УДК 612.014.3:57.015.6:57.053

ЕНДОПЛАЗМАТИЧНО-МІТОХОНДРІАЛЬНА Ca^{2+}-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОДИНИЦЯ: ЗАЛЕЖНІСТЬ ДИХАННЯ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ВІД АКТИВНОСТІ РІАНОДИН- ТА $ІФ_3$-ЧУТЛИВИХ Ca^{2+}-КАНАЛІВ

О. Ю. ВЕЛИКОПОЛЬСЬКА, Б. О. МАНЬКО, В. В. МАНЬКО

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: vvmanko@franko.lviv.ua

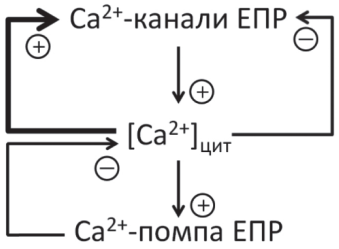
Досліджено залежність функціонування мітохондрій від активності каналів вивільнення Ca^{2+} з використанням полярографічної реєстрації утилізації O_2 (за допомогою кисневого електрода Кларка) суспензією слинних залоз личинки Chironomus plumosus L. (комара-дергуна, або дзвінця). Щоб забезпечити проникнення екзогенних субстратів дихального ланцюга, клітини піддавали АТР-пермеабілізації. Встановлено, що сама по собі активація P2X-рецепторів (як і P2Y-рецепторів) плазматичної мембрани екзогенним ATP чи ADP не змінює ендогенного дихання суспензії слинних залоз. Тобто на функціональну активність мітохондрій не впливає надходження Ca^{2+} із позаклітинного середовища, хоча самі мітохондрії розміщені вздовж базальної частини плазматичної мембрани. Активація ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів інтенсифікує ендогенне і стимульоване сумішшю пірувату і малату дихання, але не сукцинатстимульоване дихання. Ні активація $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів (опосередковано через активацію P2Y-рецепторів), ні їх інгібування не змінюють ендогенного дихання. Проте інгібування $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів за допомогою 2-аміноетоксифенілборату інтенсифікує сукцинатстимульоване дихання. Наведені факти свідчать, що вивільнений із внутрішньоклітинного депо через канали Ca^{2+} змінює функціональну активність мітохондрій, і беззастережно підтверджують наявність ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця. У стані спокою ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці спостерігається спонтанна активність $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів ендоплазматичного ретикулума, вивільнюваний ними Ca^{2+} акумулюється уніпортером у мітохондріях і модулює окисні процеси. Активація ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів спричиняє перехід ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці у стан активності, необхідний для інтенсифікації клітинного дихання та окисного фосфорилювання. Передбачається, що перехід ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці у стан інактивації (пригнічення каналів вивільнення Ca^{2+} за надмірної його концентрації в цитозолі) обмежує тривалість процесів трансдукції сигналу в часі, має захисний характер і перешкоджає розвитку апоптичних процесів у клітинах.

Ключові слова: клітинне дихання, мітохондрії, Ca^{2+}-транспортувальні системи, ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали (ріанодинові рецептори), $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали ($ІФ_3$-рецептори), P2X- і P2Y-рецептори, ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+}-функціональна одиниця.

Мітохондрії відіграють важливу роль у Ca^{2+}-сигналізації багатьох типів клітин, у тому числі і секреторних. Причому, ця роль не обмежується лише дихальною функцією і синтезом АТР. Важливе значення мітохондрії відіграють у генеруванні Ca^{2+}-сигналів. Зокрема, поширення Ca^{2+}-сигналів з апікального полюса вглибину секреторної клітини підшлункової залози обмежується власне мітохондріями, що оточують цей полюс, оскільки вони здатні поглинати Ca^{2+} та зупиняти його дифузію в цитозоль [1]. Вважається, що активація акумулювання мітохондріями Ca^{2+} є результатом тісного контакту між ними і ендоплазматичним ретикулумом (ЕПР) [2, 3]. Для того, щоб пояснити здатність мітохондрій акумулювати Ca^{2+} за низької загальної його концентрації в цитозолі, запропоновано концепцію Ca^{2+}-мікродоменів [4, 5]: надходження Ca^{2+} ззовні чи вивільнення його з депо створює біля устя відповідного Ca^{2+}-каналу локальні домени (hotspots, тобто «гарячі точки») з високою концентрацією Ca^{2+} (20 мкМ і більше). Концентрація Ca^{2+} у цих «гарячих точках» є достатньою для активації його акумулювання

низькоафінною Ca^{2+}-транспортувальною системою сусідньої мітохондрії.

