

Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України
Львівський національний університет імені Івана Франка



В. В. Манько

**СИСТЕМИ ТРАНСПОРТУВАННЯ Ca^{2+}
У СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИНАХ
ЕКЗОКРИННИХ ЗАЛОЗ**

Монографія

Львів
2011

УДК 576.3 : 591.14 : 591.181
ББК 28.05+28.863.91+28.94
М 24

Рецензенти:

член-кореспондент НАН України, д-р біол. наук, проф. *Р. С. Стойка*
(Інститут біології клітини НАН України, Львів)
академік НАН України, д-р біол. наук, проф. *М. С. Веселовський*
(Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ)

*Друкується за ухвалою Вченої ради Львівського національного університету
імені Івана Франка (протокол № 25/2 від 23.02.2011)*

Манько В. В.

М24 Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз : монографія / В. В. Манько ; авт. передмови С. О. Костерін. – Львів : Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. – 271 с. – (Серія «Біологічні Студії»). – Бібліогр. : с. 239–271.

ISBN 978-966-613-752-7 (серія)
ISBN 978-966-613-828-9

Монографія охоплює найважливіші аспекти функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин екзокринних залоз різних тварин. Але головним її завданням є висвітлення тих досліджень Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця, які проводяться на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка вже понад 20 років. Зокрема, досить детально описані результати ідентифікації у досліджуваних секреторних клітинах потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів, Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму, Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій, $\text{I}\Phi_3$ -чутливих та ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів, P2Y- і P2X-рецепторів. Досить цікавим є опис властивостей Na^+ - Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани, наявність якого не є характерною ознакою секреторних клітин інших залоз. Це стосується його специфічності до одно- і двовалентних катіонів, встановлення механізму дії катіонів перехідних елементів, ролі SH-груп тощо. Важливим аспектом книги є аналіз особливостей взаємозв'язків між різними Ca^{2+} -транспортувальними системами. Спираючись на них, пропонується концепція Ca^{2+} -функціональних одиниць. Аналізуючи результати дослідження регуляції Ca^{2+} -транспортувальних систем кальмодуліном, автор пропонує читачам принцип «змішених фаз». Цікавими є також дані щодо ефективності регулювання Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин малоклітинних залоз цАМФ, цГМФ і NO. Завершується монографія концептуальною постуляцією трьох кальцієвих доменів (базального, апікального та ядерного) у досліджуваних клітинах, що дає змогу коректніше інтерпретувати отримані результати.

Для студентів-магістрів, які вивчають курс «Електрофізіологія секреторних клітин», для фізіологів, біофізиків, біохіміків, фахівців у галузі клітинної біології, а також для читачів, які цікавляться особливостями Ca^{2+} -сигналізації у різних клітинах.

УДК 576.3 : 591.14 : 591.181
ББК 28.05+28.863.91+28.94

ISBN 978-966-613-752-7 (серія)
ISBN 978-966-613-828-9

© Манько В. В., 2011
© Львівський національний університет
імені Івана Франка, 2011

