

Н. В. Федірко, М. Ю. Клевець

Вплив еозину Y та ортованадату на базальну секрецію та стаціонарний вхід Ca^{2+} у секреторні клітини екзокринних залоз

*Установлено, що блокатори кальцієвого насоса в низьких концентраціях (еозин Y до 5 мкмоль/л і ортованадат до 40 мкмоль/л) викликають збільшення вмісту Ca^{2+} в ткани слюнных желез личинки *Chironomus plumosus* L. і рівня базальної секреції їх клітками загального білка. Еозин Y більш ефективно, ніж ортованадат угнетає активність кальцієвого насоса плазматическої мембрани. Додавання даних препаратів в інкубаційну среду в більш високих концентраціях супроводжується зменшенням секреції загального білка і вмісту Ca^{2+} в ткани желез. Обумовлено це, очевидно, блокуванням кальцієвого насоса мембрани ендоплазматического ретикулума, зменшенням трансмембранного кальцієвого градієнта і угнетенням входу Ca^{2+} в клітки. Таким образом, системи енергозависимого транспорта Ca^{2+} ефективно компенсують стаціонарний вхід Ca^{2+} в клітки слюнных желез, благодаря чому підтримується гомеостаз Ca^{2+} і низький базальний рівень секреції.*

Вступ

Катіони кальцію — універсальні внутрішньоклітинні месенджери, які забезпечують передачу сигналів від плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних систем. Унаслідок цього Ca^{2+} відіграє роль чи не найпотужнішого активатора або модулятора більшості клітинних функцій збудливих і незбудливих клітин [12].

Основною дією клітин екзокринних травних залоз є секреція ферментів. Секреція травних ферментів — кальційзалежний процес і її рівень визначається концентрацією Ca^{2+} у цитозолі оскільки, як відомо, вплив секретогогів, нейротрансмітерів і гормонів на плазматичну мембрану секреторних клітин індукує кальцієві сигнали [13, 16]. Підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі відбувається, в основному, у результаті його надходження до клітин із міжклітинного середовища через різні кальцієві канали, Na—Ca-обмін (реверсний режим функціонування), а також за допомогою вивільнення кальцію із ендоплазматичного ретикулума. Зниження концентрації цитозольного Ca^{2+} після періоду секреторної активності забезпечують системи його депонування у ретикулумі, кальцієва помпа та Na—Ca-обмінник плазматичної мембрани.

Поряд з функціонуванням різноманітних кальційтранспортних систем, які відіграють роль у клітинній активності, в останні роки стало відомо про наявність постійного дифузійного потоку кальцію (10^{-15} — 10^{-14} моль/см²·с), який входить у клітини при мембранному потенціалі спокою та відсутності електричних і хімічних стимулів [3]. Стаціонарний вхід Ca^{2+} виявлено у

гладеньком'язових клітинах [3, 7, 17] та мембрані дендритів нейронів центральної нервової системи ссавців [1]. Наявність стаціонарного входу Ca^{2+} виявлена нами і у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. [5]. Встановлено, що постійний дифузійний вхід Ca^{2+} забезпечується популяцією низькопорогових відкритих при мембранному потенціалі спокою кальцієвих каналів, чутливих до блокаторів потенціалзалежної кальцієвої провідності плазматичної мембрани. Фізіологічне значення стаціонарного входу Ca^{2+} полягає у підтриманні базальної секреторної активності.

Проте тривалий безперервний стаціонарний вхід Ca^{2+} у цитоплазму клітин призвів би, кінець-кінцем до значного підвищення вмісту $[\text{Ca}^{2+}]_b$. Очевидно, що за нормальних умов функціонування клітин цього не відбувається внаслідок дії двох основних трансмембранних кальційтранспортних систем: кальцієвої помпи та $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінника. Зокрема, встановлено, що при блокуванні кальцієвої помпи сарколеми гладеньком'язових клітин міометрія ортованадатом [6], окситоцином, простагландінами та інозитол-1,4,5-трифосфатом [14, 15] некомпенсований базальний потік Ca^{2+} викликає підвищення вмісту $[\text{Ca}^{2+}]_b$ і, відповідно, підвищення базального тонуусу гладеньких м'язів. У зв'язку з цим метою нашої роботи було з'ясувати роль кальцієвої помпи та $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінника у підтриманні гомеостазу Ca^{2+} у стані спокою в секреторних клітинах і базальної секреторної активності.