Але ця концепція не може пояснити всі аспекти взаємодії між системами активного і пасивного транспортування Ca^{2+}. Для пояснення зв'язку між різними Ca^{2+}-транспортувальними системами однієї органели (чи Ca^{2+}-транспортувальними системами різних органел) було запропоновано концепцію Ca^{2+}-функціональних одиниць [6]. Вона базується на загально визнаних положеннях: а) розташування Ca^{2+}-транспортувальних систем у секреторній клітині не є випадковим, а зумовлене фізіологічною доцільністю; б) генерування Ca^{2+}-хвиль неможливе без узгодженості функціонування різних Ca^{2+}-транспортувальних систем, які належать різним клітинним мембранам; в) Ca^{2+}-транспортувальні системи не дублюють одна одну, їх функціонування є взаємодоповнюючим; г) функціонування різних Ca^{2+}-транспортувальних систем є взаємозалежним за рахунок позитивних прямих і негативних зворотних зв'язків між ними. Ці зв'язки значною мірою реалізуються через зміну локальної $[Ca^{2+}]$ біля устя Ca^{2+}-каналу (локальних кальцієвих мікродоменів), оскільки функціонування багатьох Ca^{2+}-транспортувальних систем також є Ca^{2+}-залежним процесом. Зокрема, вивільнений із депо Ca^{2+} у низьких концентраціях активує не лише Ca^{2+}-помпу ЕПР (позитивний прямий зв'язок), а й ріанодин- та $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, які відомі також як ріанодинові та $ІФ_3$-рецептори (позитивний зворотний зв'язок), а у високих – навпаки, інактивує ці Ca^{2+}-транспортувальні системи (негативний зворотний зв'язок):



Причому, прямі зв'язки є організуючими, забезпечують унітарність системи, за рахунок чого досягається транзієнтність Ca^{2+}-сигналу, а не статичне зростання цитозольної $[Ca^{2+}]$. Зворотні позитивні зв'язки спрямовані на подальше підвищення цитозольної $[Ca^{2+}]$, забезпечуючи підсилення Ca^{2+}-сигналу за низького, порогового, рівня первинних чи вторинних агоністів. Негативні зворотні зв'язки, навпаки, самообмежують розвиток Ca^{2+}-сигналу в часі і просторі, чим: а) забезпечують постійну чутливість системи на високому рівні; б) захищають систему від перевантаження Ca^{2+}.

Оскільки прямі та зворотні зв'язки між Ca^{2+}-транспортувальними системами обмежені у просторі та часі, ми дійшли висновку, що у клітині формуються ансамблі – Ca^{2+}-функціональні одиниці з принципово новими властивостями і новими функціями, виконати які неможливо, якщо виходити з властивостей їх окремих складових частин. Обов'язковою умовою формування Ca^{2+}-функціональної одиниці є входження до її складу систем пасивного і активного транспортування Ca^{2+} та мембрани, що забезпечує компартменталізацію цих катіонів.

Аналізуючи зміни сумарного вмісту Ca^{2+} у тканині та вмісту Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо за дії різних чинників, ми з'ясували, що у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. (комара-дергуна, або дзвінця) функціонування ріанодинчутливих і $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів ЕПР та Ca^{2+}-уніпортера мітохондрій залежить одне від одного [7]. Це і дозволило об'єднати ці структури в ендоплазматично-мітохондріальну Ca^{2+}-функціональну одиницю [6]. Але концепція Ca^{2+}-функціональних одиниць ще не отримала достатнього експериментального підтвердження. Актуальною є і проблема виявлення інших чинників, які можуть забезпечити прямий чи зворотний зв'язок між окремими складовими частинами Ca^{2+}-функціональної одиниці.

Властиво, для експериментального обґрунтування наявності ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці ми дослідили залежність рівня окисних процесів у мітохондріях від активності Ca^{2+}-транспортувальних систем, що входять до цієї одиниці.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця *Chironomus plumosus* L. Залози препарували за допомогою мікрохірургічних інструментів під бінокулярним мікроскопом МБС-9 у краплині вихідного позаклітинного розчину.

Швидкість поглинання кисню визначали полярографічним методом, що базується на реєстрації електрохімічного відновлення на катоді фізично розчиненого кисню при накладенні потенціалу 0,6–0,7 В:

$O_2 + 2{\cdot}H^+ + 2{\cdot}e^- = H_2O_2$,
$H_2O_2 + 2{\cdot}H^+ + 2{\cdot}e^- = 2{\cdot}H_2O$.

Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі закритого електрода Кларка, полярографа YSI 5300, потенціометра КСП-4, магнітної мішалки та скляної термостатованої комірки об'ємом 1,6 мл. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл водного розчину розчинено 240 пмоль O_2 [8].

Клітинне дихання є інтегральним показником, за інтенсивністю якого можна оцінювати функціональний стан мітохондрій. Найпоширенішим методом дослідження процесів дихання є поглинання кисню ізольованими мітохондріями за Чансом та Вільямсом [9]. Але при цьому втрачаються структурно-функціональні зв'язки ізольованих мітохондрій з іншими органелами, тому дослідження ізольованих мітохондрій не відображають їхнього стану *in vivo*. Це ускладнює встановлення залежності Ca^{2+}-сигналізації від ступеня енергізації мітохондрій. Тому ми застосували новий метод, за яким у полярографічну комірку вносили 30 інтактних слинних залоз у вихідному позаклітинному розчині. Для пермеабілізації плазматичної мембрани використовували дигітонін (100 мкг/мл) або активували P2X-рецептори за допомогою ATP чи ADP у концентрації 100 мкМ. Клітинне дихання реєстрували за окислення ендогенних субстратів і за стимуляції сукцинатом (0,35 мМ) або сумішшю піровату (5 мМ) і малату (5 мМ) при температурі 25 °С.