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	7
ВСТУПНЕ СЛОВО	11
1. ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ТРАВНИХ ЗАЛОЗ	13
1.1. Різноманітність травних залоз	13
1.2. Механізм секреції травних ферментів і рідини	15
1.3. Електрофізіологічні властивості секреторних клітин травних залоз	18
1.3.1. Мембранний потенціал спокою секреторних клітин	18
1.3.2. Секреторний потенціал	22
2. Ca ²⁺ -СИГНАЛІЗАЦІЯ У СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИНАХ ТВАРИН	29
2.1. Ідентифікація Ca ²⁺ -транспортувальних систем	29
2.1.1. Загальне зауваження	29
2.1.2. Ca ²⁺ -транспортувальні системи плазматичної мембрани	30
2.1.2.1. Потенціалкеровані Ca ²⁺ -канали плазматичної мембрани	30
2.1.2.2. Рецепторкеровані Ca ²⁺ -канали плазматичної мембрани	32
2.1.2.3. Депокеровані Ca ²⁺ -канали	34
2.1.2.4. Na ⁺ -Ca ²⁺ -обмінник плазматичної мембрани	34
2.1.2.5. Ca ²⁺ -помпа плазматичної мембрани	35
2.1.3. Кальцієві депо секреторних клітин і їхні Ca ²⁺ -транспортувальні системи	36
2.1.3.1. IФ ₃ -чутливі Ca ²⁺ -канали	37
2.1.3.2. Ріанодинчутливі Ca ²⁺ -канали	38
2.1.3.3. Ca ²⁺ -помпа ендоплазматичного ретикулуму	40
2.1.3.4. Ca ²⁺ -транспортувальні системи мітохондрій	40
2.1.3.5. Ca ²⁺ -транспортувальні системи інших внутрішньоклітинних органел	41
2.2. Часові властивості Ca ²⁺ -сигналу	42
2.3. Роль просторової локалізації Ca ²⁺ -транспортувальних систем у Ca ²⁺ -сигналізації секреторних клітин	44
3. Ca ²⁺ -ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МАЛОКЛІТИННИХ ЕКЗОКРИННИХ ЗАЛОЗ КОМАХ	49
3.1. Ca ²⁺ -сигналізація секреторних клітин на прикладі малоклітинних слинних залоз м'ясної мухи	49
3.2. Ca ²⁺ -транспортувальні системи секреторних клітин слинних залоз личинки плодової мушки	51

4. СЛИННИ ЗАЛОЗИ ЛИЧИНКИ ДЗВІНЦЯ ЯК МОДЕЛЬНИЙ ОБ'ЄКТ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН	57
4.1. Будова та функції секреторних клітин	57
4.2. Електрофізіологічні властивості секреторних клітин	59
4.3. Адаптація методу внутрішньоклітинної перфузії	63
4.4. Реєстрація трансмембранних струмів	63
4.5. Дослідження процесів секреції та змін вмісту Ca^{2+} у тканині інтактних слинних залоз	65
4.6. Підбір умов пермеабілізації секреторних клітин	67
4.7. Реєстрація вмісту депонованого Ca^{2+} з використанням хлортетрацикліну для дослідження Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин	69
4.8. Розрахунок параметрів рівняння Хілла	73
5. ІДЕНТИФІКАЦІЯ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ <i>CHIRONOMUS PLUMOSUS</i>	79
5.1. Потенціалкеровані Ca^{2+} -канали плазматичної мембрани	79
5.1.1. Реєстрація трансмембранного потенціалкерованого Ca^{2+} -струму	79
5.1.2. Зміни вмісту Ca^{2+} у тканині інтактних залоз і секреції загального білка за умов гіперкалієвої деполяризації	80
5.1.3. Зміни вмісту депонованого Ca^{2+} як доказ функціонування потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів у плазматичній мембрані	88
5.2. Na^{+} - Ca^{2+} -обмін через плазматичну мембрану	89
5.2.1. Функціональне підтвердження	90
5.2.1.1. Залежність амплітуди потенціалкерованого Ca^{2+} -струму від натрієвого градієнта	90
5.2.1.2. Залежність вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і секреції ними білка від натрієвого та кальцієвого градієнтів	91
5.2.2. Ідентифікація струму Na^{+} - Ca^{2+} -обміну секреторних клітин	97
5.2.2.1. Залежність струму, спричиненого раптовою зміною мембранного потенціалу, від натрієвого градієнта	97
5.2.2.2. Залежність струму від кальцієвого електрохімічного градієнта	104
5.3. Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулу	109
5.3.1. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність тканини слинних залоз	109
5.3.2. Вплив блокаторів Ca^{2+} -помп на вміст Ca^{2+} у тканині залоз і на секрецію загального білка	113
5.4. Внутрішньоклітинні канали вивільнення Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз	115
5.4.1. $\text{I}\Phi_3$ -чутливі Ca^{2+} -канали	116
5.4.2. Ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали	120
5.5. Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій	124
5.6. Пуринові рецептори	128
5.6.1. Вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз за дії аденілових нуклеотидів	129

