

С.В. Бичкова, В.В.Манько, М.Ю. Клевець

## Регуляція циклічними нуклеотидами вивільнення $Ca^{2+}$ із внутрішньоклітинних депо у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна

*Исследовали влияние циклических нуклеотидов – цАМФ и цГМФ на содержание  $Ca^{2+}$  в ткани слюнных желез личинки комара *Chironotus plumosus* L. С целью пермеабиллизации клеток железы обрабатывали сапонином (0,1 мг/мл на протяжении 10 мин) с последующей инкубацией в соответствующей среде (30 мин). Содержание  $Ca^{2+}$  в их ткани измеряли с помощью арсената III. Установлено, что уменьшение содержания  $Ca^{2+}$  под действием цАМФ (1 мкмоль/л) не потенцирует инозитолтрифосфат ( $ИФ_3$ ). В концентрации 100 мкмоль/л цАМФ усиливает действие риагодина (500 нмоль/л), которое проявляется в увеличении содержания  $Ca^{2+}$  в ткани желез, обработанных сапонином. Сделано выводы, что цАМФ (100 мкмоль/л) активирует выход  $Ca^{2+}$  риагодинчувствительными каналами и ингибирует неиндуцированное высвобождение  $Ca^{2+}$   $ИФ_3$ -чувствительными кальцевыми каналами. Установлено также, что цГМФ (100 мкмоль/л) ингибирует каналы выхода  $Ca^{2+}$  из депо, но наблюдался этот эффект только в присутствии тапсигаргина в среде инкубации.*

### ВСТУП

Фізіологічний контроль за секреторною активністю у залозистих клітинах забезпечується певним рівнем медіаторів і гормонів, які діють через рецептори на поверхні мембрани, спряжених із системою обміну фосфоінозитидів,  $Ca^{2+}$  і, що особливо цікаво, циклічних нуклеотидів – цАМФ і цГМФ [4]. Вважають, що зміна співвідношення цАМФ/цГМФ може призвести до цілої низки клітинних відповідей, характер яких залежить від тканини, в якій відбувається зміна, вмісту циклічних нуклеотидів і від їхньої концентрації [1]. Дія цих посередників відтворюється у внутрішньоклітинних кальцевих сигналах, які відрізняються залежно від типу агоніста. До генерації такої відповіді залучені не лише механізми, через які  $Ca^{2+}$  входить із позаклітинного середовища, а й внут-

рішньоклітинні канали, якими він вивільнюється із депо.

Канали вивільнення  $Ca^{2+}$  за фізіологічних умов регулюються різними сигнальними шляхами. Так, наприклад, чутливі до інозитолтрифосфату кальцеві канали фосфорилуються цАМФ-залежною протеїнкіназою А [7, 15], протеїнкіназою С [11], кальційкальмодулінзалежною протеїнкіназою II [11], (NO)/цГМФ-залежною протеїнкіназою G [17], а також автофосфорилуються. Такі процеси, як синтез  $ИФ_3$  чи інших внутрішньоклітинних посередників, можливо, також регулюються цАМФ і відповідними протеїнкіназами з метою модуляції кальцевого сигналу [7]. У гепатоцитах фосфорилування  $ИФ_3$ -чутливого кальцевого каналу цГМФ-залежною протеїнкіназою G підсилює  $ИФ_3$ -індуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  [26], тоді як у яйцеклітинах морського їжака фосфорилування

© С.В. Бичкова, В.В.Манько, М.Ю. Клевець

протеїнкіназою G АДФ-рибозилциклази стимулює синтез кальціємобілізуючого месенджера цАДФ-рибози, яка підсилює кальційіндуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  із ріанодинчутливого депо [13, 14].

Дослідженнями на гладеньких м'язах шлунка та кишечника було встановлено, що стимуляція NO і утворення цГМФ за відсутності активності протеїнкінази G і протеїнкінази A може індукувати вивільнення  $Ca^{2+}$  [21, 22]. Згодом автори показали, що цГМФ у цьому випадку стимулює вивільнення  $Ca^{2+}$  із  $IP_3$ -нечутливого депо [23].

