УДК 617.764.1 : 576.342 : 577.352.465

А.Б. КОТЛЯРОВА, В.В. МАНЬКО
Львівський національний університет ім. Івана Франка

Вплив 2-АФБ на Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин сльозової залози

2-АФБ (2-аміноетоксидифенілборат) часто застосовують як інгібітор $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів [1, 14, 15, 17]. Щоправда, дані стосовно констант напівінгібування ($К_{0,5}$) цих каналів у різних тканинах відрізняються. Слід зазначити також, що інгібуюча дія 2-АФБ залежить від концентрації $IФ_3$, застосованого для активації $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів [14]. Максимальне вивільнення Ca^{2+} з мікросом мозочка спостерігали за дії $IФ_3$ у концентрації 10 мкмоль/л; у цьому випадку $K_{0,5}$ для 2-АФБ становила 1 ммоль/л [10]. $K_{0,5}$ ІФ3-чутливих Ca^{2+}-каналів пермеабілізованих клітин A_7r_5 для 2-АФБ становить 36 мкмоль/л і не залежить від концентрації $IФ_3$ [15].

Крім інгібування $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів, 2-АФБ діє на інші транспортувальні системи різних клітин [9–11]. Зокрема, 2-АФБ може інгібувати депокерований вхід Ca^{2+} у клітину [10], Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму [1, 15] і стимулювати неспецифічний витік Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [15], але $K_{0,5}$ у цьому випадку є суттєво вищою.

Мета нашої роботи – дослідити неоднозначність дії 2-АФБ на функціонування Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура.

Матеріали та методи досліджень. В експерименті було використано нелінійних щурів масою 170...240 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Після наркотизації хлороформом та декапітації тварин швидко виділяли зовнішньоорбітальну сльозову залозу (*glandula orbitalis externa*) та очищали її від сполучної тканини. Для ізолювання секреторних клітин використали модифікований нами метод [2, 5, 12,]. Інтактність плазматичної мембрани контролювали з використанням трипанового синього. Секреторні клітини пермеабілізували дигітоніном (50 мкг/мл

© Котлярова А.Б., Манько В.В., 2013

з розрахунку на 0,5 млн клітин) протягом 10 хв при 37°С у середовищі, наближеному за іонним складом до внутрішньоклітинного [2, 5].

Після ізолювання (або і пермеабілізації) клітини поділяли на аліквоти та інкубували 15 хв у середовищі відповідного складу з використанням водяного термостату при 37 °С та помірному струшуванні [5]. Концентрацію Ca^{2+} визначали спектрофотометричним методом з використанням арсеназо III.

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм *Microsoft Excel*. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом, за статистично достовірні приймали зміни з $p<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Попередніми дослідженнями ми підтвердили, що 2-АФБ дійсно інгібує $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали секреторних клітин сльозових залоз [4]. Але нас зацікавило, чи може 2-АФБ інгібувати інші іон-транспортувальні системи, які визначають вміст Ca^{2+} у досліджуваних клітинах. Тому ми дослідили вплив 2-АФБ на вміст Ca^{2+} у інтактних та пермеабілізованих клітинах сльозових залоз за умов їх інкубації у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+}.

З'ясувалося, що за інкубації інтактних клітин сльозової залози у Ca^{2+}-вмісному (1 ммоль/л) середовищі за дії 2-АФБ у концентрації 5 і 10 мкмоль/л сумарний вміст Ca^{2+} у досліджуваних клітинах не змінювався (n=5). Але за його концентрації 20 мкмоль/л вміст Ca^{2+} у тканині зменшувався на 26,93±7,17% ($p<0,05$, n=5; рис. 1). Таке середовище для клітин наближене до природного, однак можливим є надходження Ca^{2+} із позаклітинного середовища за депозалежним механізмом, що ускладнює аналіз отриманих результатів.

Для інгібування депокерованого входу Ca^{2+} у досліджувані клітини інкубували у номінально безкальцієвому середовищі. За таких умов 2-АФБ зменшував вміст Ca^{2+} у клітинах (у концентраціях 5, 10 і 20 мкмоль/л на 32,75±8,40; 39,48±5,40 і 48,65±5,74% відповідно; n=7; рис. 1). Подібну залежність отримано під час дослідження впливу 2-АФБ на вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз. У цьому випадку під впливом 2-АФБ у зазначених концентраціях сумарний вміст Ca^{2+} у клітинах зменшувався на 42,28±9,92; 56,72±9,98 і 54,27±10,29% відповідно (n=5; рис. 1).