5.6.2. АТФ- і АДФ-спричинені зміни вмісту депонованого Ca^{2+} у секреторних клітинах.....	131
5.6.3. Вплив сураміну на нуклетидіндуковані зміни вмісту депонованого Ca^{2+} у секреторних клітинах.....	133
6. ХАРАКТЕРИСТИКА Na^+-Ca^{2+}-ОБМІНУ КРІЗЬ ПЛАЗМАТИЧНУ МЕМБРАНУ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ДЗВІНЦЯ.....	137
6.1. Залежність функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника від катіонного складу середовища	137
6.1.1. Специфічність обмінника до одновалентних катіонів	137
6.1.2. Спорідненість обмінника до двовалентних катіонів	139
6.1.3. Вплив катіонів перехідних металів на Na^+ - Ca^{2+} -обмін плазматичної мембрани клітин	144
6.2. Роль SH-груп у функціонуванні Na^+ - Ca^{2+} -обмінника секреторних клітин слинних залоз личинки <i>Chironomus plumosus</i>	151
6.2.1. Вплив парахлормеркурійбензоату і дитіотреїтолу на вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз і на секрецію ними загального білка	151
6.2.2. Вплив протекторів і блокаторів SH-груп на струм Na^+ - Ca^{2+} -обміну	155
6.3. Залежність Na^+ - Ca^{2+} -обміну від рН середовища	159
6.3.1. Зміни вхідного струму Na^+ - Ca^{2+} -обміну внаслідок закислення і залуження позаклітинного середовища	160
6.3.2. Залежність функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника у прямому режимі від рН внутрішньоклітинного розчину	163
7. ВЗАЄМОУЗГОДЖЕНІСТЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ Ca^{2+}-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ <i>CHIRONOMUS PLUMOSUS</i>	171
7.1. Особливості ультраструктурної організації секреторних клітин	171
7.2. Просторова організація функціонування іонтранспортувальних систем плазматичної мембрани	175
7.2.1. Залежність струму Na^+ - Ca^{2+} -обміну від функціонування Na^+ - K^+ -помпи	175
7.2.2. Залежність функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обміну від функціональної активності Ca^{2+} -помпи.....	179
7.3. Взаємоузгоджене функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем	181
7.3.1. Взаємодія між ріанодин- та $\text{I}\Phi_3$ -чутливими Ca^{2+} -каналами.....	181
7.3.3. Роль мітохондрій у Ca^{2+} -сигналізації секреторних клітин	184
7.4. Концепція Ca^{2+} -функціональних одиниць у застосуванні до секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця	188
7.4.1. Загальні теоретичні уявлення	188
7.4.2. Ендоплазматична Ca^{2+} -функціональна одиниця	190
7.4.3. Роль ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці у процесах трансдукції сигналу P2Y-рецепторів.....	193

7.4.4. Стан ендоплазматичної Ca^{2+} -функціональної одиниці за інкубування залоз у гіперкальцієвому середовищі	197
7.4.5. Ca^{2+} -функціональна одиниця плазматичної мембрани.....	198
7.4.6. Ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+} -функціональна одиниця.....	199
8. РОЛЬ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ СИГНАЛЬНИХ МОЛЕКУЛ У РЕГУЛЮВАННІ Ca^{2+}-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ ДЗВІНЦЯ	205
8.1. Регулювання кальмодуліном Ca^{2+} -транспортувальних систем плазматичної мембрани секреторних клітин	205
8.2. Регулювання кальмодуліном внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем	212
8.3. Внутрішньоклітинні Ca^{2+} -транспортувальні системи за дії циклічних нуклеотидів	218
8.3.1. Залежність функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем від рівня цАМФ у цитозолі.....	219
8.3.2. Спричинене цГМФ пригнічення внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем.....	224
8.4. NO та кальцієвий гомеостаз секреторних клітин	227
8.4.1. Вплив нітроприсуиду натрію на секрецію білка та вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз	227
8.4.2. NO-індуковані зміни вхідного і вихідного струмів Na^+ - Ca^{2+} -обміну	231
9. УЗАГАЛЬНЕННЯ	235
ЛІТЕРАТУРА	239

