $n = 6$

Інтерпретація отриманих параметрів

Коли трансмембранний іонний струм зумовлений функціонуванням лише однієї іонтранспортувальної системи, що транспортує лише один тип іонів, то використання рівняння Хілла для опису цього процесу є повністю виправдане. Якщо не зважати, звичайно, на можливість реалізації лігандіндукованого ефекту цитоплазматичними регуляторними шляхами. Деяко складнішою є система Na^+ – Ca^{2+} -обміну через плазматичну мембрану, оскільки нею одночасно транспортуються два типи катіонів. Крім того, і катіони Ca^{2+} , і катіони Na^+ опосередковано через внутрішньоклітинну регуляторну петлю обмінника можуть змінювати його активність [12]. Ділянка внутрішньоклітинної петлі між амінокислотними залишками 371 і 508 обмінника кардіоміоцитів ідентифікована як високоафінний Ca^{2+} -зв'язуючий сегмент [20].

Тому, на нашу думку, високе значення коефіцієнта n , отримане в ході дослідження залежності амплітуди вхідного струму Na^+ – Ca^{2+} -обміну (див. рис. 1), зумовлене не стільки здатністю обмінника одночасно транспортувати велику кількість катіонів Ca^{2+} , скільки його активацією цими іонами. Цей висновок базується на таких фактах.

Вхідний струм Na^+ – Ca^{2+} -обміну, зареєстрований за фізіологічного натрієвого градієнта, відображає Na_e^+ -залежне виведення з клітини цитозольного Ca^{2+} . У зв'язку з цим його амплітуда мала би прямо залежати від $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і обернено – від $[\text{Ca}^{2+}]_e$ при тестованому потенціалі. Встановлена ж залежність задовільно описується рівнянням Хілла. Це можна пояснити, виходячи з твердження, що за тривалого фіксування мембранного потенціалу внаслідок функціонування Na^+ – Ca^+ -обмінника встановлюється термодинамічна рівновага між електрорушійною силою катіонів Na^+

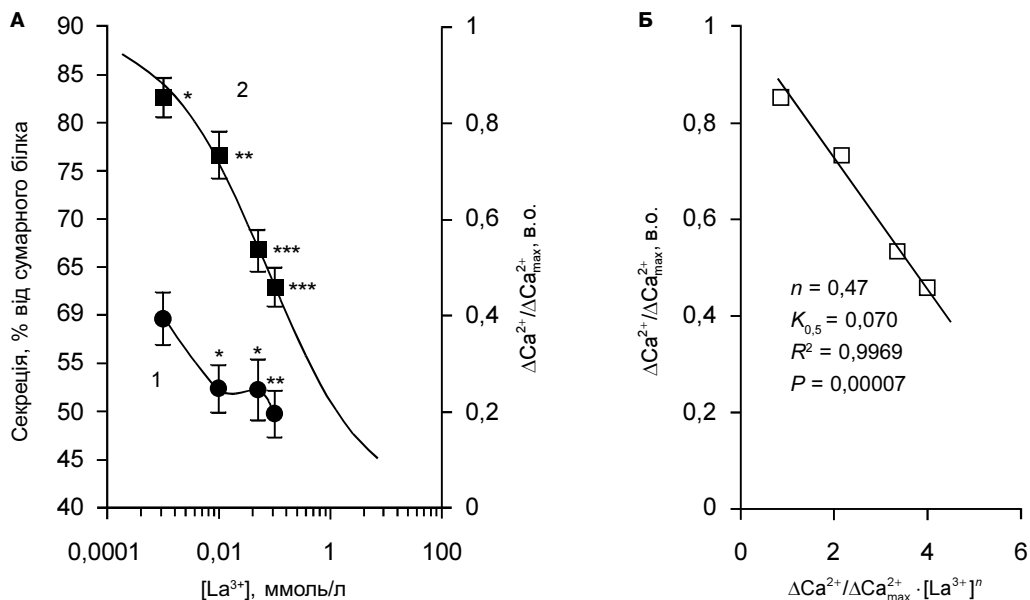


Рис. 5. Вплив La^{3+} на вміст білка у середовищі інкубування і K^+ -стимульоване збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залози:

А – залежність вмісту загального білка у середовищі (1) та K^+ -стимульованого збільшення Ca^{2+} у тканині (2) від $[La^{3+}]$ в напівлогарифмічних координатах; залежність K^+ -стимульованого збільшення

