

УДК 612.014.42:612.31:591.413.2

Король Т.В., кандидат біологічних наук ©*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького***МЕМБРАННІ СИСТЕМИ ТРАНСПОРТУ КАТІОНІВ Ca^{2+} У СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИНАХ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ ЛИЧИНКИ *CHIRONOMUS PLUMOSUS* L**

У роботі проведено дослідження систем активного і пасивного трансмембранного транспорту Ca^{2+} в екзокринних секреторних клітинах слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. Запропоновано схему Ca^{2+} -сигналізації секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна. Отримані результати можуть бути використані для розробки фармакологічних методів корекції секреції травних залоз людини і тварин.

Ключові слова: потенціалокеровані Ca^{2+} - канали, Na^{+} - Ca^{2+} -обмінник, Ca^{2+} , Mg^{2+} - АТФаза, ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, ІФз-чутливі Ca^{2+} -канали, Ca^{2+} - уніпортер.

Вступ. Система внутрішньоклітинного передавання сигналів за участю катіонів Ca^{2+} відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах різних типів клітин, у тому числі і секреторних [7,8,9,11,12,13]. Якщо у нейронах, гладком'язових клітинах та кардіоміоцитах [7,8,9] систему кальцієвої регуляції клітинних процесів досліджували тривалий час, то секреторні клітини у цьому відношенні вивчені значно менше. Оскільки на сьогодні вірогідно доведена роль Ca^{2+} , як вторинного посередника, у регуляції секреторного процесу в цілому та екзоцитозу зокрема, то особливої уваги заслуговує з'ясування основних закономірностей функціонування Ca^{2+} - транспортувальних систем секреторних клітин, що має фундаментальне значення для розуміння механізмів активації секреції та її припинення. У свою чергу, це дозволяє розв'язати питання, пов'язані з виникненням і розвитком патологій травних залоз людини і тварин через порушення Ca^{2+} -гомеостазу, а також розробити методи їх фармакологічної корекції, що має значення для медицини і ветеринарії. На сьогодні ґрунтовно досліджено Ca^{2+} -транспортувальні системи у секреторних клітинах багатоклітинних залоз ссавців, таких як великі слинні [11] та підшлункова [13]. Цікавим та зручним об'єктом для дослідження їх функціонування є малоклітинні залози, зокрема слинні залози двокрилих.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на ізольованих слинних залозах (32-48 клітин) личинки комара-дергуна (*Chironomus plumosus* L.). Про функціональний стан Ca^{2+} - транспортувальних систем клітин досліджуваних залоз судили на підставі аналізу змін рівня секреції загального білка *in vitro* у середовищах з різним іонним складом та під впливом блокаторів цих систем, сумарного та мембранозв'язного вмісту Ca^{2+} у тканині та АТФазної активності

тканини залоз за приростом P_n у середовищі інкубації. Цифрові результати усіх вимірювань піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом. Опрацювання результатів здійснювали з використанням програмного пакету Microsoft Excel.

Результати дослідження. Ключовою подією у спряженні процесів стимулу із секрецією є короточасне підвищення рівня іонізованого Ca^{2+} у цитоплазмі клітин, яке насамперед досягається його надходженням ззовні через потенціалокеровані Ca^{2+} - канали плазматичної мембрани (ПМ). Ці канали ідентифіковано методом фіксації потенціалу в умовах внутрішньоклітинної перфузії [2], а також функціонально підтверджено їх наявність шляхом вимірювання змін вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз личинки комара-дергуна з використанням арсеназо III та рівня секреції загального білка за умов гіперкалієвої деполяризації мембрани [4]. Додавання до гіперкалієвого середовища ($[K^+]_z = 40$ ммоль/л) верапамілу (0,1 ммоль/л), дилтіазему (0,1 ммоль/л), ніфедипіну (0,1 ммоль/л) та $LaCl_3$ (0,1 ммоль/л) у всіх випадках супроводжувалося пригніченням стимульованого входу Ca^{2+} у клітини відповідно на 58,82% ($P < 0,01, n = 6$), 63,50% ($P < 0,05, n = 6$), 62,02% ($P < 0,05, n = 6$) та 39,85% відносно контролю. Щодо секреції загального білка, то за умов додавання верапамілу практично не спостерігалось її стимуляції деполяризацією мембрани 40 ммоль/л KCl. За наявності дилтіазему нами виявлено зменшення рівня секреції загального білка на 66,14 % ($P < 0,05, n = 6$), ніфедипіну – на 34,45% та $LaCl_3$ – на 36,27% порівняно з контролем. Ці дані узгоджуються з результатами вимірювання змін вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} за допомогою хлортетрацикліну (ХТЦ) у секреторних клітинах досліджуваних залоз під впливом згаданих блокаторів потенціалокерованих Ca^{2+} - каналів на фоні гіперкалієвої деполяризації мембрани [10]. Зростання внутрішньоклітинного вмісту іонізованого Ca^{2+} вище базального рівня, зумовлене його пасивним надходженням через потенціалокеровані Ca^{2+} -канали, необхідне для ініціації вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу (ЕПР), яке в секреторних клітинах досліджуваних залоз проходить, зокрема, за механізмом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} через ріанодин (кофеїн) чутливі Ca^{2+} -канали мембрани ЕПР [15]. Як з'ясувалося, ці канали перебувають у тісній взаємодії з ІФз-чутливими Ca^{2+} - каналами. У мітохондріях (МХ) досліджуваних секреторних клітин ідентифіковано Ca^{2+} -уніпортер [1]. Відновлення концентрації Ca^{2+} у клітинах забезпечується системами його енергозалежного транспорту, локалізованими у ПМ та мембрані ЕПР. У ПМ функціонують Ca^{2+} -помпа та система Na^+ - Ca^{2+} -обміну. Клітинні мембрани слинних залоз личинки комара-дергуна характеризуються Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазною, а також Mg^{2+} -АТФазною та строфантинчутливою Na^+ , K^+ -АТФазною активностями [6]. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність тканини слинних залоз залежить від концентрації Ca^{2+} та АТФ у середовищі інкубації, повністю блокується ($P < 0,01, n = 6$) еозином Y (10 мкмоль/л), а також суттєво пригнічується окситоцином у концентрації 100 мкмоль/л (на $65,74 \pm 13,50, P < 0,001$) і бутилгідроксисініном у концентрації 25 мкмоль/л (на $68,62 \pm 2,96\%, P < 0,001$). Наявність Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, локалізованого у ПМ цих клітин, доведена з використанням