ПЕРЕДМОВА

Вивчення закономірностей регуляції концентрації іонізованого кальцію (Ca^{2+}) в цитоплазмі – нагальна проблема сучасної фізіології, біофізики та біохімії. Адже іонам Ca^{2+} належить фундаментальна роль у забезпеченні функціональної активності клітин практично всіх тканин, у тому числі й секреторної. Тому зазначена проблема є загальнобіологічною. Справді, на теперішній час не викликає жодних сумнівів, що Ca^{2+} є вкрай необхідним для передачі внутрішньоклітинних сигналів, здійснення електро- та фармакомеханічного спряження у м'язах, забезпечення синаптичної передачі, регуляції проникності біологічних мембран, активації певних ензимів, контролю клітин-клітинної взаємодії, стимуляції процесів росту, взаємодії антигенів з антитілами, згортання крові, а також для запуску процесу секреції. Відповідно, нагальним є дослідження іонних, молекулярних і мембранних механізмів підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, вивчення структурної організації, властивостей (кінетичних, каталітичних, енергетичних), особливостей регуляції та функціональної ролі окремих енергонезалежних та енергозалежних мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних систем.

Втім, проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу є вкрай важливою і в практичному сенсі. Адже наразі є вагомим підстави стверджувати, що виникнення різноманітних небезпечних патологій (гіпертензія, порушення скоротливої функції скелетних, гладеньких і серцевого м'язів, діабет, гіпоксія/ішемія, різноманітні нейропатії, пухлинний ріст тощо) суттєво пов'язане зі змінами у внутрішньоклітинному кальцієвому гомеостазі. Так, продемонстровано, що при деяких небезпечних патологічних станах можуть змінюватись експресія мембранозв'язаних білків, що забезпечують пасивний і активний транспорт іонів Ca^{2+} , а також суто властивості (зокрема, кінетичні) та особливості регуляції Ca^{2+} -транспортувальних систем. Саме тому систематичне та всебічне вивчення

мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних білків, відпрацювання методології пошуку нових селективних оборотних високоафінних ефекторів (інгібіторів, активаторів) систем транспортування іонів Ca^{2+} , дослідження механізмів дії зазначених речовин на трансмембранний кальцієвий обмін – це важливий етап у розробці сучасних фармакологічних підходів до лікування тяжких захворювань, пов'язаних із порушенням внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} .

Загалом же цілком очевидно, що проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу – це «перехресна» проблема, вирішення якої потребує залучення методів, гіпотез і теорій, притаманних різним наукам біологічного та медичного циклу.

Що ж стосується ідентифікації, властивостей і особливостей регуляції систем пасивного й активного транспортування іонів Ca^{2+} саме у секреторних клітинах, то треба підкреслити, що наші уявлення в цьому питанні все ще вельми обмежені. Безперечно, певний дефіцит відповідних важливих фундаментальних даних є суттєвою перешкодою на шляху до розробки фармакологічних препаратів з метою корекції секреторної функції за патологічних станів (зокрема, у випадку травних залоз). У зазначеному контексті маємо, як мінімум, три важливі проблеми:

- 1) потребують активного розвитку подальші дослідження із надійної ідентифікації окремих мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних систем у субклітинних мембранних структурах секреторних клітин;
- 2) необхідним є ґрунтовне вивчення властивостей цих систем (кінетичних, ензиматичних, енергетичних, їхньої чутливості до дії різноманітних фізико-хімічних факторів і ефекторів);
- 3) суттєвим є питання осягнення загальних принципів, що покладені в основу узгодженого ефекту, налаштованого на підтримання кальцієвого гомеостазу, зокрема, у секреторних клітинах, із урахуванням вельми своєрідної системи позитивних і негативних зворотних зв'язків (Ca^{2+} -залежна інактивація Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани, Ca^{2+} -індукований викид іонів Ca^{2+} із ендоплазматичного ретикулуму, функціонування циклоспоринчутливої мітохондріальної пори перехідної провідності тощо).

У цілому ж можна стверджувати, що кооперативні, нелінійні та неадитивні ефекти, які скоординовані й узгоджені у просторі та часі і є властивими феноменові внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, у тому числі і в секреторних клітинах, віддзеркалюють сукупне (я б сказав, навіть «концертне») суперпозиційне функціонування різних мембранозв'язаних систем активного (первинного, вторинного) та пасивного транспортування іонів Ca^{2+} .