Ca^{2+} описується рівнянням Хілла $\frac{\Delta Ca^{2+}}{\Delta Ca_{max}^{2+}} = \frac{K_{0,5}^n}{K_{0,5}^n + [La^{3+}]^n}$; **Б** – лінійна залежність зміни вмісту Ca^{2+}

у видозмінених координатах Іді-Хофсті згідно з рівнянням $\frac{\Delta Ca^{2+}}{\Delta Ca_{max}^{2+}} = \frac{1}{K_{0,5}^n} \cdot \frac{\Delta Ca^{2+} \cdot [La^{3+}]^n}{\Delta Ca_{max}^{2+}} + 1$;

* – різниця порівняно з контролем достовірна з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$; $n = 6$

і $Ca^{2+} - \Delta \mu_{Na}$ і $\Delta \mu_{Ca}$. Якщо припустити, що $\Delta \mu_{Na}$ в умовах поза- і внутрішньоклітинної перфузії є досить стабільною величиною, то внаслідок збільшення $[Ca^{2+}]_e$ збільшиться і $[Ca^{2+}]_i$. Тому встановлена залежність вхідного струму $Na^+ - Ca^{2+}$ -обміну від поза-клітинного Ca^{2+} відображає, по суті, його залежність від $[Ca^{2+}]_i$.

Для $Na^+ - Ca^{2+}$ -обміну через плазматичну мембрану збудливих клітин у зворотному режимі (Na^+ -залежного входу Ca^{2+} у клітину) характерною є виражена залежність від цитозольної $[Ca^{2+}]_i$. Зокрема, вихідний струм $Na^+ - Ca^{2+}$ -обміну кардіоміоцитів шлуночків підсилюється цитозольним Ca^{2+} з $K_{0,5}$ 22 ммоль/л і коефіцієнтом Хілла n 3,7 [21]. Оскільки функціонування обмінника підсилюють ті катіони Ca^{2+} , які не транспортуються, то такий їхній ефект Блаустейн і Ледерер назвали *каталітичним* [12]. Інші дослідники такий ефект катіонів Ca^{2+} називають *алостеричним* [22].

Існують також достатні докази, що цитозольний Ca^{2+} може підвищувати активність $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмінника у прямому режимі [17, 21]. Цей ефект цитозольного Ca^{2+} можна сплутати з активацією $Na^+ - Ca^{2+}$ -обміну внаслідок зміщення термодинамічної рівноваги між електрохімічними градієнтами Na^+ і Ca^{2+} , оскільки $\Delta \mu_{Ca}$ внаслідок зростання $[Ca^{2+}]_i$ зменшується. Відокремити ці два ефекти експериментально досить важко, як і точно встановити рівень цитозольного Ca^{2+} , необхідного для каталітичної активації обмінника у прямому режимі [12].

Зростання $[Ca^{2+}]_e$ спричинює збільшення $\Delta \mu_{Ca}$. Тому отримана нами залежність між амплітудою вхідного струму $Na^+ - Ca^{2+}$ -обміну через плазматичну мембрану

секреторних клітин і $[Ca^{2+}]_e$ переконливо свідчить про здатність цитозольного Ca^{2+} каталітично активувати функціонування обмінника у прямому режимі.

З'ясувалося також, що при еквімолярній заміні катіонів Ca^{2+} у позаклітинному середовищі на катіони Sr^{2+} і Ba^{2+} у відповідь на раптову гіперполяризацію мембрани реєструється вхідний струм, за кінетикою досить близький до вхідного струму Na^+-Ca^{2+} -обміну. Тому ми припустили, що катіони Sr^{2+} і Ba^{2+} можуть транспортуватися Na^+-Ca^{2+} -обмінником секреторних клітин і, відповідно, ці струми відображають Na^+-Sr^{2+} - чи Na^+-Ba^{2+} -обмін через плазматичну мембрану.

Відомо, що Na^+-Ca^{2+} -обмінник збудливих клітин може транспортувати катіони Sr^{2+} та, меншою мірою, Ba^{2+} , хоча максимальна швидкість транспортування обмінником цих іонів менша, ніж транспортування Ca^{2+} (див. [12]). Крім того, і Sr^{2+} , і Ba^{2+} перешкоджають транспортуванню обмінником Ca^{2+} [24].

Катіони Ba^{2+} можуть замінювати катіони Ca^{2+} як транспортний субстрат Na^+-Ca^{2+} -обмінника кардіоміоцитів, причому Na^+ -залежний вхід Ba^{2+} в клітини підсилюється низькими концентраціями цитозольного Ca^{2+} [13]. А про здатність Ba^{2+} замінювати Ca^{2+} у каталітичній активації обмінника даних немає.