Функціонування Ca^{2+}-транспортувальних систем секреторних клітин оцінювали за зміною вмісту депонованого Ca^{2+} [10]. Ізольовані залози інкубували протягом 15 хв у відповідних розчинах, що містили хлортетрациклін (10 мкМ). Після відмивання залоз від барвника вихідним позаклітинним розчином визначали інтенсивність флуоресценції за довжини збуджуючого світла ($\lambda_{збуд}$) 380 нм. Флуоресценцію реєстрували за $\lambda_ф$ 480–530 нм, використовуючи мікроскоп ЛЮМАМ-И1 (Росія), за збільшення 10×15 з діаметром щілини 0,1 мм. Вміст депонованого Ca^{2+} виражали в умовних одиницях (у.о.), оскільки флуоресценція Ca^{2+}-хлортетрациклінового комплексу реєструється лише за умови гідрофобності середовища навколо цього комплексу, і калібрування сигналу в таких складних системах, якими є інтактні клітини, практично неможливе.

Вихідний позаклітинний розчин мав такий склад, мМ: NaCl – 136,90, KCl – 5,36, $CaCl_2$ – 1,76, Na_2HPO_4 – 0,35, KH_2PO_4 – 0,44, $MgCl_2$ – 0,95, глюкоза – 5,55; pH 7,2. У деяких експериментах ми створювали номінально безкальцієве середовище, не додаючи Ca^{2+}. За пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном використовували розчин (мМ): KCl – 130, NaCl – 16, $MgCl_2$ – 2, KH_2PO_4 – 1, HEPES – 10, ЕГТА – 0,5; pH 7,0. Для встановлення ступеня пермеабілізації дигітоніном залози обробляли трипановим синім (0,2 мг/мл). Для активації ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів використовували ріанодин (10 нМ), для блокування $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів застосовували високоселективний блокатор цих каналів – 2-аміноетоксифенілборат (2-АФБ) – у концентрації 10 мкМ.

У дослідах використовували такі реактиви: $CaCl_2$, HEPES, сукцинат, малат, піруват натрію, ADP, 2-аміноетоксидифенілборат, хлортетрациклін (Sigma-Aldrich, США), NaCl, KCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $MgCl_2$, глюкоза (Альфарус, Україна), ATP (AppliChem, Німеччина), дигітонін («Fisher scientific», США), ріанодин (Calbiochem, Канада), ЕГТА (Acros Organics, Бельгія).

Необхідні статистичні обчислення проводили з використанням програмного пакета Microsoft Office Excel, вірогідність різниці між двома статистичними групами встановлювали за Стьюдентом [11].

Результати та обговорення

Особливості мітохондріального дихання секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця in situ. Досліджувати вплив активності ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці на клітинне дихання можливо лише за збереження інтактності внутрішньоклітинних органел. Для максимального наближення умов досліду до фізіологічних ми застосували метод реєстрації мітохондріального дихання *in situ*, що був апробований на м'язових клітинах [12], гепатоцитах [13], панкреацитах [14] і клітинах мишачої лімфоми NK/Ly [15]. Для цього необхідно забезпечити вільне проникнення через плазматичну мембрану субстратів окислення та інших речовин, у нормі непроникних через неї. Тому одним із наших завдань було підібрати найоптимальніший спосіб пермеабілізації плазматичної мембрани секреторних клітин дзвінця, використавши неіонний детергент дигітонін або активувавши P2X-рецептори за допомогою ATP чи ADP [16].

Серед відомих способів пермеабілізації найпоширенішим і загальновизнаним є, ма-

буть, застосування дигітоніну. Він спричиняє виникнення пор у плазматичній мембрані, утворюючи із холестеролом нерозчинні комплекси [17]. Вміст холестеролу в плазматичній мембрані на кілька порядків вищий, ніж у внутрішньоклітинних мембранах. Тому вважають, що дигітонін відносно селективно діє саме на плазматичну мембрану і не порушує цілісності інших мембран клітини [18, 19].

Після додавання до середовища дигітоніну в концентрації 20 мгк/мл (оптимальна концентрація для гепатоцитів [13]) секреторні клітини слинних залоз личинки дзвінця не зафарбовуються трипановим синім. Дихання таких клітин погано або взагалі не стимулюється сукцинатом чи ADP, що вказує на цілісність плазматичної мембрани. Це може бути зумовлене тим, що ззовні залоза вкрита товстою і пружною базальною мембраною завтовшки від 60 до 300 нм [7], яка обмежує доступ різних речовин (у т.ч. дигітоніну) до плазматичної мембрани. Коли концентрацію дигітоніну збільшили до 100 мкг/мл, усі секреторні клітини слинних залоз личинки дзвінця зафарбовувалися трипановим синім. Швидкість дихання таких клітин становить 0,49 ± 0,08 нг-ат. О/(хв×залозу). Після додавання у полярографічну комірку сукцинату вона зростає на 64,00 ± 8,54% ($P \le 0,05$, $n = 4$; рис. 1, *В*). Додавання ж ADP (0,75 мМ) інтенсифікує дихання внаслідок стимуляції окисного фосфорилювання ще на 28,06 ± 7,51% ($P \le 0,001$, $n = 4$). Ці дані підтверджують, з одного боку, високу проникність обробленої дигітоніном плазматичної мембрани досліджуваних клітин для субстратів окислення і ADP та свідчать про інтактність мітохондрій в цих умовах. І оскільки сукцинат та ADP аналогічно діють на дихання суспензії ізольованих мітохондрій різних тканин теплокровних тварин [9, 20], ми вважаємо, що метод реєстрації мітохондріального дихання *in situ* є адекватним для дослідження мітохондріальних окисних процесів секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця, як це було показано і для інших клітин [12–15].