На інтактних секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна також було продемонстровано, що донори NO, які, як відомо, активуючи гуанілатциклазу, спричиняють синтез цГМФ, зменшували вміст  $Ca^{2+}$  у тканині залоз і одночасно збільшували секрецію ними загального білка. Автори припускають, що цей ефект зумовлений дією цГМФ на внутрішньоклітинні канали вивільнення  $Ca^{2+}$  [19].

У наших попередніх дослідженнях на пермеабілізованих секреторних клітинах слинних залоз комара-дергуна з'ясувалося, що існує взаємозв'язок активації сигнального шляху аденілатциклаза-цАМФ і  $IP_3$ -залежного вивільнення  $Ca^{2+}$  із депо [2]. Тому не викликає сумніву, що цАМФ і цГМФ мають важливе значення для регулювання внутрішньоклітинних каналів вивільнення  $Ca^{2+}$  секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна.

Метою нашого дослідження було з'ясування конкретних шляхів регулювання вивільнення  $Ca^{2+}$  із депо під дією цГМФ і цАМФ.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на пермеабілізованих клітинах слинної залози личинки комара-дергуна (*Chironomus plumosus* L.). За своєю структурною організацією вони

дещо відрізняються від секреторних клітин екзокринних залоз вищих тварин. Але якщо функціональні зв'язки між різними кальційтранспортними системами мають загальнобіологічне значення, то вони притаманні і для секреторних клітин слинних залоз личинок комах, хоча можуть мати і деякі свої особливості. Аналіз цих особливостей та їхнього зв'язку зі структурною організацією клітин дає змогу більш адекватно з'ясувати внесок певної кальційтранспортної системи у формування кальцієвого сигналу, у його часові та просторові показники.

Функціональний стан кальційтранспортних систем оцінювали за зміною вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз, оброблених сапоніном і інкубованих у середовищах, які відрізняються наявністю відповідного активатора чи блокатора. Пермеабілізація клітин сапоніном у поєднанні з вимірюванням змін вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз робить, по-перше, поверхню внутрішньоклітинних органел доступною для цих активаторів чи блокаторів, багато з яких погано проникають через плазматичну мембрану, і, по-друге, дозволяє досліджувати тільки внутрішньоклітинні кальційтранспортні системи, не використовуючи специфічні блокатори цих систем плазматичної мембрани. Зміна вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз, оброблених неіонними детергентами у відповідній концентрації, відображає його зміну у внутрішньоклітинних органелах, мембрана яких є стійкішою і менше піддається пермеабілізації.

Залози препарували за допомогою мікрохірургічних інструментів під мікроскопом. Базовий розчин для виділення та преінкубації інтактних залоз містив (ммоль/л): NaCl - 136,9, KCl - 5,36,  $CaCl_2$  - 1,76,  $Na_2HPO_4$  - 0,35,  $KH_2PO_4$  - 0,44,  $MgCl_2$  - 0,95, глюкоза - 5,55 (рН 7,2). Для пермеабілізації секреторних клітин відпрепаровані слинні залози попередньо інкубували протягом 10 хв у базовому розчині, до якого

входив сапонін у концентрації 0,1 мг/мл. Робочу концентрацію сапоніну та час інкубації з ним підбрали експериментально [5]. Залози відмивали від сапоніну і далі інкубували 30 хв у водяній бані при 25 °С і помірному струшуванні. Вихідний розчин для інкубації залоз після обробки їх сапоніном містив (ммоль/л): NaCl - 15,30, KCl - 129,94, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,35, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,44, глюкоза - 5,55 (рН 7,0). Після інкубації вміст пробірок протягом 5 хв центрифугували при 1600 g. Зливши супернатант, до осаду додавали 1 мл бідистильованої води та гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатора. Отриманий гомогенат центрифугували 10 хв. Вміст Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз вимірювали за допомогою арсеназо III з використанням стандартного набору реактивів фірми «Simko Ltd» (Львів).

Для блокування IФ<sub>3</sub>-чутливих кальцієвих каналів до середовища додавали гепарин (500 мкг/мл), а для блокування кальцієвої помпи ЕПР – тапсигаргін (1 мкмоль/л), а також використовували IФ<sub>3</sub> у концентрації 10 мкмоль/л, ріанодин – 500 нмоль/л, цАМФ і цГМФ – 1, 10 і 100 мкмоль/л.