Нами встановлено, що залежність амплітуди струму Na^+-Sr^{2+} -обміну від $[Sr^{2+}]_e$, як і залежність амплітуди струму Na^+-Ca^{2+} -обміну від $[Ca^{2+}]_e$, задовільно описується рівнянням Хілла, але коефіцієнт n у цьому випадку є суттєво менший. Параметри рівняння Хілла залежності амплітуди струму Na^+-Ba^{2+} -обміну від $[Ba^{2+}]_e$, зокрема, коефіцієнт n , ще суттєвіше відрізняються. В ході порівняння параметрів рівняння Хілла, розрахованих для залежності амплітуди вхідних струмів Na^+-Me^{2+} -обмінів від $[Me^{2+}]_e$ (див. таблицю), напрошуються досить цікаві висновки. Перш за все, розраховане значення I_{max} зростає в послідовності $Ca^{2+} \rightarrow Sr^{2+} \rightarrow Ba^{2+}$. А значення коефіцієнта n і $K_{0,5}$, навпаки, у названій послідовності суттєво зменшуються. Оскільки здатність до комплексоутворення в названій послідовності теж зменшується [2], то зменшення коефіцієнта n , на нашу думку, зумовлене порушенням процесів каталітичної активації обмінника. Хоча повністю відкидати особливості підтримання концентрацій двовалентних металів у цитозолі (що теж визначається здатністю до комплексоутворення) повністю не можна. Відомо, що внутрішньоклітинні органиели кардіоміоцитів, наприклад, не акумулюють цитозольний Ba^{2+} [13].

Отже, аналізуючи залежність амплітуди вхідного струму Na^+-Me^{2+} -обміну від $[Me^{2+}]_e$, високе значення коефіцієнта Хілла n слід розглядати не як доведення високого ступеня кооперативності транспортованих двовалентних катіонів, а як свідчення алостеричної регуляції обмінника.

Високою здатністю до комплексоутворення характеризуються катіони La^{3+} , які є ефективними блокаторами чи не всіх Ca^{2+} -транспортувальних систем. Але, як було показано для кардіоміоцитів і гладеньком'язових клітин, позаклітинний

Параметри рівняння Хілла залежності амплітуди струмів Na^+-Me^{2+} -обмінів від позаклітинної концентрації відповідного двовалентного катіона

Тип Na^+-Me^{2+} -обміну	Коефіцієнт n	I_{max}	$K_{0,5}$
Na^+-Ca^{2+} -обмін	3,41	0,81	0,75
Na^+-Sr^{2+} -обмін	1,48	0,90	0,27
Na^+-Ba^{2+} -обмін	0,51	2,00	0,20

La^{3+} має відносно низьку афінність до Na^+ - Ca^{2+} -обмінника [19, 23]. Здатність La^{3+} інгібувати Na^+ - Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани збудливих клітин оцінюється $K_{0,5}$, не меншим ніж 0,5 ммоль/л (див. [12]).

Як свідчать отримані нами дані (див. рис. 4), катіони La^{3+} є конкурентні блокатори Na^+ - Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани секреторних клітин, оскільки збільшення $[\text{Ca}^{2+}]$ у середовищі від 1,76 до 10 ммоль/л зміщувало $K_{0,5}$ від 0,28 до 2,40 ммоль/л.

Значення коефіцієнта n цієї залежності свідчить, що La^{3+} не лише витісняє Ca^{2+} з катіонтранспортного сайту обмінника. Цілком можливо, що La^{3+} взаємодіє з Ca^{2+} -зв'язуючою ділянкою регуляторної петлі обмінника. Внаслідок такого зв'язування функціональна активність Na^+ - Ca^{2+} -обмінника повинна була б зрости, але в поєднанні з витісненням Ca^{2+} з катіонтранспортного центру це спричиняє лише низьке (< 1) значення коефіцієнта n рівняння Хілла. Відповідно, за підвищеної $[\text{Ca}^{2+}]_e$ коефіцієнт n є дещо більший, що підтверджує наявність конкуренції La^{3+} з Ca^{2+} за Ca^{2+} -зв'язуючу ділянку регуляторної петлі обмінника.