Проте пермеабілізація дигітоніном має і свої обмеження у використанні. Так, за цих умов пермеабілізація є постійною і незворотною, а пори мають такі розміри, що із клітин вимиваються не лише іони та низькомолекулярні сполуки, а й цитозольні протеїни. Крім того, існує певний ризик ушкодження мембран внутрішньоклітинних органел [21, 22]. Тому доцільно було, на нашу думку, перевірити можливість використання для стимуляції клітинного дихання екзогенними субстратами пермеабілізації плазматичної мембрани клітин за допомогою екзогенних пуринів.

Позаклітинні сполуки аденіну (аденозин, ADP та ATP) є важливими сигнальними молекулами, що запускають різноманітні клітинні відповіді через активування іонотропних P2X-рецепторів та метаботропних (зв'язаних, здебільше, з Gq-протеїнами плазматичної мембрани) P2Y-рецепторів [23].

P2X-рецептори є досить поширеними у секреторних і протокових клітинах екзокринних залоз. Доведено, зокрема, експресію P2X4- та P2X7-рецепторів в ацинарних клітинах привушних слинних залоз [24]. Є функціональні підтвердження наявності P2X4-рецепторів в ацинарних клітинах підщелепних залоз [25]; ідентифіковано P2X7-рецептори в клітинах проток цих залоз [26] та P2X4- та P2X7-рецептори – в клітинах проток підшлункової залози [27]. Попередніми дослідженнями на підставі аналізу ATP- і ADP-індукованих змін вмісту депонованого Ca^{2+} в секреторних клітинах слинних залоз личинок *Chironomus plumosus* теж показано наявність P2X- і P2Y-рецепторів [10, 16].

Відомо, що за тривалої (10–60 с) дії агоністів деякі P2X-рецептори (наприклад, P2X7-рецептори ссавців) з катіонного каналу перетворюються на неселективну пору, проникну для сполук із Мм до 900 Да [28, 29]. Цілком можливо, що і P2X-рецептори плазматичної мембрани досліджуваних клітин мають таку властивість. Щоб перевірити це припущення, було досліджено вплив позаклітинних нуклеотидів на дихання суспензії залоз. Відомо, що субстрат циклу трикарбонових кислот – сукцинат (Мм 118,09 Да) – непроникний крізь плазматичну мембрану інтактних клітин (як це показано для гепатоцитів [30]).

Встановлено, що внаслідок додавання у полярографічну комірку сукцинату інтенсивність дихання порівняно з інтактними слинними залозами не змінюється (рис. 1, *Б* та рис. 2, *Б*; $n = 5$) і становить як і в контролі 0,69 ± 0,05 нг-ат. О/(хв×залозу). Тобто за таких умов плазматична мембрана досліджуваних клітин непроникна для сукцинату. Крім того, додавання у комірку лише ATP також не приводить до змін швидкості поглинання кисню у всіх випадках ($n = 5$; рис. 2, *А*). Але за одночасної наявності в середовищі ATP і сукцинату поглинання кисню істотно підсилюється (рис. 1, *А* і *Б*). Причому ступінь підсилення не залежить від послідовності внесення цих речовин у середовище. Так, додавання сукцинату за