Відповідно до вищезазначеного, монографія проф. В.В. Манька якраз і стосується нагальних питань внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу у секреторній тканині (на прикладі екзокринних залоз). Адже ця монографія присвячена комплексному висвітленню біофізичних і біохімічних механізмів, задіяних у регуляції концентрації вільного Ca^{2+} в секреторних клітинах. На сторінках монографії автор, перш за все, детально обговорює питання фізіології секреторних клітин травних залоз, а також висвітлює загальні аспекти кальцієвої сигналізації у секреторних клітинах ссавців. Ним описані Ca^{2+} -транспортувальні системи малоклітинних екзокринних залоз комах, значну увагу приділено слинним залозам личинки дзвінця як модельного об'єкта для дослідження Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин. На прикладі слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* акцентується увага на найважливішому, з моєї точки зору, питанні – експериментальній ідентифікації Ca^{2+} -транспортувальних систем (кальцієві канали, обмінники, помпи й уніпортери) мембран секреторних клітин. Зокрема, спеціальну увагу автор монографії акцентує на характеристиці антипортної системи вторинного активного транспортування іонів Ca^{2+} – Na^+ – Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани. Цікавим і своєрідним у наукових поглядах В.В. Манька є розділ монографії, у якому проаналізовані питання взаємоузгодженості функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин; мова йде про авторську концепцію так званих « Ca^{2+} -функціональних одиниць». І, нарешті, важливу частину монографії становить опис і аналіз фактичних даних щодо ролі внутрішньоклітинних сигнальних молекул у регулюванні функціональної активності Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин.

Хочу також звернути увагу читачів на таке.

Як бачимо, науковий зміст монографії стосується актуальних проблем фізіології та фізико-хімічної біології секреторних клітин, тобто проблем, котрі природно виникають «на перехресті» різноманітних наук і наукових напрямів – цитології, біомембранології, біохімії, біофізики клітини, фармакології, а також біонеорганічної та фізичної хімії. Тому я думаю, що книжка, безперечно, приверне до себе увагу і фізіологів, і біофізиків та біохіміків, узагалі – фахівців у галузі клітинної біології, як з точки зору наочної наукової актуальності проблеми, так і у зв'язку з оригінальним фактичним експериментальним матеріалом, який одержав автор.

Окрім того, без сумніву, ця монографія ілюструє можливості й перспективність саме комплексного використання різних експериментальних методів (світлової та електронної мікроскопії, електро-

фізіології, біохімічної мембранології, аналітичної біохімії, біофізичної хімії, ензимології, залучення флуоресцентних зондів, а також методології хімічної та біохімічної кінетики) до вивчення мембранних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу у секреторній тканині. Така «комплексність» цілком задовольняє тенденції розвитку сучасного природознавства взагалі, а в даному конкретному випадку – прогрес досліджень у галузі фізико-хімічної біології секреторних клітин.

І, нарешті, хочу відзначити, що монографія добре ілюстрована, містить велику кількість наочних рисунків, іншого експозиційного матеріалу. Власне, одна із характеристик книги – це хороший рівень графічної інтерпретації експериментальних даних, які обговорюються.

Можна стверджувати, що монографія В.В. Манька має всі ознаки фундаментальної праці, адже на її сторінках автор намагається систематично, ґрунтовно та всебічно (текст роботи включає посилання на понад 600 фахових друків) охарактеризувати сучасний стан проблеми шляхів і механізмів мембранного транспортування іонів Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз. На мою думку, авторові це вдалося.

Маю всі підстави сподіватися, що монографія В.В. Манька, безперечно, буде корисною для фізіологів, біохіміків, біофізиків, фахівців у галузі біофізичної хімії, у фокусі наукової уваги котрих перебуває проблема трансмембранного обміну іонів Ca^{2+} , зокрема у секреторних клітинах. Адже вихід у світ цієї книги знаменує собою ще один крок на шляху нашого пізнання суті такого унікального загальнобіологічного феномену, як внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація.

С. О. КОСТЕРІН

д-р біол. наук, професор,

чл.-кор. НАН України,

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України