Отже, використання параметрів рівняння Хілла для аналізу властивостей Na^+ - Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани є не лише цілком оправданим, але й дає змогу отримати нові дані. Дещо важче застосувати рівняння Хілла для дослідження складніших процесів, якими є лігандіндуковані зміни вмісту Ca^{2+} у тканині залоз. Це досить-таки гетерогенна система, оскільки зміни вмісту Ca^{2+} визначаються функціональною активністю практично всіх Ca^{2+} -транспортних систем плазматичної мембрани та внутрішньоклітинних органел. Навіть тоді, коли аналізуються зміни, спричинені специфічним агоністом чи антагоністом певної Ca^{2+} -транспортної системи, – порушення функціонування однієї системи неминуче призводить до зміни функціонування іншої.

Використовувати рівняння Хілла, на нашу думку, для дослідження такої гетерогенної системи можна, абстрагувавшись від властивостей конкретних Ca^{2+} -транспортних систем. У цьому випадку коефіцієнт Хілла за наявності позитивної кооперативності фактично відображає нижню границю кількості усіх Ca^{2+} -транспортних систем, задіяних у відповідних лігандіндукованих *односпрямованих* змінах вмісту Ca^{2+} (тобто тих процесів, які приводять до збільшення чи зменшення вмісту Ca^{2+}). Менше від одиниці значення коефіцієнта Хілла є наслідком, мабуть, антагоністично спрямованих змін у функціонуванні різних односпрямованих Ca^{2+} -транспортних систем або наслідком односпрямованих змін різноспрямованих Ca^{2+} -транспортних систем. У всіх випадках, за умови, що чутливість Ca^{2+} -транспортних систем до ліганду лежить в одному і тому ж самому діапазоні концентрацій.

Покажемо у цьому випадку вплив еозину Y на вміст Ca^{2+} у тканині залоз (див. рис. 2). Еозин Y – тетрабромфлуоресцеїн – є блокатором Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани еритроцитів [15, 16] та ендоплазматичного ретикулу клітин міометрію [7] і практично не впливає на функціонування інших іонтранспортних систем [10].

Функціонування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулу протилежно спрямоване – пригнічення першої супроводжується збільшенням вмісту Ca^{2+} у клітинах, а пригнічення другої – зменшенням здатності клітин акумулювати Ca^{2+} . Висхідна частина залежності вмісту Ca^{2+} у тканині від концентрації цього блокатора у середовищі задовільно описується рівнянням Хілла. Коефіцієнт Хілла дорівнює одиниці, що переконливо свідчить про вплив еозину Y у цьому діапазоні концентрацій лише на Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани.

Високе значення коефіцієнта Хілла залежності змін вмісту Ca^{2+} у тканині залоз, спричинених гіпонатрієвим середовищем, від $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (див. рис. 3) аж ніяк не можна розцінювати як доведення здатності Na^+ - Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани транспортувати 2 катіони Ca^{2+} у клітину взамін виведення кількох (скільки?) катіонів Na^+ . Швидше за все, зміни вмісту Ca^{2+} у тканині залоз у цій серії дослідів спричинені не лише функціонуванням обмінника у зворотному режимі, а й зміною функціональної активності Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Збільшення позаклітинного Ca^{2+} має, теоретично, зменшувати швидкість транспортування Ca^{2+} помпою і навпаки. Це пов'язано не з афінністю Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани до цитозольного Ca^{2+} , яка є набагато вищою за афінність Na^+ - Ca^{2+} -обмінника [12], а лише з термодинамічним зміщенням. Саме тому це відобразилося на параметрах рівняння Хілла досліджуваної залежності.

Зовсім інше спостерігається за дії La^{3+} на K^+ -стимульоване збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залози – коефіцієнт Хілла менший одиниці (див. рис. 5). Це свідчить про те, що катіони La^{3+} діють не на одну, а, принаймні, на дві різноспрямовані Ca^{2+} -транспортувальні системи. Оскільки $K_{0,5}$ інгібування K^+ -стимульованих змін вмісту Ca^{2+} у тканині залоз суттєво менша, ніж $K_{0,5}$ інгібування струму Na^+ - Ca^{2+} -обміну (див. рис. 4), то, найімовірніше, катіони La^{3+} пригнічують і потенціалокеровані Ca^{2+} -канали, і Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани. Відомо, що Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани міоцитів артерій катіони La^{3+} у концентрації 0,01 ммоль/л блокують на 50 % [23]. Внаслідок пригнічення потенціалокерованих Ca^{2+} -каналів вміст Ca^{2+} у тканині залоз зменшується, а внаслідок пригнічення Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, навпаки, – зростає.