Статистичне опрацювання результатів здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Достовірність змін встановлювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У попередніх дослідженнях [2] виявлено, що додавання цАМФ у концентрації 1, 10 і 100 мкмоль/л до середовища інкубації зменшує вміст Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз, оброблених сапоніном. Оскільки гепарин (500 мкг/мл) пригнічував ефект цАМФ у концентрації 1 мкмоль/л, нами зроблено припущення, що цАМФ у цій концентрації активує IФ<sub>3</sub>-залежні канали вивільнення Ca<sup>2+</sup>. На відміну від цього, у концентрації 100 мкмоль/л цАМФ активує канали,

нечутливі до гепарину. Для перевірки зроблених припущень ми спочатку подіяли IФ<sub>3</sub> на залози, які інкубувалися у цАМФ-вмісному середовищі.

З'ясувалося (рис. 1), що за одночасної наявності у середовищі інкубації IФ<sub>3</sub> (10 мкмоль/л) і цАМФ (1 мкмоль/л) вміст Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз статистично достовірно не змінювався. Коли ж у середовищі був лише IФ<sub>3</sub> або цАМФ у цій самій концентрації, то вміст Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз статистично достовірно зменшувався на 31,46±7,53 і 36,10 % ± 8,05 % відповідно відносно контролю. Отже, наявність у середовищі інкубації цАМФ запобігає дії IФ<sub>3</sub>, яка полягає у активації вивільнення Ca<sup>2+</sup> із депо, що і призводить до зменшення вмісту Ca<sup>2+</sup> у тканині [29].

Згідно з даними літератури, цАМФ-залежні протеїнкінази А можуть регулювати IФ<sub>3</sub>-чутливі кальцієві канали, оскільки молекула каналу містить відповідні сайти фосфорилування [12, 20]. Але чи це фосфорилування сприяє активації каналів, чи, навпаки, пригнічує їх – залежить від типу каналу, тканини у якій він експресується та вмісту IФ<sub>3</sub> у клітині. Ізольовані та вмонтовані у біліпідний шар IФ<sub>3</sub>-чутливі кальцієві канали з мозку щурів акти-

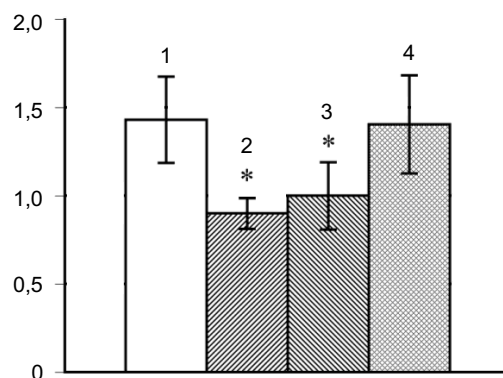


Рис. 1. Залежність вмісту Ca<sup>2+</sup> у тканині залоз від наявності у середовищі інкубації IФ<sub>3</sub> (10 мкмоль/л) та цАМФ (1 мкмоль/л): 1 – контроль, 2 – IФ<sub>3</sub>, 3 – цАМФ, 4 – цАМФ та IФ<sub>3</sub>.

\* достовірні зміни порівняно з контролем (P < 0,05)

вуються внаслідок фосфорилування протеїназою А [10]. Аналогічно фосфорилування каналів II типу гепатоцитів підвищує вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$  [16]. Але фосфорилування  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів III типу панкреатичних ацинарних клітин за низької концентрації  $\text{I}\Phi_3$  пригнічує вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$  [15]. Аналізуючи ці дані і наші результати, ми зробили припущення, що у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна можуть бути кілька типів  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів, які відрізняються між собою за ефектом, спричиненим їхнім фосфорилуванням протеїназою А.

Викликане цАМФ вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мікросомальних везикул і пермеабілізованих ацинарних клітин привушної слинної залози пов'язують також із функціонуванням ріанодинчутливих кальцієвих каналів [25, 27, 31]. Оскільки у реалізації дії цАМФ у концентрації 100 мкмоль/л беруть участь канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , які не блокуються гепарином, ми припускали, що це – ріанодинчутливі кальцієві канали [2].