Методика

Дослідження проведені *in vitro* на ізольованих слинних залозах личинки *Chironomus plumosus* L. Слинні залози ізолювали за розробленою раніше методикою [2] у стандартному зовнішньоклітинному розчині за допомогою мікрохірургічних інструментів без використання будь-яких фармакологічних агентів. Еозин Y та ортованадат у різних концентраціях додавали до стандартного та гіпонатрієвого середовищ інкубації залоз для дослідження ролі кальцієвої помпи і $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінника у компенсації стаціонарного входу Ca^{2+} у секреторні клітини. Стандартний зовнішньоклітинний розчин для інкубації залоз містив (моль/л): $\text{NaCl} - 136,9$, $\text{KCl} - 5,36$, $\text{CaCl}_2 - 1,76$, $\text{MgCl}_2 - 0,49$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 0,35$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,44$, глюкозу $- 5,55$, $\text{pH} 7,2$. У гіпонатрієвому середовищі інкубації вміст Na^+ становив 35 ммоль/л (еквімолярна заміна tris-Cl). Для вивчення базальної секреції білка та вмісту Ca^{2+} у залозах їх інкубували у відповідних розчинах протягом 30 хв при 25°C і легкому струшуванні. Після інкубації залози центрифугували протягом 5 хв при 1600 г. Супернатант зливали для визначення концентрації білка як інтегрального показника секреції. Секрецію виражали у відсотках від сумарного вмісту білка після віднімання значення такого ж показника у вихідному стані, тобто без інкубації. Залози гомогенізували, гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 1600 г. Вміст Ca^{2+} у гомогенаті слинних залоз визначали з використанням арсеназо III і виражали в наномолях у перерахунку на 1 залозу. Вміст білка у гомогенаті залоз та інкубаті визначали за методом Лоурі [9]. Результати досліджень обробляли статистично з використанням програми *Excel*.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що додавання до стандартного середовища інкубації слинних залоз еозину Y, як специфічного блокатора кальцієвої помпи, викликало істотні зміни стаціонарного вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і базальної секреції загального білка (рис. 1, $n = 11$). У найнижчій концентрації еозин Y (0,5 мкмоль/л) спричиняв незначне збільшення вмісту кальцію у тканині залоз і деяке підвищення базальної секреторної активності у середньому на 11,1 %, проте ці зміни не сягали першого рівня достовірності. Еозин Y у концентраціях 1, 2,5, 5 мкмоль/л викликав істотне та статистично достовірне збільшення рівня стаціонарної акумуляції клітинами залоз Ca^{2+} у середньому на 41,28, 46,67, 107,56 % відповідно. Хоч при концентрації 10 мкмоль/л стаціонарна акумуляція підвищувалась, але при подальшому збільшенні концентрації блокатора вміст Ca^{2+} у залозах зменшувався до значень нижчих від контрольних: при 15 мкмоль/л – у середньому на 5,00 %, при 20 мкмоль/л – 50,89 % відповідно (див. рис. 1).

Зміни базальної секреторної активності в цілому корелювали зі змінами вмісту у них катіонів Ca^{2+} (див. рис. 1). Зокрема, підвищення концентрації еозину Y до 1, 2,5 і 5 мкмоль/л викликало поступове збільшення вмісту білка в інкубаційному розчині (в середньому на 12,4, 15,36, 14,76 % відповідно). При наявності 10 мкмоль/л блокатора концентрація білка значно зменшувалася й перевищувала контроль у середньому лише на 7,85 %, подальше ж підвищення концентрації еозину Y до 15 і 20 мкмоль/л зменшувало базальну секрецію до значень нижчих від контрольного рівня у середньому на 15,32 та 29,49 % відповідно.