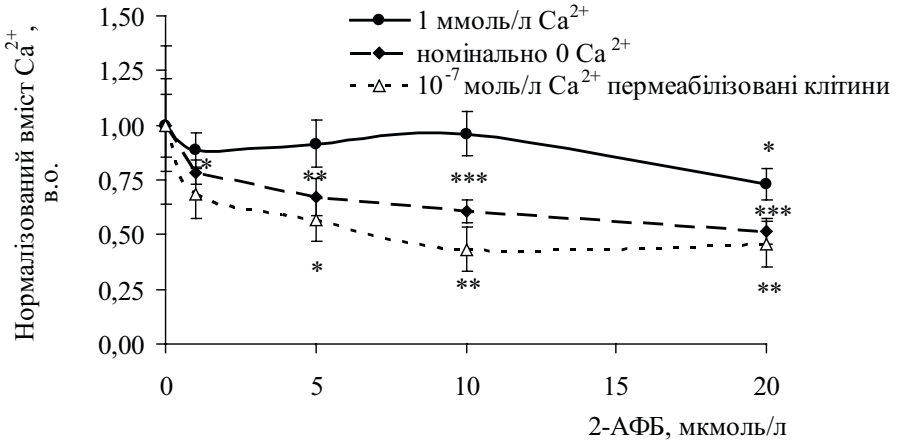
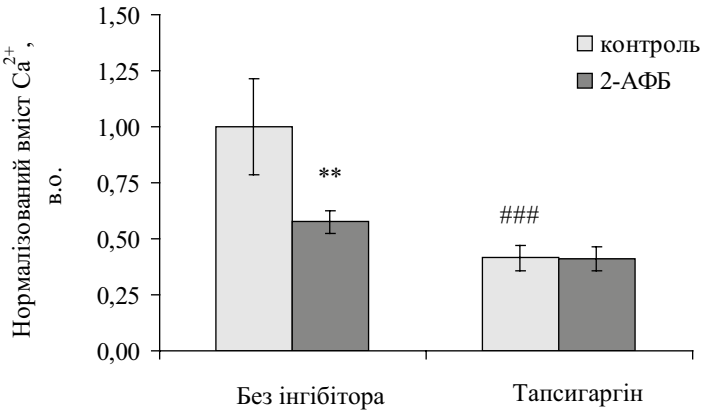


Рис. 1. Вплив 2-АФБ різної концентрації на вміст Ca^{2+} у інтактних та пермеабілізованих клітинах зовнішньоорбітальної сльозової залози щура: вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила 2-АФБ; інтактні: $[Na^+]$=134 ммоль/л, $[K^+]$=6 ммоль/л; n=7; пермеабілізовані: $[K^+]$=140 ммоль/л, $[Ca^{2+}]=10^{-7}$ моль/л; n=5; * – різниця порівняно достовірна з $p<0,05$, ** – з $p<0,01$; *** – з $p<0,001$

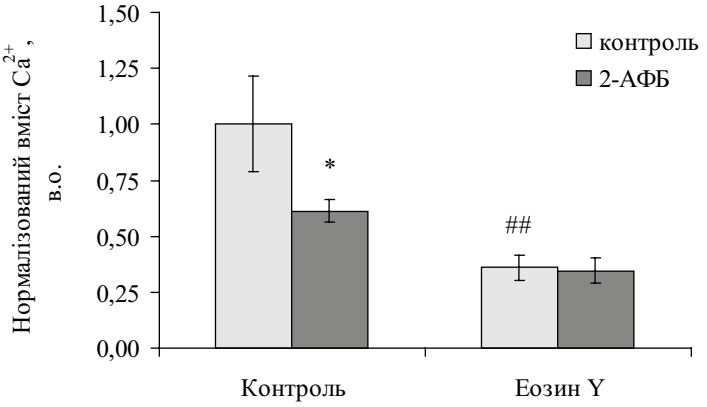
На основі результатів двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що вміст Ca^{2+} у клітинах на 53,77% визначається концентрацією 2-АФБ і на 32,47% – концентрацією Ca^{2+} у середовищі інкубації.