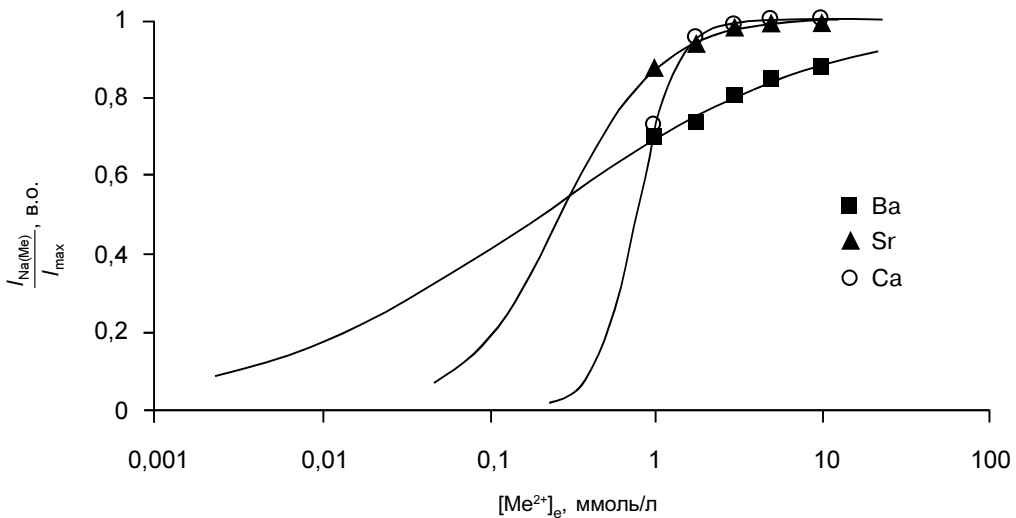


Рис. 6. Порівняння кривих Хілла для залежності амплітуд струмів Na^+ - Ca^{2+} -, Na^+ - Sr^{2+} -, Na^+ - Ba^{2+} -обміну від $[\text{Ca}^{2+}]_e$, $[\text{Sr}^{2+}]_e$ і $[\text{Ba}^{2+}]_e$ відповідно

Переваги і обмеження

Застосування рівняння Хілла для встановлення кінетики Ca^{2+} -транспортувальних систем має ряд переваг і недоліків.

Основною перевагою використання рівняння Хілла є те, що аналіз його параметрів ($K_{0,5}$, n , деколи T) досить часто дозволяє виявити нові властивості системи і тим самим полегшити інтерпретацію отриманих даних. Навіть у випадку, коли система є гетерогенною. Тим не менше, отримані параметри не слід

розглядати як абсолютне свідчення наявності у системи певної властивості. Досить часто певне значення, наприклад, коефіцієнта n є наслідком: а) кооперативних (позитивних чи негативних) взаємодій між лігандами або відсутністю їх (див. рис. 2); б) алостеричної регуляції системи, тобто наявності двох різних центрів зв'язування лігандів, які виконують різні функції (див. рис. 1, 4, 6); в) гетерогенності системи (див. рис. 3, 5), навіть тоді, коли внаслідок взаємодії з іншими лігандами система поводить себе як гомогенна. Тому правильно інтерпретувати параметри рівняння Хілла, спираючись на результати лише однієї (описаної цим рівнянням) серії дослідів, не можна.

Порівняно з традиційним методом використання модифікованих координат Іді-Хофсті для розрахунку параметрів рівняння Хілла має свої переваги:

а) зменшується похибка розрахунку, оскільки залежна величина V (і тим самим похибка вимірювання) відкладається на обох осях;

б) з'являється можливість застосувати модифіковані координати для точок, які лежать поза середньою частиною графіка Хілла (див. рис. 1), зокрема, для максимально наближених до T (за $V = T$ використовувати рівняння (10) зі зрозумілих причин не можна);

в) графік у координатах Іді-Хофсті перетинає обидві осі в області позитивних значень, а це полегшує ітераційну апроксимацію даних;

г) якщо дія ліганду має виражений двофазний ефект (див. рис. 2), то зручніше проводити ітерацію коефіцієнта Хілла, а не T .

Розрахований таким чином коефіцієнт Хілла є усереднений. Але у більшості випадків неможливо і немає потреби точно встановлювати максимальне значення n , оскільки у реальному фізіологічному експерименті похибка вимірювання є досить значною.

1. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Е. **Курс варіаційної статистики**. Київ: Вища школа, 1977. 206 с.
2. Досон Р., Елліот Д., Елліот У., Джонс К. **Справочник біохіміка**. Пер. с англ. Москва: Мир, 1991. 544 с.
3. Келети Т. **Основи ферментативної кінетики**. Пер. с англ. Москва: Мир, 1990. 350 с.
4. Клевець М.Ю., Король Т.В., Манько В.В., Федірко Н.В. **Докази надходження кальцію у клітини слинної залози личинки хірономуса під впливом гіперкалієвої деполяризації мембрани** (Львів. ун-т). Львів, 1997. 20 с. Укр. Деп. в Укр. ІНТЕІ 8.09.97, № 524–Уі 97.
5. Клевець М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В. Струм $\text{Na}-\text{Ca}$ -обміну мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. **Фізіологічний журнал**, 1998; 44 (3): 160–161.
6. Король Т., Манько В., Клевець М. Вплив блокаторів потенціалозалежних кальцієвих каналів на стимульований гіперкалієвою деполяризацією вхід Ca^{2+} у клітини екзокринних залоз та їх секреторну відповідь. **Галицький лікарський вісник**, 1998; 5 (3): 46–48.
7. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г. и др. Влияние ингибиторов энергo-зависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. **Укр. біохім. журнал**, 1996; 68 (6): 50–61.
8. 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.

9. 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. журнал**, 2000; 72 (2): 36–41.
10. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А. и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg^{2+} , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток. **Биохимия**, 1998; 63 (6): 812–819.
11. *Abeliovich H.* An empirical extremum principle for the Hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity. **Biophys J**, 2005; 89 (1): 76–79.
12. *Blaustein M.P., Lederer W.J.* Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiol. Rev**, 1999; 79 (3): 763–854.
13. *Condrescu M., Chernaya G., Kalaria V., Reeves J.P.* Barium influx mediated by the cardiac sodium-calcium exchanger in transfected chinese hamster ovary Cells. **J. Gen. Physiol**, 1997; 109 (1): 41–51.
14. *Fedirko N., Klevets M., Manko V.* Dependence of Na–Ca-exchange current amplitude of secretory cells membrane on extracellular Ca^{2+} concentration. **Europ. Biophys. J. with Biophys. Letters**, 1997; 26 (1): 79 (5–30).
15. *Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A.* Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. **Biochemistry**, 1995; 34 (3): 965–972.
16. *Gatto C., Milanick M.A.* Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. **Am. J. Physiol**, 1993; 264: 1577–1586.
17. *Hilgemann D.W., Collins A., Matsuoka S.* Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. **J. Gen. Physiol**, 1992; 100: 933–961.
18. *Hill A.V.* The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its oxygen dissociation curve. **J. Physiol**, 1910; 40: 4–7.
19. *Katzung B.G., Reuter H., Porzig H.* Lanthanum inhibits Ca inward current but not Na-Ca exchange in cardiac muscle. **Experientia**, 1973; 29: 1073–1075.
20. *Levitsky D.O., Nicoll D.A., Philipson K.D.* Identification of the high affinity Ca^{2+} -binding domain of the cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchanger. **J. Biol. Chem**, 1994; 269: 22847–22852.
21. *Miura Y., Kimura J.* Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. **J. Gen. Physiol**, 1989; 93: 1129–1145.
22. *Reeves J.P., Condrescu M.* Allosteric activation of sodium–calcium exchange activity by calcium persistence at low calcium concentrations. **J. Gen. Physiol**, 2003; 122 (5): 621–639.
23. *Shimizu H., Borin M.L., Blaustein M.P.* Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from Na^+ / Ca^{2+} exchange in arterial myocytes. **Cell. Calcium**, 1997; 21 (1): 31–41.
24. *Trosper T.L., Philipson K.D.* Effects of divalent and trivalent cations on Na^+ - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, 1983; 731: 63–68.
25. *Weber G., Anderson S.J.* Multiplicity of binding. Range and practical test of Adair's equation. **Biochemistry**, 1965; 10: 1942–1947.
26. *Wyman J.J.* Linked functions and reciprocal effects in haemoglobin: a second look. **Adv. Protein Chem**, 1964; 19: 223–286.
27. *Yifrach O.* Hill coefficient for estimating the magnitude of cooperativity in gating transitions of voltage-dependent ion channels. **Biophys. J**, 2004; 87: 822–830.

Одержано: 15.03.2007