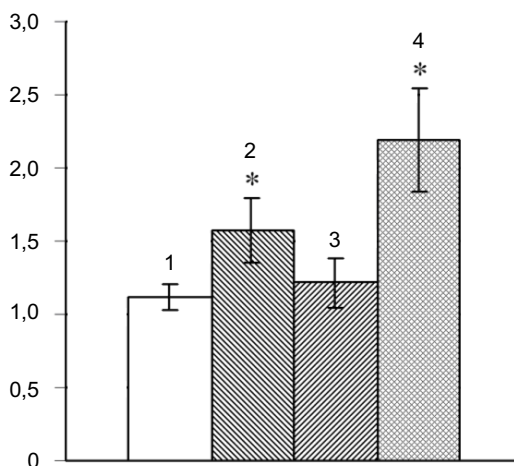


Рис. 2. Залежність вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз від наявності у середовищі інкубації ріанодину (500 нмоль/л) і цАМФ (100 мкмоль/л): 1 – контроль, 2 – цАМФ, 3 – ріанодин, 4 – цАМФ і ріанодин.

\* достовірні зміни порівняно з контролем ( $P < 0,05$ )

Щоб перевірити цю думку, ми застосували ріанодин у концентрації 500 нмоль/л, який, як було нами раніше з'ясовано, блокує ріанодинчутливі кальцієві канали досліджуваних секреторних клітин [8].

Виявилося, що за наявності у середовищі інкубації цАМФ (100 мкмоль/л) під впливом ріанодину вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз статистично достовірно ( $P=0,03$ ,  $n=7$ ) збільшився на  $89,54\% \pm 30,96\%$  (рис. 2). За відсутності цАМФ у середовищі збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз під впливом ріанодину становило лише  $40,72\% \pm 12,52\%$ . Це означає, що наявність цАМФ у середовищі інкубації підсилює блокуючу дію ріанодину.

Цей факт можна пояснити тим, що ріанодин легше зв'язується із відкритими каналами, ніж із закритими [30]. Вважають навіть, що із закритими каналами ріанодин взагалі не зв'язується [28]. Наявність цАМФ у концентрації 100 мкмоль/л у середовищі інкубації збільшує, очевидно, кількість ріанодинчутливих кальцієвих каналів, що знаходяться у відкритому стані, а тому зв'язування з ними ріанодину відбувається інтенсивніше, ніж у контролі. Крім того, за цих умов збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз може бути зумовлене не лише підсиленням блокування ріанодинчутливих кальцієвих каналів, але й пригніченням цАМФ  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів.

Таке твердження базується на даних наших попередніх досліджень, які показали, що недостовірне і незначне зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом цАМФ у концентрації 100 мкмоль/л стає більш інтенсивним і статистично достовірним, коли у середовищі інкубації був гепарин [2].

Більше того, одночасна наявність у розчині блокаторів обох класів каналів – ріанодину і гепарину – цілком запобігала будь-якій зміні вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом цАМФ ( $P=0,86$ ,  $n=6$ ).

Таким чином, ми можемо зробити висновок, що у реалізації ефекту цАМФ у

концентрації 100 мкмоль/л залучені як ріанодин-, так і  $I\Phi_3$ -чутливі кальцієві канали. Але якщо дія цАМФ на ріанодинчутливі кальцієві канали прямо чи опосередковано посилює мобілізацію депонованого  $Ca^{2+}$ , то на  $I\Phi_3$ -чутливі кальцієві канали, навпаки, справляють протилежний ефект – вивільнення  $Ca^{2+}$  блокується.