Отже, під впливом 2-АФБ відбувається зменшення вмісту Ca^{2+} у досліджуваних клітинах, яке є найвираженішим за інкубації клітин у безкальцієвому середовищі. Це зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах під впливом 2-АФБ зумовлене інгібуванням Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму, оскільки лише через інгібування цієї Ca^{2+}-транспортувальної системи вміст Ca^{2+} у клітинах може зменшитися. Звичайно, це не заперечує інгібуючого впливу 2-АФБ на $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали. Однак спустошення депо, спричинене інгібуванням Ca^{2+}-помпи, суттєвіше впливає на вміст Ca^{2+} у клітинах, ніж інгібування $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів.

Підтверджується такий висновок тим, що на тлі тапсигаргіну (специфічного інгібітора Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму [16] 2-АФБ (10 мкмоль/л) не змінював вмісту депонованого Ca^{2+} у пермеабілізованих секреторних клітинах досліджуваних залоз (n=5; рис. 2, *а*).



а



б

Рис. 2. Вплив 2-АФБ на вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах зовнішньоорбітальної сльозової залози щура залежно від наявності тапсигаргіну та еозину *Y* у середовищі: вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила інгібіторів; $[K^+]$=140 ммоль/л, $[Ca^{2+}]=10^{-7}$ моль/л; [еозин *Y*]=10 мкмоль/л; [тапсигаргін]=1 мкмоль/л; [2-АФБ]=10 мкмоль/л; * – різниця порівняно з контролем достовірна з $p<0,05$; ** – з $p<0,01$, ## – різниця порівняно з пробою без інгібітора достовірна з $p<0,05$; ### – з $p<0,001$; n=5

Подібні результати були отримані і з використанням інгібітора Ca^{2+}-помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму [7] еозину *Y* (*n*=5; рис. 2, *б*).

Результати досліджень та їх обговорення. Рівень Ca^{2+} у цитозолі визначається двома протилежно спрямованими потоками Ca^{2+}. Функціонування пасивних Ca^{2+}-транспортувальних систем забезпечує вхідний (стосовно цитозолю) потік Ca^{2+}, який відбувається за рахунок надходження Ca^{2+} із позаклітинного середовища крізь плазматичну мембрану і його вивільнення із внутрішньоклітинних депо. Вхідний потік реалізується завдяки активному виведенню Ca^{2+} з цитозолю у позаклітинне середовище або внутрішньоклітинні депо [6].

Узгоджене функціонування різних Ca^{2+}-транспортувальних систем відіграє вирішальну роль у підтриманні цитозольної концентрації Ca^{2+}, що має надзвичайно важливе значення у процесах Ca^{2+}-сигналізації [6, 8].

На підставі аналізу змін сумарного вмісту Ca^{2+} у клітинах після інкубації з відповідними антагоністами ми оцінювали інгібування Ca^{2+}-транспортувальних систем. Вміст Ca^{2+} у клітинах – інтегральний показник, оскільки Ca^{2+} є переважно у внутрішньоклітинних депо. У депо Ca^{2+} може перебувати в іонізованому стані чи у вигляді комплексних сполук із різними речовинами, які значною мірою збільшують кальцієву місткість самих депо.

Використовуючи порівняльний аналіз дії агоністів чи інгібіторів відповідних Ca^{2+}-транспортувальних систем, ми можемо ідентифікувати, яка частка із сумарного вмісту Ca^{2+} у клітині пов'язана з тим чи іншим депо. Інгібування систем, які забезпечують надходження Ca^{2+} у цитозоль (депокеровані Ca^{2+}-канали), а також у внутрішньоклітинні депо (наприклад, Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму) спричинить зменшення його вмісту. Інгібування Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани та каналів вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму (ріанодинчутливі та $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали) супроводжується збільшенням вмісту Ca^{2+} у досліджуваних клітинах.

Як і в інших типах клітин, 2-АФБ дійсно інгібує $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура. Такий висновок можна зробити на підставі того, що на тлі 2-АФБ ефект $IФ_3$ на вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз відсутній [4].

2-АФБ інгібує також Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин сльозових залоз. Це підтверджується тим, що на тлі інгібіторів Ca^{2+} помп – тапсигаргіну та еозину *Y* – 2-АФБ не змінював вмісту депонованого Ca^{2+} у пермеабілізованих секреторних клітинах досліджуваних залоз. Такі результати добре узгоджуються з даними інших авторів [1, 15].