електрофізіологічних методів на основі збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і секреції загального білка у гіпонатрієвих середовищах [3], та за умови його активації у прямому режимі гіпернатрієвими розчинами $[\text{Na}^+]$ з 180 ммоль/л. Отже, первинно-активне виведення Ca^{2+} із цитозолу секреторних клітин здійснюється Ca^{2+} -помпою ПМ і мембрани ЕПР. Крім того, у ПМ досліджуваних клітин наявна система вторинно-активного виведення Ca^{2+} у позаклітинне середовище - Na^+ - Ca^{2+} -обмінник. Значення процесу відновлення внутрішньоклітинного рівня іонізованого Ca^{2+} до вихідної величини полягає у попередженні можливості інгібування секреції загального білка його високою цитоплазматичною концентрацією та створює передумови для повторного запуску секреції.

Висновки. Отже, на прикладі слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. одержано функціональне підтвердження наявності у ПМ секреторних клітин потенціалокерованих Ca^{2+} -каналів, Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, Ca^{2+} -помпи, а також Ca^{2+} -уніпортера МХ та ріанодин і іФз – чутливих каналів вивільнення Ca^{2+} з депо та проведено дослідження їх властивостей у зв'язку з участю цих систем у регуляції секреторного процесу.

Література

1. Бичкова С.В. Регуляція внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортивальних систем малоклітинних травних залоз: Автореф. дис. ... канд.біол.наук : 03.0013/ЛНУ імені Івана Франка. – Л.: 2004. – 20 с.
2. Клевец М.Ю., Гураль З.В. Идентификация активируемого деполяризації кальцієвого тока мембрани секреторных клеток // Физиол. Журн.-1990.-Т. 36, № 2. – С. 102-104.
3. Клевец М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В. Дослідження нагромадження Ca^{2+} секреторними клітинами ізольованих слинних залоз личинки хірономуса та його значення для секреторного процесу / Львів. Ун-т.-Львів, 1996. – 22 с. – Деп. В Укр. ІНЕТІ 29.10.96, № 87. – Ук 96.
4. Король Т.В., Манько В.В., Клевец М.Ю. Вплив блокаторів потенціалозалежних кальцієвих каналів на стимульований гіперкалієвою деполяризацією вхід Ca^{2+} у клітини екзокринних залоз та їх секреторну відповідь // Галицький лікарський вісник. - 1998. - Т. 5, № 3. - С. 46-48.
5. Король Т.В., Манько В.В., Клевец М.Ю. Вплив кофеїну на Ca^{2+} транспортні системи секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.-1999.-Т.8, № 4.-С. 49-53.
6. Король Т.В., Манько В.В., Клевец М.Ю. Дослідження активного транспорту Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. // Біологія тварин. -2000. -Т2, № 1. - С. 92-97.
7. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наукова думка, 1990. - 213с.
8. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость.- М.: Наука, 1986. - 254 с.

9. Максимов Г.В., Орлов С.Н. Транспорт потоков кальция при функционировании нервного волокна: механизмы и регуляция. - М. : Изд-во Московского ун-та. - 1994. - 87с.

10. Манько В.В., Король Т.В., Клевець М.Ю., Демків О.Т. Дослідження Ca^{2+} -транспортних систем секреторних клітин екзокринних залоз з використанням хлортетрацикліну // Вісник Харк. ун-ту, № 488. Біофізичний вісник. - 2000. - Вип. 6(1). - С. 79-81.

11. Ambudkar I.S. Regulation of calcium in salivary gland secretion // Critical reviews in oral biology & medicine. - 2000. - Vol. 11. - P. 4-25.

12. Park M.K., Ashby M.C., Erdemir G. et al. Perinuclear, perigranular and subplasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport // EMBO J. - 2001 ac. - Vol. 20. N 8. - P. 1863 - 1874.

13. Petersen O.H. The functional organization of calcium signaling in exocrine acinar cells // J. Korean. Med. Sci. - 2000. - Vol. 15 S. 44, S. 45.

Summary

Korol T.V.

MEMBRANE Ca^{2+} CATIONS TRANSPORTING SYSTEMS IN *CHIRONOMUS PLUMOSUS* L. LARVAE'S SALIVARY GLAND SECRETORY CELLS

These was done a research of active and passive transmembrane transport systems in exocrine secretory cells of Chironomus plumosus L. larvae's salivary gland. The scheme of Chironomus plumosus L. larvae's salivary glands secretory cells Ca^{2+} -signalling has been proposed. The received results may be used for working out pharmaceutical corrective methods of man and animal's digestive glands secretion.

Key word: voltage-operated Ca^{2+} channels, Na^+ - Ca^{2+} exchanger, Ca^{2+} , Mg^{2+} ATPase, RyRs, $InsP_3R_s$, Ca^{2+} - uniporter.

Стаття надійшла до редакції 26.03.2010