Проте закономірно виникає запитання: який механізм впливу цАМФ у меншій концентрації – 1 мкмоль/л? Чому отримане зменшення вмісту  $Ca^{2+}$  під дією цАМФ у цій концентрації блокувалося гепарином? Ми припускаємо, що за таких умов відбувається незначна стимуляція ріанодинчутливих кальцієвих каналів. Це призводить до вивільнення  $Ca^{2+}$ , яке підсилюється через позитивний зворотний зв'язок з  $I\Phi_3$ -чутливого депо (рис. 3) за схемою: цАМФ → ріанодинчутливі кальцієві канали → збільшення цитозольного  $Ca^{2+}$  → підсилення спонтанного відкривання  $I\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів → збільшення цитозольного  $Ca^{2+}$  → підсилення активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів → зменшення вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз. Саме це підсилення ефекту цАМФ на

ріанодинчутливі кальцієві канали блокується гепарином. Але за підвищеної концентрації  $I\Phi_3$  ця схема не реалізується. Можливо, це зумовлено більш складними зв'язками між  $I\Phi_3$ -чутливими та ріанодинчутливими кальцієвими каналами. Нами встановлено, що внаслідок одночасного додавання ріанодину (5 нмоль/л) і  $I\Phi_3$  (10 мкмоль/л) у середовище інкубації вміст  $Ca^{2+}$  не змінювався [3].

На наступному етапі ми вирішили з'ясувати, як впливає цГМФ на кальційтранспортні системи залозистих клітин. З'ясувалися, що додавання цГМФ у концентрації 1, 10 і 100 мкмоль/л до середовища інкубації залоз, оброблених сапоніном, спричинило збільшення вмісту  $Ca^{2+}$ , яке, однак, не досягало першого рівня достовірності у жодному з випадків. За наявності у середовищі інкубації гепарину середньоарифметичні значення вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз у контролі та за дії цГМФ у концентрації 100 мкмоль/л майже не відрізнялися (таблиця). Так само не чинив цГМФ достовірного впливу за наявності у середовищі інкубації ріанодину у блокуючій концентрації (500 нмоль/л), хоча слід

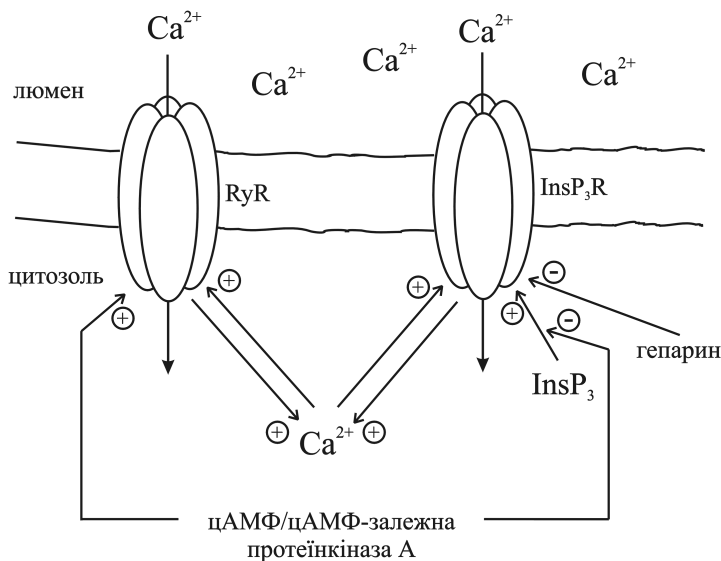


Рис. 3. Схема регулювання функціональної активності каналів вивільнення  $Ca^{2+}$  секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна за участю цАМФ:

RyR – ріанодинчутливі кальцієві канали, InsP<sub>3</sub>R –  $I\Phi_3$ -чутливі кальцієві канали, InsP<sub>3</sub> –  $I\Phi_3$

відзначити тенденцію до зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз за цих умов. Лише за наявності тапсигаргіну – селективного блокатора кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула – цГМФ статистично достовірно викликав збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз на  $50,65\% \pm 17,44\%$ .