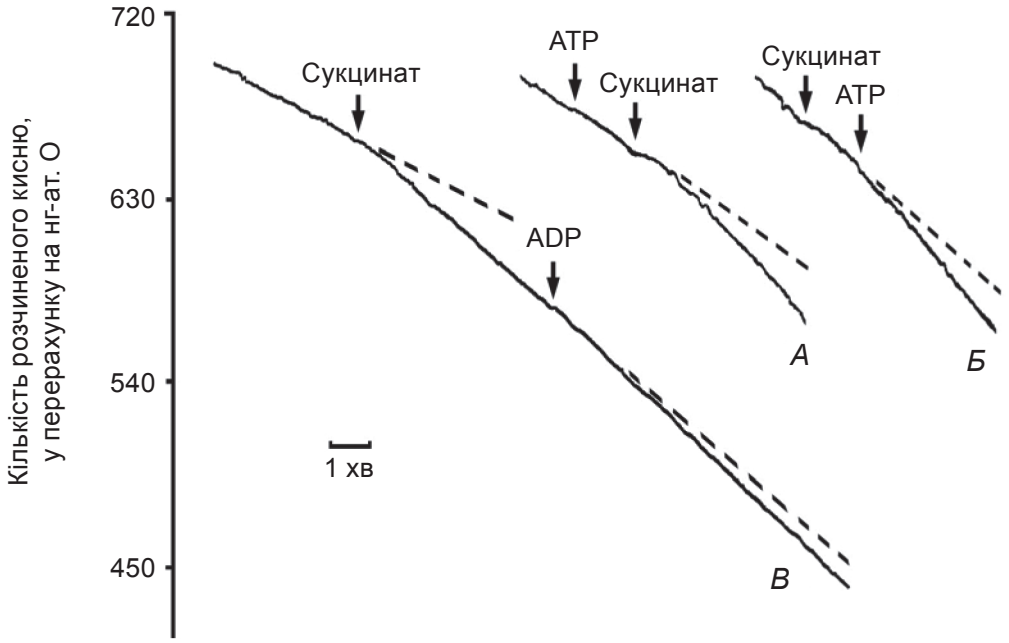


Рис. 1. Оригінальні записи поглинання кисню суспензією ізольованих слинних залоз личинки дзвінця: А і Б – записи дихання цілісних клітин до і після активації Р2-рецепторів плазматичної мембрани ([АТР] = 100 мкМ, [сукцинат] = 0,35 мМ, $[Ca^{2+}]_e$ = 1,76 мМ); В – дихання після преінкубації залоз із дигітоніном, стимульоване сукцинатом і активацією окисного фосфорилювання ([дигітонін] = 100 мкМ, [сукцинат] = 0,35 мМ, [ADP] = 750 мкМ, $[Ca^{2+}]_e$ = 0 мМ); у полярографічній комірці 30 залоз, t = 25 °С

наявності АТР у середовищі стимулює дихання на 40,72 ± 4,88% ($P \le 0,01$, $n = 5$; рис. 2, *А*). Внесення ж у комірку АТР за наявності сукцинату спричиняє збільшення швидкості дихання на 32,57 ± 4,21% ($P \le 0,001$, $n = 5$; рис. 2, *Б*). Статистично вірогідної різниці між цими величинами немає ($P = 0,241$).

Аналогічний ефект активації дихання спостерігається і за використання для пермеабілізації плазматичної мембрани ADP. Правда, у цьому разі стимуляція дихання є менш вираженою: ADP після сукцинату інтенсифікує поглинання кисню на 22,03 ± 2,25% ($P \le 0,01$, $n = 5$), а сукцинат на тлі ADP – лише на 18,31 ± 2,24% ($P \le 0,01$, $n = 5$).

Одержані результати підтверджують наявність у плазматичній мембрані секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця Р2Х-рецепторів. На підставі аналізу вмісту сумарного та депонованого Ca^{2+} раніше нами було встановлено, що у секреторних клітинах досліджуваних залоз наявні не лише Р2Y-, а й Р2Х-рецептори [16, 31]. Активація Р2Х-рецепторів за високого рівня Ca^{2+} у позаклітинному середовищі спричиняє його надходження у клітину і, як наслідок, збільшення вмісту депонованого Ca^{2+}. Причому сурамін, інгібітор Р2-рецепторів, повністю запобігає цьому АТР-індукованому збільшенню вмісту депонованого Ca^{2+} [31].

На підставі аналізу дихання секреторних клітин ми дійшли висновку, що у разі активації Р2Х-рецепторів крізь плазматичну мембрану проникають не лише іони, а й низькомолекулярні сполуки. Це дозволяє використовувати сполуки аденіну для пермеабілізації плазматичної мембрани, що необхідно для забезпечення транспортування екзогенних субстратів циклу Кребса в клітини.

АТР-пермеабілізація плазматичної мембрани є досить відомим методом [32–35]. Її перевагою є відсутність ушкодження не лише внутрішньоклітинних органел, а й плазматичної мембрани. Вона відбувається в реальному часі досліду і не потребує преінкубації, що суттєво, оскільки це дає змогу досліджувати швидкі і короткотривалі процеси регуляції клітинного дихання.

Крім того, можна зробити висновок, що сама по собі активація Р2Х-рецепторів (як і Р2Y-рецепторів) плазматичної мембрани не змінює ендогенного дихання цих клітин (принаймні протягом перших 5 хв інкубації суспензії слинних залоз з АТР чи ADP). Тобто надходження Ca^{2+} із позаклітинного сере-

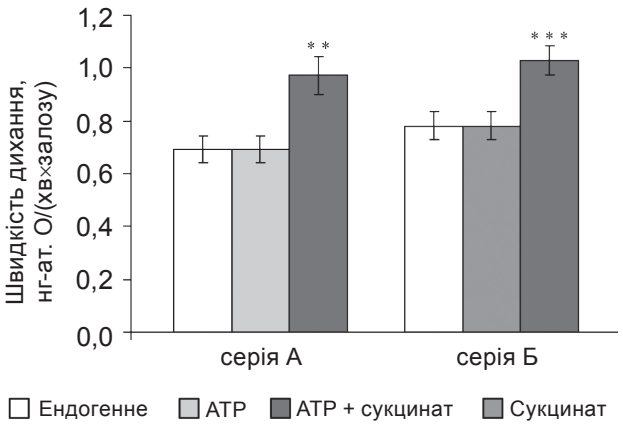


*Рис. 2. Дихання суспензії ізольованих слинних залоз личинки дзвінця після пермеабілізації плазматичної мембрани секреторних клітин за допомогою АТР: А – АТР вносили перед сукцинатом; Б – першим вносили сукцинат, а потім АТР; [АТР] = 100 мкМ, [сукцинат] = 0,35 мМ, $[Ca^{2+}]_e$ = 1,76 мМ; ** різниця щодо ендогенного дихання статистично вірогідна з $P \le 0,01$, ***$P \le 0,001$; $n = 5$*

довища внаслідок активації P2X-рецепторів [16, 31] не впливає на функціональну активність мітохондрій, хоча основна кількість мітохондрій розміщена біля базальної частини плазматичної мембрани [7].