Збільшення стаціонарного вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз і секреторної активності, максимуми яких збігаються, внаслідок дії еозину Y у концентрації до 5 мкмоль/л можна пояснити блокуванням кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Здатність негативно зарядженого флуоресцентного індикатора еозину Y специфічно блокувати Mg^{2+} -АТФ-залежну кальцієву помпу плазматичної мембрани (не впливаючи на $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінник, локалізований у тій же субклітинній структурі) нещодавно вперше була експериментально підтверджена для гладеньком'язових клітин [4] і кардіоміоцитів [8].

Для перевірки специфічності дії еозину Y саме на кальцієву помпу мембрани досліджуваних клітин ми додавали блокатор до гіпонатрієвого інкубаційного розчину (стимулюючи вхід Ca^{2+} до клітини за рахунок реверсного режиму функціонування $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінника). З'ясувалося, що за цих умов

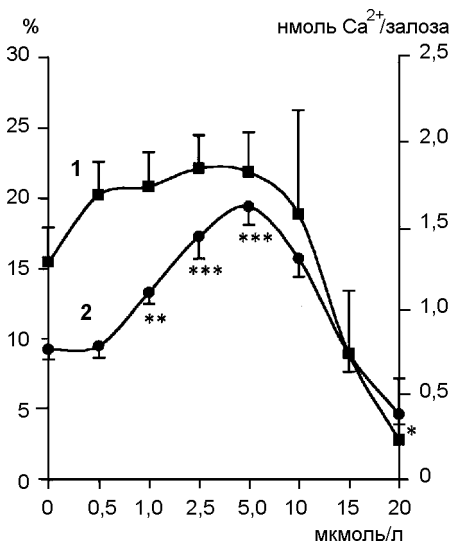


Рис. 1. Залежність базальної секреції загального білка (1) та стаціонарного вмісту Ca^{2+} у тканині залози (2) від концентрації еозину Y.

Рис. 2. Вплив еозину Y на стимульовану гіпонатрієвим середовищем секрецію загального білка (1) та вміст Ca^{2+} у тканині залози (2).

еозин Y у концентрації 0,5 і 1 мкмоль/л викликав збільшення стимульованої гіпонатрієвим середовищем акумуляції Ca^{2+} клітинами залоз у середньому на 13,8 та 33,44 % та незначне підвищення секреції на 3,79 та 2,57 % відповідно (рис. 2, $n = 6$), а підвищення концентрації блокатора до 2,5 та 5 мкмоль/л уже не викликало подальшого збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і секреторна активність їх клітин була в середньому на 4,5 та 5,29 % нижчою за її значення у контролі (гіпонатрієве середовище інкубації без блокатора). Оскільки за цих умов відбувається не зменшення (яке спостерігалось би внаслідок блокування входу Ca^{2+} через $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмін), а збільшення вмісту Ca^{2+} у залозах, то це переконливо доводить ефективність блокування еозином Y функціонування саме кальцієвої помпи плазматичної мембрани досліджуваних клітин.

У наступній серії досліджень як блокатор кальцієвої помпи використовували ортованадат. Згідно з даними літератури, він пригнічує кальцієву помпу та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу гладеньком'язових клітин [10, 11]. Проте ортованадат не характеризується високою специфічністю дії і може впливати й на інші трансмембранні системи плазматичної мембрани, зокрема на $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмінник [11]. Ортованадат у концентрації 1 ммоль/л практично повністю пригнічує АТФ-залежний транспорт Ca^{2+} у фракції везикул плазматичної мембрани міомерія [6], тоді як константа інгібування еозином Y Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази солюбілізованої із сарколеми гладеньком'язових клітин міомерія становить 0,8 мкмоль/л.

Слід зазначити, що додавання до стандартного середовища інкубації залоз ортованадату у концентрації 10, 20 і 40 мкмоль/л супроводжувалося збільшенням вмісту Ca^{2+} у тканині залоз у середньому на 42,06, 65,67 і 78,96% відповідно, а при дії 60 і 80 мкмоль/л блокатора — вміст Ca^{2+} зменшувався і перевищував контрольне значення в середньому на 41,79 та 24,75 % відповідно (рис. 3, $n = 9$). Базальна секреція білка істотно збільшувалася (у