З літературних джерел відомо, що цГМФ, діючи через цГМФ-залежні протеїнкінази (протеїнкінази G), по-різному впливає на внутрішньоклітинний вміст  $\text{Ca}^{2+}$ : підвищує концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі гепатоцитів [26] і яйцеклітин морського їжака [18] і знижує цитозольну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у збудливих тканинах [6, 23]. Одержані нами результати вказують на різноспрямованість ефектів, спричинених цГМФ. Так, за умови блокування кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула тапсигаргіном цГМФ збільшує вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині, блокуючи канали його вивільнення. Це може відбуватися через фосфорилування цГМФ-залежними протеїнкіназами або внаслідок прямої дії цГМФ як на  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі, так і на ріанодин-

чутливі кальцієві канали, оскільки за наявності у середовищі інкубації гепарину чи ріанодину жодних змін у вмісті  $\text{Ca}^{2+}$  не відбувалось. Але наявність ефекту цГМФ за умови блокування кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула вказує, що цей циклічний нуклеотид впливає також і на неї. Очевидно між каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  і кальцієвою помпою ендоплазматичного ретикулула існує тонкий взаємозв'язок, опосередкований зміною люмінального  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 4).

У гладеньких м'язах окрім пригнічення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок фосфорилування протеїнкіназою G різних ізоформ  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів [17], протеїнкіназа G також пригнічує активність фосфоліпази C і утворення  $\text{I}\Phi_3$  [24], стимулює активність помпи плазматичної мембрани [26] і саркоплазматичного ретикулула [9] і цим самим підвищує накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в депо і вихід його з клітин. Також цГМФ-залежні протеїнкінази, як і цАМФ-залежні протеїнкінази, можуть фосфорилувати білок фосфоламбан, що й

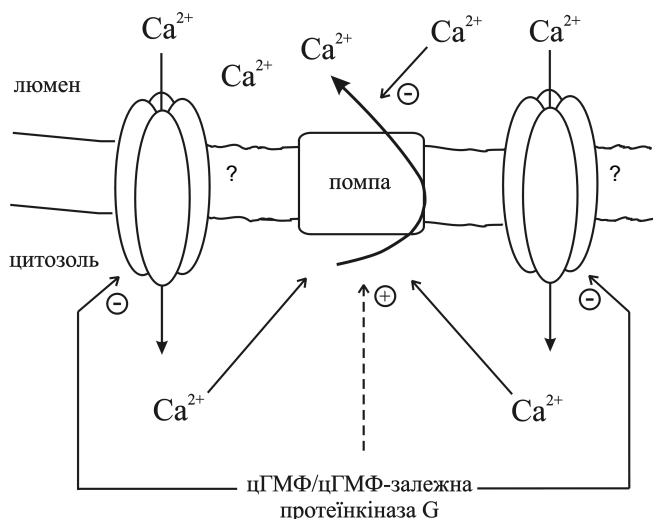


Рис. 4. Гіпотетична роль взаємозв'язку, опосередкованого зміною люмінального та цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , між функціонуванням каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  і кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула у цГМФ-індукованих змінах вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині залоз личинки комара-дергуна: цГМФ пригнічує канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , спостерігається локальне збільшення люмінального  $\text{Ca}^{2+}$ , яке спричиняє блокування кальцієвої помпи – сумарний вміст  $\text{Ca}^{2+}$  не змінюється; лише коли помпа не функціонує, спостерігається збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок пригнічення каналів

**Вплив цГМФ на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у тканині слинних залоз (нмоль/залозу), інкубованих за різних умов ( $M \pm m$ )**

Умова досліду	Контроль	цГМФ (100 мкмоль/л)
Вихідне середовище інкубації	1,410 $\pm$ 0,173	1,467 $\pm$ 0,199; P=0,715 (n=9)
Введення		
гепарину (500 мкг/мл)	1,175 $\pm$ 0,162	1,184 $\pm$ 0,236; P = 0,978 (n = 8)
ріанодину (500 нмоль/л)	1,606 $\pm$ 0,437	1,231 $\pm$ 1,231; P = 0,393 (n = 8)
тапсигаргіну (1 мкмоль/л)	1,068 $\pm$ 0,176	1,487 $\pm$ 1,487; P = 0,022 (n = 7)

активує кальцієву помпу ендоплазматичного ретикулума [4].

Пермеабілізація клітин дає змогу виявити лише дію цГМФ на внутрішньоклітинні кальційтранспортні системи. Як впливає із отриманих результатів, у секреторних клітинах досліджуваних слинних залоз цГМФ пригнічує неіндуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із депо. Причиною цього може бути зміна вмісту  $\text{IP}_3$  чи  $\text{Ca}^{2+}$  у стані спокою клітин або фосфорилування протеїнкіназою G цих каналів. Слід відзначити, що таке пригнічення вдалося виявити лише за умов, коли кальцієва помпа була заблокована.