Відсутність змін ендогенного дихання за активації P2X-рецепторів є свідченням відсутності (у часових рамках експерименту) і апоптичних змін у досліджуваних клітинах. Хоча відомо, що апоптоз може виникати за тривалої дії позаклітинного АТР опосередковано через активацію P2-рецепторів і підвищення цитозольного рівня Ca^{2+} [36]. Щоправда, у цьому разі а) діюча концентрація АТР є дещо більшою (1–3 мМ), ніж ми використовували, б) апоптичні зміни реєструвалися після індукції через 18 год і в) у клітинах, які характеризуються високою проліферативною активністю. На відміну від секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus,* які є досить стабільними – їх кількість не змінюється практично протягом усього життя личинки від вилуплення, і лише під час метаморфозу комах залоза зазнає дегенерації [37]. Цілком можливо, що ми досліджували ті процеси мітохондріального дихання, які одночасно перебігають із запуском процесів апоптозу. Чи встановлені особливості мітохондріального дихання мають значення для ініціації апоптозу – окреме питання, яке потребує спеціального дослідження.

Сукцинат на тлі АТР сильніше стимулює дихання секреторних клітин, ніж на тлі ADP, а різниця між ефектом АТР і ADP виявляється статистично вірогідною ($P \le 0,001$, $n = 10$). Це може свідчити про більшу чутливість P2X-рецепторів досліджуваних клітин до АТР, ніж до ADP, що загалом характерно для P2X-рецепторів ссавців [28]. Тому в подальших дослідженнях ми використовували АТР для пермеабілізації плазматичної мембрани.

Вплив активації ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів на дихання секреторних клітин. Ріанодин за різних концентрацій може як активувати ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали, так й інгібувати їх [38]. На підставі аналізу вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз дзвінця, секреторні клітини яких були пермеабілізовані сапоніном, показано, що за низьких концентрацій (5 нМ) ріанодин активує ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали, тоді як за високих (500 нМ) – пригнічує [39]. Додавання ріанодину в концентрації 5 нМ до середовища інкубування інтактних залоз не спричинює статистично вірогідних змін депонованого Ca^{2+} в секреторних клітинах ($n = 7$, $P \ge 0,05$; рис. 3). Лише за концентрації ріанодину 10 нМ вміст депонованого Ca^{2+} зменшується на 27,47 ± 2,61% ($P \le 0,01$, $n = 8$). Збільшення ж концентрації ріанодину до 500 нМ спричинює збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} на 30,66 ± 6,51% ($P \le 0,001$, $n = 8$).

Отже, для інтактних секреторних клітин слинної залози дзвінця концентрація ріанодину, за якої активуються ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали, становить 10 нМ; у концентрації 500 нМ ріанодин інгібує ці канали. Тому в наступних дослідженнях ми використовували для активації ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ріанодин у концентрації 10 нМ.

На сьогодні отримано серйозні підтвердження наявності структурних і функціональних взаємозв'язків мітохондрій з ЕПР, які модулюються Ca^{2+} і АТР (див. [5]). Відомо, що за генерації цитозольних Ca^{2+}-сигналів Ca^{2+} транспортується в мітохондрії [40], що супроводжується активацією Ca^{2+}-залежних ензимів циклу трикарбонових кислот (піруватдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази і α-кетоглутаратдегідрогенази [41]), підвищенням рівня NADH [42], інтенсифікацією процесів дихання і окисного фосфорилювання [43], а отже – посиленням синтезу АТР [44]. У свою чергу, АТР як сигнальна молекула регулює функціонування Ca^{2+}-транспортувальних систем, зокрема $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів [45], ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів [46]. Активність Ca^{2+}-помпи ЕПР регулюється

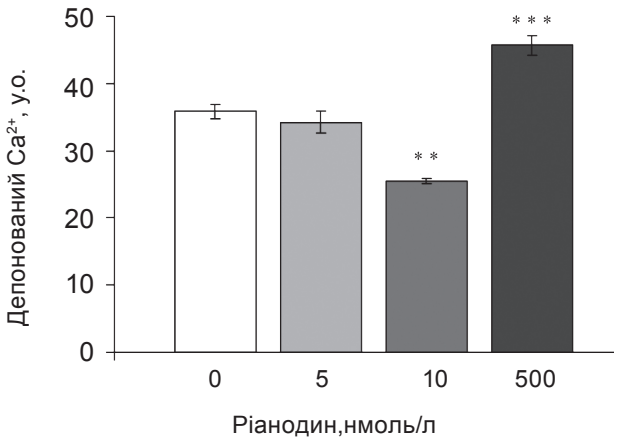


*Рис. 3. Вплив ріанодину на вміст депонованого Ca^{2+} в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця, інкубованих у номінально безкальцієвому середовищі: $[Ca^{2+}]_e$ = 0 мМ; ** різниця порівняно з контролем вірогідна з $P \le 0,01$, *** $P \le 0,001$; $n = 7–8$*

концентрацією цитозольного АТР в діапазоні 0,01–3 мМ [47]. Описані вище двосторонні зв'язки між Ca^{2+}-транспортувальними системами ЕПР і мітохондрій дозволяє нам постулювати наявність ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці не лише в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця, а й в інших клітинах.