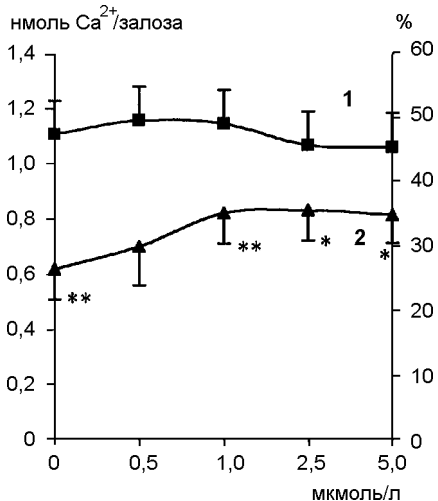
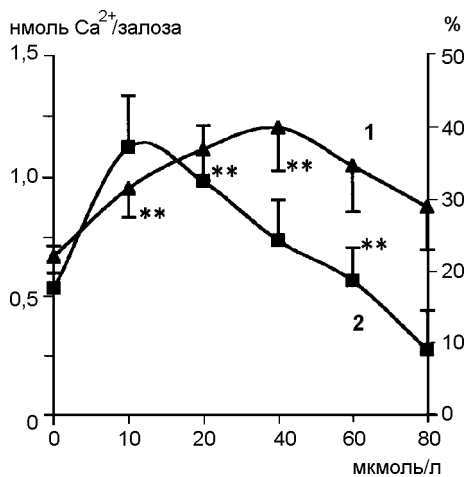


Рис. 3. Зміни стаціонарного вмісту Ca^{2+} у тканині залози (1) та базальної секреції загального білка (2) під впливом ортованадату.



середньому на 50,21 %), уже при наявності 10 мкмоль/л ортованадату а потім внаслідок дії блокатора у концентраціях 20, 40, 60 мкмоль/л поступово це збільшення ставало значно менш вираженим і становило у середньому на 38,31, 16,84 та 2,22 % відповідно, а при 80 мкмоль/л ортованадату секреція клітинами білка була меншою за контрольний рівень на 22,99 % (див. рис. 3). Результати досліджень свідчать, що ортованадат викликав максимальне збільшення вмісту Ca^{2+} у залозах внаслідок, очевидно, блокування кальцієвої помпи плазматичної мембрани у концентрації 40 мкмоль/л (див. рис. 3), тоді як еозин Y — 5 мкмоль/л (див. рис. 1). Отже, на основі даних літератури та результатів власних досліджень можна стверджувати, що ортованадат менш ефективно, ніж еозин Y пригнічує АТФ-залежний транспорт Ca^{2+} через плазматичну мембрану секреторних клітин і не виключена можливість його впливу на функціонування $\text{Na} - \text{Ca}$ -обміну. Крім того, з'ясувалося, що еозин Y і ортованадат у високих концентраціях викликають істотне зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і секреції загального білка. Зумовлено це, мабуть, блокуванням кальцієвої помпи і мембрани ендоплазматичного ретикулума, зменшенням трансмембранного кальцієвого градієнта внаслідок високого вмісту Ca^{2+} у цитозолі та кальційзалежним пригніченням трансмембранного входу Ca^{2+} . При наявності блокаторів кальцієвої помпи у низьких концентраціях спостерігалось помітне збільшення секреції, що зумовлено, очевидно, підвищенням (за умов помірної блокування кальцієвої помпи плазматичної мембрани) вмісту іонізованого Ca^{2+} .

Таким чином, узагальнюючи вищесказане можна стверджувати, що стаціонарний вхід Ca^{2+} у секреторні клітини екзокринних залоз компенсується функціонуванням кальцієвих pomp плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулума. Отже, системи енергозалежного транспорту Ca^{2+} , які локалізовані в різних субклітинних структурах досліджуваних секреторних клітин, забезпечують підтримання гомеостазу катіонів Ca^{2+} та низького рівня базальної секреторної активності.