Мабуть, у стані спокою  $\text{Ca}^{2+}$  постійно вивільняється з депо, але негайно повертається назад кальцієвою помпою ендоплазматичного ретикулума й, таким чином, його концентрація в цитоплазмі підтримується на сталому рівні. Описаний механізм лише підтримує стан готовності кальційтранспортних систем до запуску клітинної відповіді.

*Робота виконана за сприяння Західно-Українського центру біомедичних досліджень.*

**S.V. Bychkova, V.V. Man'ko, M.Yu. Klevets**

**CYCLIC NUCLEOTIDE'S REGULATION OF INTRACELLULAR CALCIUM-RELEASED CHANNELS IN SECRETORY CELLS OF CHIRONOMUS PLUMOSUS LARVAE**

We investigate action of cAMP and cGMP on calcium content in tissue of salivary gland of *Chironomus plumosus* larvae L. using arsenaso III. In order to permeabilize cells we incubate it in medium with saponine (0,1 mg/ml during 10 min) with next incubation in necessary solution. The internal incubation solution contents (in mM): 15.3 NaCl, 129.94 KCl, 0.35  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.55 glucose, pH 7.0. It was

shown that cAMP (1mkM) didn't cause release calcium through  $\text{IP}_3$ -channels, because  $\text{IP}_3$  didn't intensify affect of cAMP, which has been established before. We observed that cAMP (100mkM) intensified ryanodine's action to increase calcium content in saponin-treated gland tissue. We concluded that cAMP (100mkM) activated calcium releasing though ryanodine-sensitive channels and inhibited  $\text{IP}_3$ -dependent calcium releasing without any stimulation. Different concentration of cGMP didn't cause change in calcium content in saponin-treated gland tissue. But at presence of taspigargin in incubation medium cGMP (100mkM) inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -released channels.

*I.Franko University, Lviv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Горшкова Т.В., Афиногенова С.А., Макаровская Е.Е. и др. Видовые и органические различия в активности и регуляции аденилат- и гуанилатциклазы // Укр. биохим. журн. – 1987. – **59**. – №4. – С.9.
2. Бичкова С., Манько В., Клевец М. Вплив цАМФ на функціонування внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем секреторних клітин // Вісн. Львів. унту. Серія біологічна. – 2003. – Вип. **32**. – С. 222–228.
3. Бычкова С.В., Манько В.В., Клевец М.Ю. Комбинированное действие инозитол-1, 4, 5-трифосфата и рианодина на содержание кальция в пермеабилезированных клетках слюнных желез: Материалы 5-го Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург–Гастро-2003» (10–12 сент. 2003 г.). – Гастроэнтерология. – 2003. – № 2–3. – С. 26.
4. Реутов В.П., Оролов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитро-соединений в регуляции активности этого фермента // Физиология человека. – 1993. – **19**. – № 1. – С.124–137.
5. Манько В.В., Стельмах С.В., Ларіна О.А. Пермеабілізовані клітини слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* як об'єкт для дослідження внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем секреторних клітин: Матеріали VIII Укр. біохім. з'їзду (1–3 жовт. 2002 р., м. Чернівці) // Укр. біохім. журн. – 2002. – **64**, № 4а (додаток 1). – С. 59–60.
6. Bredt D. S., Snyder. S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger // Neuron – 1992. – **8**. – P.3–11.
7. Bruce J.I.E., Shuttleworth T.J., Giovannucci D.R., Yule D.I. Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate

- Receptors in Parotid Acinar Cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – № 2. – P.1340–1348.
8. Bychkova S.V., Man'ko V.V., Klevets M.Ju. Ryanodine-induced calcium release in secretory cells of *Chironomus plumosus* larvae salivary glands. – In.: Joint Meeting British Pharmacological Society and the Physiological Society, University of Manchester (9–12 Sept. 2003). – P.107.
  9. Cornwell, T.L., Pryzwansky R.B., Wyatt T.A., Lincoln T.M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells // *Mol. Pharmacol.* – 1991. – **40**. P.923–931.
  10. DeSouza N., Reiken S., Ondrias K. et al. Protein kinase A and two phosphatases are components of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – №.42. – P.39397–39400.
  11. Ferris C.D., Haganir R.L. et al. Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – **88**, № 6 – P.2232–2235.
  12. Furuichi T., Yoshikawa S., Miyawaki A. et al. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400 // *Nature.* – 1989 – **342**. – P. 32–38.
  13. Galione A. Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signaling // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1994. – **98**. – P.125–131.
  14. Galione A., White A., Wilmott N. et al. cGMP mobilizes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis // *Nature.* – 1993. – **365**. – P.456–459.
  15. 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. – P.33704–33711.
  16. Hajnoczky G., Gao E., Nomura T. et al. Multiple mechanisms by which protein kinase A potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in permeabilized hepatocytes // *Ibid.* – 1993. – **293** (Pt 2). – P.413–422.
  17. Komalavilas P., Lincoln T.M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta // *Ibid.* – 1996. – **271**, № 36. – P.21933–21938.
  18. Lee H. C. Cyclic ADP-ribose: a new member of a super family of signaling cyclic nucleotides // *Cell. Signal.* – 1994. – **6**. – P.591–600.
  19. Manko V. Larina O., Klevets M.Yu. The effect of nitric oxide on  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange current in secretory cells. – In.: 3<sup>rd</sup> European Biophysics Congress, Мьнchen, Germany (9–13 Sept. 2000) // *Eur. Biophys. J. with Biophys. Letters.* – 2000. – **29**, № 4–5. – P. 327 (4D-6).
  20. Mignery G.A., Newton C.L., Archer B.T., Sьdhof T.C. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P.12679–12685.
  21. Murthy K. S., Jin J.-G., Grider J. R., Makhlof G. M. Characterization of PACAP receptors and signaling pathways in rabbit gastric muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **272** (Gastrointest. Liver Physiol. – Vol. 35) – P.G1391–G1399.
  22. Murthy K. S., Makhlof G. M. VIP/PACAP-mediated activation of membrane-bound NO synthase in smooth muscle is mediated by pertussis toxin-sensitive  $\text{G}^{i1-2}$  // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P.15977–15980.
  23. Murthy K. S., Makhlof G. M. cGMP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{IP}_3$ -insensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores in smooth muscle // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1998. – **274**, № 5. – C1199–C1205.
  24. Murthy K. S., Severi C., Grider J.P., Makhlof G.M. Inhibition of  $\text{IP}_3$  and  $\text{IP}_3$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **264** (Gastrointest. Liver Physiol. – Vol. 27). – P.G967–G974.
  25. Ozawa T. Ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanism of rat pancreatic acinar cells is modulated by calmodulin // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1999. – **1452**. – P.254–262.
  26. Rooney T. A., Joseph S. K., Queen C., Thomas A. P. Cyclic GMP induces oscillatory calcium signals in rat hepatocytes // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P.19817–19825.
  27. Rubin R.P., Adolf M.A. Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – **268**. – № 2. – P. 600–606.
  28. Rubtsov A.M. Molecular mechanisms of regulation of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels (ryanodine receptors), muscle fatigue, and Severin's phenomenon // *Biochemistry (Mosc.)* – 2001. – **66**(10). – P.1132–1143.
  29. Stelmakh S.V., Manko V.V., Klevets M.Yu. The identify of  $\text{IP}_3$ -channels in salivary glands secretory cells of *Chironomus plumosus* larvae. – In.: Programme and Abstracts of 4<sup>th</sup> Parnas conference “Molecular mechanisms of cell activation: Biological signals and their target enzymes” (15–17 Sep. 2002, Wrociaw). – S.l. – 2002. – P. 110.
  30. Sutko J.L., Airey J.A., Welch W., Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds // *Pharmacol. Rev.* – 1997. – **49**. – P.53–98.
  31. Zhang X., Wen J., Bidasee K. R. et al. Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland // *Bioch. J.* – 1999. – **340**. – P. 519–527.