До складу ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці входять, крім $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів ЕПР та Ca^{2+}-уніпортера мітохондрій, ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали [6]. Їх головна функція, очевидно, зводиться до тригерного підсилення (збільшення амплітуди) Ca^{2+}-сигналу за рахунок масованого вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума. Тому першочерговим нашим завданням було встановити, чи впливає активація ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів на окисні процеси в мітохондріях секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця.

З'ясувалося, що преінкубація суспензії слинних залоз дзвінця з ріанодином у зазначеній концентрації збільшує швидкість ендогенного дихання секреторних клітин порівняно з контролем на 29,11 ± 6,86% в одній серії дослідів або на 34,08 ± 2,04% – в іншій ($P \le 0,001$, $n = 5–6$; рис. 4) внаслідок, очевидно, вивільнення Ca^{2+} з ЕПР і його транспортування в мітохондрії. За преінкубації залоз із ріанодином сукцинат стимулює дихання на 9,64 ± 1,61% ($P \le 0,01$, $n = 5$; рис. 4), тобто практично до того самого рівня, що і в контролі. Отже, катіони Ca^{2+}, вивільнені ріанодинчутливими Ca^{2+}-каналами з ЕПР і акумульовані в мітохондріях, не стимулюють окислення сукцинату.

Додавання до середовища інкубації пермеабілізованих клітин суміші пірувату і малату дозволяє активувати всі ензими циклу Кребса, у т.ч. Ca^{2+}-залежні. Внесення цієї суміші в полярографічну комірку призводить до інтенсифікації швидкості поглинання кисню АТР-пермеабілізованими клітинами в контролі на 40,05 ± 2,60 % ($P \le 0,001$,

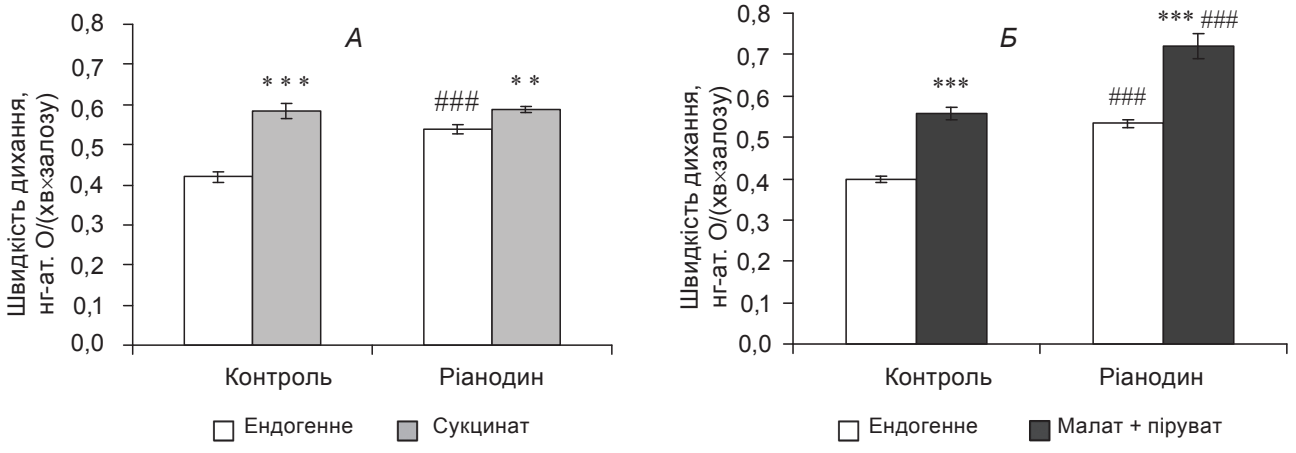


*Рис. 4. Вплив ріанодину на швидкість ендогенного і стимульованого сукцинатом (А) та сумішшю малату і пірувату (Б) дихання секреторних клітин слинних залоз дзвінця: [ріанодин] = 10 нМ, [АТР] = 100 мкМ, [сукцинат] = 0,35 мМ, [малат] = 5 мМ, [піруват] = 5 мМ; $[Ca^{2+}]_e$ = 1,76 мМ; ** статистично вірогідна різниця щодо ендогенного дихання з $P \le 0,01$, ***$P \le 0,001$; ### різниця порівняно з контролем вірогідна з $P \le 0,001$; $n = 5–6$*

$n = 6$). Попередня інкубація слинних залоз з ріанодином підвищує швидкість дихання за присутності в середовиші пірувату і малату ще на 29,15 ± 3,57% ($P \le 0{,}001$, $n = 6$).

Ріанодин, активуючи вивільнення Ca^{2+} з ЕПР, збільшує швидкість малат- і піруватстимульованого дихання АТР-пермеабілізованих клітин, істотно підвищуючи потенційно можливий рівень окислення субстратів у циклі Кребса. За цих умов активуються Ca^{2+}-залежні дегідрогенази матриксу мітохондрій, оскільки вони каталізують початкові реакції циклу Кребса. Сукцинатдегідрогеназа не є Ca^{2+}-залежною, тому закономірно, що ріанодин не впливає на сукцинатстимульоване дихання. Отже, за активації ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці підсилюються окисні процеси в мітохондріях.