Окрім цього, 2-АФБ повністю нівелює карбахолін-індуковане зменшення вмісту Ca^{2+} у інтактних клітинах сльозових залоз [4]. З'ясувалося також, що 2-АФБ у цій концентрації інгібує карбахолін- і тапсигаргініндукований депокерований вхід Ca^{2+} у досліджувані клітини [3]. Беручи до уваги, що активація $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів необхідна для запуску депокерованого входу Ca^{2+} [13], такий ефект можна пояснити безпосереднім інгібуванням депокерованих Ca^{2+}-каналів або інгібуванням $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів.

Висновок. 2-АФБ інгібує $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму та депокерований вхід Ca^{2+} у секреторні клітини зовнішньоорбітальної сльозової залози щура.

Робота виконана за фінансової підтримки Західно-Українського Біомедичного Дослідного Центру WUBMRC (індивідуальний грант А.Б. Котлярової на 2012–2013 рр.).

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Великопольська О.Ю.* Роль ендоплазматичної Ca^{2+}-функціональної одиниці у процесах трансдукції сигналу P2Y-рецепторів секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця / О.Ю. Великопольська, В.В. Манько // Біологічні студії / Studia Biologica. – 2009. – Т. 3, № 3. – С. 39–50. 2. *Котлярова А.* АТФ-азна активність ізольованих клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура за умов *in situ* / А. Котлярова, В. Манько // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2012. – Вип. 60. – С. 270–282. 3. *Котлярова А.Б.* Депокерований вхід Ca^{2+} у секреторні клітини сльозових залоз / А.Б. Котлярова, О.Б. Крук, О.М. Дорош, В.В. Манько: мат. міжнар. наук. конф. студ. і молодих вчених, присвяченої 20-річчю ф-ту Харк.нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 18–19 квітня 2013 р.). – Харків, 2013. – С. 106. 4. *Котлярова А.Б.* Роль $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів у Ca^{2+}-сигналізації у секреторних клітинах зовнішньоорбітальної сльозової залози щура / А.Б. Котлярова, В.В. Манько : мат. V симпозіуму «Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій людини в онтогенезі» (Черкаси, 21–22 травня 2012 р.). – Черкаси, 2012. – С. 46. 5. *Котлярова А.Б.* Ca^{2+}-транспортувальні системи секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура. І. Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму / А.Б. Котлярова, В.В. Манько // Біологічні студії. – 2012. – Т. 6, № 2. – С. 99–114. 6. *Манько В.В.* Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз. – Львів: ЛНУ ім. Івана Франка. – 2011. – 271 с. 7. *Слінченко Н.М.* Використання очищеної Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію / Н.М. Слінченко, І.Г. Черниш, С.О. Костерін // Укр. біохім. журнал. – 2003. – Т. 75, № 2. – С. 33–38. 8. *Armstrong C.* ER-mitochondria communication. How privileged? / C.Armstrong // Physiol. – 2007. – № 22. – P. 261–268. 9. *Bishara N.* Capacitative Ca^{2+} entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongin C / N. Bishara, T. Murphy, M. Hill // Br. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 135, № 1. – P. 119–128. 10. *Bootman M.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca^{2+} release / M. Bootman, T. Collins, L. Mackenzie et al. // FASEB J. – 2002. – Vol. 16, № 10. – P. 1145–1150. 11. *Dobryndeva Y.* 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits storeoperated calcium entry channels in human platelets / Y. Dobryndeva, P. Blackmore // Mol. Pharmacol. – 2001. – Vol. 60. – P. 541–552. 12. *Herzog V.* Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. Peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation / V. Herzog, H. Sies, F. Miller // J. Cell Biol. – 1976. – Vol. 70. – P. 692–706. 13. *Ma H.-T.* Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels / H.-T. Ma, R. Patterson, D. van Rossum et al. // Science. – 2000. – Vol. 287, № 5458. – P. 1647–1651. 14. *Maruyama T.* 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1,4,5) P_3-induced Ca^{2+} release / T. Maruyama, T. Kanaji, S. Nakade et al. // J. Biochem. – 1997. – Vol. 122, № 3. – P. 498–505. 15. *Missiaen L.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca^{2+} pump and the non-specific Ca^{2+} leak from the non-mitochondrial Ca^{2+} stores in permeabilized A7r5 cells / L. Missiaen, G. Callewaert, H. de Smedt, J. Parys // Cell Calcium. – 2001. – Vol. 29, № 2. – P. 111–116. 16. *Thastrup O.* Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum $Ca^{2(+)}$-ATPase / O. Thastrup, P. Cullen, B. Drobak et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87, № 7. – P. 2466–2470. 17. *Wu J.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate modulates kinetics of intracellular Ca^{2+} signals mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive $Ca^{(2+)}$ stores in single pancreatic acinar cells of mouse / J. Wu, N. Kamimura, T. Takeo et al. // Mol. Pharmacol. – 2000. – Vol. 58, № 6. – P. 1368–1374.