N. V. Fedirko, M. Yu. Klevets

INFLUENCE OF EOZYN Y AND ORTOVANADATE ON THE STEADY-STATE Ca^{2+} ENTRY IN THE SECRETORY CELLS OF EXOCRINE GLANDS AND SPONTANEOUS SECRETION

Ca^{2+} -pump blockers in low concentrations (eozyn Y up to 5 mM and ortovanadate up to 40 mM) essentially increases of Ca^{2+} content in salivary gland of *Chironomus plumosus* larvae's and spontaneous protein secretion. It was shown that eozyn Y much more effectively suppresses of plasma membrane Ca^{2+} -pump then ortovanadate. Eozyn Y and ortovanadate in higher concentrations essentially decrease of Ca^{2+} content in glands and spontaneous protein secretion. The former is evoked by suppression of endoplasm reticulum Ca^{2+} -pump, decreasing of Ca^{2+} influx in cells following by diminishing of Ca^{2+} transmembrane gradient. Therefore, energydependent Ca^{2+} transporting systems of plasma membrane and endoplasm reticulum effectively regulate steady-state Ca^{2+} entry in secretory cells of *Chironomus plumosus* salivary glands and maintain relatively low level of spontaneous secretion.

Ivan Franko National University, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гаращук О.В.* Механізми регуляції кальцієвого гомеостазу в сомі та дендритах нейронів центральної нервової системи ссавців: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 2000. — 55 с.
2. *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. — Деп. в УкрІНТЕІ 29.10.96, № 87. — Ук 96.
3. *Костерин С.А., Курский М.Д., Фомин В.П.* Пассивный транспорт кальция во фракции плазматических мембран клеток миомерия // Биохимия. — 1984. — **49**, № 9. — С. 1407-1417.
4. *Слищченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Черныш И.Г.* Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg^{2+} , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. — 1998. — **63**. — Вып. 6. — С. 812-819.
5. *Федірко Н.В., Клевець М.Ю.* Докази стаціонарного вхлду Ca^{2+} у клітини слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. та його роль у базальній секреції // Фізіол. журн. — 1999. — **45**, № 4. — С. 84-91.
6. *Шинлова О.П., Фомин В.П., Бурдыга Ф.П., Костерин С.А.* Пассивный транспорт Ca^{2+} в суспензии изолированных гладкомышечных клеток и вклад базальной кальциевой проницаемости плазматической мембраны в активацию тонического сокращения // Изв. АН СССР. — 1990. — № 3. — С. 383-390.
7. *Шуба М.Ф.* Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения // Физиол. журн. — 1981. — **27**, № 4. — С. 545.
8. *Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A.* // Biochemistry. — 1995. — **34**. — P. 965-972.
9. *Lowry J.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Randall R.J.* Prdein measurements with the folin phend reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**. — № 1. — P. 265-275.
10. *Michalak M., Famulski K., Carafoli E.* The Ca^{2+} pumping ATPase in skeletal muscle sarcolemma. Calmoduline dependence, regulation by cAMP-dependent phosphorylation and purification // J. Biol. Chem. — 1984. — **259**, № 24. — P. 15540.
11. *Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K.* Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium. — In.: Control of Uterine Contractility. — New York, CRC Press. Boca Raton, 1994. — P. 129-153.
12. *Kostyuk P.G.* Basic mechanisms responsible for calcium signalling in neuronal cells // Нейрофизиология / Neurophysiology. — 1997. — **29**, № 4/5. — С. 247-251.
13. *Pfeiffer F., Stenfeld L., Schmid A., Schulz I.* Control of Ca^{2+} wavv propagation in mouse pancreatic acinar cells // Am. Physiol. J. — Cell Physiol. — 1998. — **274**, №3. — P. C663-C672.
14. *Popescu L.M., Ninescu M.E., Musat S. et al.* Inositol triphosphate and the contraction of vascular smooth muscle cells // Eur. J. Pharmacol. — 1986. — **123**, № 1. — P.167.
15. *Robinson J.D.* Transport ATPases. — In.: Handbook of neurochemistry. — N.Y.: Plenum Press, 1983. — P. 173.
16. *Тepikin A.V., Petersen O.H.* Fuctional orgatization of calcium stores in polarized secretory cells and transcellular calcium transport // Нейрофизиология / Neurophysiology. — 1997. — **29**, № 4/5. — С. 252-255.
17. *Van Breemen C., Cauvin C., Johns A. et al.* Ca^{2+} -regulation of vascular smooth muscle // Fed. Proc. — 1986. — **45**, № 12. — P. 2746.