Стаття надійшла до редколегії 26.06.13

ВЛИЯНИЕ 2-АФБ НА CA^{2+}-НАСОС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Б. КОТЛЯРОВА, В.В. МАНЬКО

Львовский национальный университет им. Ивана Франко

2-АФБ (2-аминоэтоксидифенилборат) часто применяют для ингибирования $ИФ_3$-чувствительных Ca^{2+}-каналов различных клеток. Цель работы – исследовать неоднозначное влияние этого ингибитора на функционирование Ca^{2+}-насос эндоплазматического ретикулума секреторных клеток внеглазничной слезной железы крысы. Выяснилось, что кроме $ИФ_3$-чувствительных Ca^{2+}-каналов и депозависимого входа Ca^{2+}, 2-АФБ ингибирует также Ca^{2+}-насос эндоплазматического ретикулума секреторных клеток слезных желез, в результате чего содержание Ca^{2+} в исследуемых клетках уменьшается. А на

фоне ингибиторов Ca^{2+}-насосов – тапсигаргина и эозина *Y* – 2-АФБ (10 мкмоль/л) не менял содержания депонированного Ca^{2+} в пермеабилизированных секреторных клетках исследуемых желез. Кроме того, эффект 2-АФБ зависит также от концентрации Ca^{2+} в среде инкубации. На основе результатов двухфакторного дисперсионного анализа установлено, что содержание Ca^{2+} в исследуемых клетках на 53,77% определяется концентрацией 2-АФБ и на 32,47% – концентрацией Ca^{2+} в среде инкубации.

Ключевые слова: 2-АФБ, $ИФ_3$-чувствительные Ca^{2+}-каналы, Ca^{2+}-насосы, слезные железы.

EFFECT OF 2-APB ON SERCA OF LACRIMAL GLAND SECRETORY CELLS

A. KOTLIAROVA, V. MANKO
Ivan Franko Lviv National University

Considering the ambiguity of the effect of 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate), which is often used for the inhibition of IP_3-sensitive Ca^{2+} channels of different cells, the aim of this work was to investigate the effect of the inhibitor on the SERCA functioning of the rat exorbital lacrimal gland secretory cells.

Experiments were performed on nonlinear rats. For lacrimal gland cells isolation modified method of Herzog, Sies, Miller (1976) was used. The integrity of plasma membrane was estimated visually using trypan blue. Cells were permeabilized by digitonin (50 μg/0,5 mln cells) during 10 min at 37°C in intracellular solution. After isolation (and permeabilization) cells were divided into aliquots and incubated during 15 min at 37°C in appropriate medium. Total Ca^{2+} content in cells was measured spectrophotometrically using arsenazo III.

It was found that in addition to IP_3-sensitive Ca^{2+}-channels and store-operated Ca^{2+} entry, 2-APB also inhibits SERCA of lacrimal gland secretory cells, causing decrease in the Ca^{2+} content in studied cells. And against the backdrop of Ca^{2+} pump inhibitors – thapsigargin and eosin *Y* – 2-APB (10 μM) did not alter the Ca^{2+} content in permeabilized secretory cells of studied glands. In addition, the effect of 2-APB depends on the Ca^{2+} concentration in the incubation medium. Decrease of Ca^{2+}-content in investigated cells under 2-APB influence was the most expressed in noncalcium media. In Ca^{2+}-containing medium effect 2-APB was less expressed due to the fact that store-operated Ca^{2+} entry partially neutralized the effect of 2-APB on SERCA.

Results of two-factor analysis of variance confirmed that Ca^{2+} content in studied cells was determined at 53,77% by the 2-APB concentration and at 32,47% – by Ca^{2+} concentration in the incubation medium.

IP_3-sensitive Ca^{2+} channels, SERCA and store-operated Ca^{2+} entry of the rat exorbital lacrimal gland secretory cells are inhibited by 2 APB.

Key words: 2-APB, IP_3-sensitive Ca^{2+} channels, Ca^{2+}-pumps, lacrimal gland.