Залежність дихання від активності $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів. Крім ріанодинчутливих, важливу роль у Ca^{2+}-сигналізації секреторних клітин відіграють $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали [48]. Вони здебільшого ініціюють генерацію Ca^{2+}-сигналу. Існують функціональні докази наявності $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів у секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця [39]. Вони, як і ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали та Ca^{2+}-уніпортер, входять до складу ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці [6].

У досліджуваних клітинах $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали лежать в основі механізму трансдукції сигналу за активації пуринових P2Y-рецепторів із більшою спорідненістю до АТР, ніж до ADP ($P2Y_{АТР}$-рецепторів) [10, 23]. Як виявилось, активація цих рецепторів за дії АТР не змінює ендогенне дихання слинних залоз (рис. 1–2). Тому можна дійти висновку, що Ca^{2+}, вивільнений через $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, не впливає на стан ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці. Проте рівень спонтанної активності, яку виявляють $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, може бути досить високим [49]. Тому, цілком можливо, вже у спокої незначне вивільнення Ca^{2+} із $IФ_3$-чутливого депо стимулює мітохондріальне дихання. Як наслідок, додаткова активація $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів завдяки активації P2Y-рецепторів не впливає на ендогенне дихання. Для перевірки цього припущення ми вирішили оцінити ефект активності $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів на мітохондріальне дихання, застосувавши мембранопроникний блокатор цих каналів 2-АФБ [10].

Після преінкубації залоз з 2-АФБ у концентрації 10 мкМ швидкість ендогенного дихання залоз не змінюється (рис. 5). Але сукцинат за наявності у середовищі 2-АФБ стимулює дихання залоз на 57,53 ± 7,29% відносно ендогенного дихання ($P \le 0{,}001$, $n = 5$), що є більшим на 12,35 ± 3,37%, ніж такий самий показник у контролі ($P \le 0{,}05$, $n = 5$). Подібні результати було одержано і за окислення пірувату і малату: внесення у середовище цієї суміші стимулювало дихання за наявності 2-АФБ на 43,97 ± 6,72% відносно ендогенного дихання ($P \le 0{,}001$, $n = 6$), що на 11,07 ± 2,87% більше, ніж у контролі, але у цьому разі $P > 0{,}05$, $n = 6$.

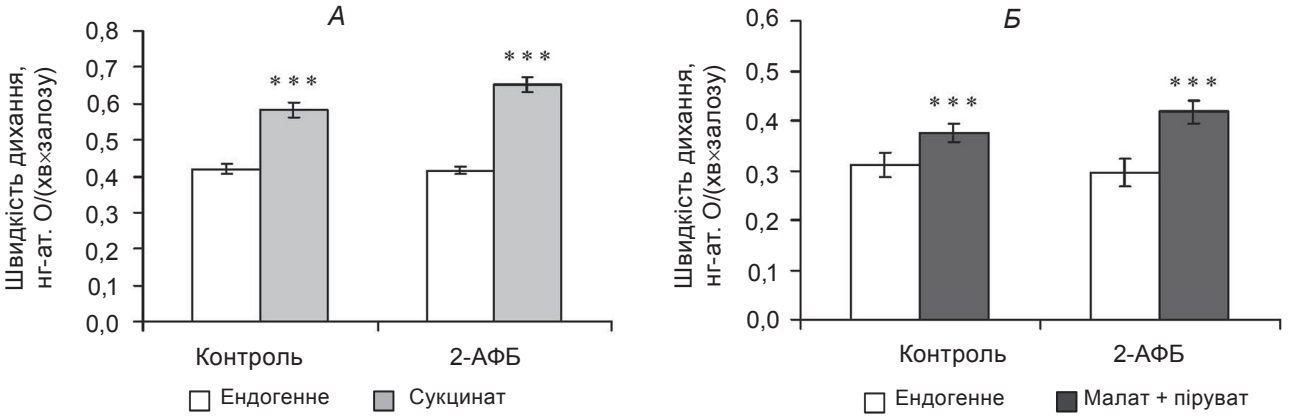


*Рис. 5. Зміни швидкості ендогенного і стимульованого сукцинатом (А) та сумішшю малату і пірувату (Б) дихання за додавання 2-АФБ: [2-АФБ] = 10 мкМ, [АТФ] = 100 мкМ, [сукцинат] = 0,35 мМ, [малат] = 5 мМ, [піруват] = 5 мМ; $[Ca^{2+}]_e$ = 1,76 мМ; швидкість дихання нормалізували, прийнявши за одиницю швидкість ендогенного дихання у контролі; ** статистично вірогідна різниця щодо ендогенного дихання з $P \le 0{,}01$, *** $P \le 0{,}001$; # різниця порівняно з контролем вірогідна з $P \le 0{,}05$; $n = 5–6$*

Отже, як активація $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів (опосередковано через $P2Y_{АТР}$-рецептори), так й їх інгібування за допомогою 2-АФБ не змінює ендогенного дихання. Це дозволяє зробити припущення про мінорну роль $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів в ендоплазматично-мітохондріальній Ca^{2+}-функціональній одиниці. Проте 2-АФБ інтенсифікує сукцинатстимульоване дихання; цей ефект ми пов'язуємо із пригніченням $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів, зменшенням вивільнення депонованого Ca^{2+} і його нагромадження у матриксі мітохондрій.

2-АФБ, як й інші інгібітори $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів, не характеризується абсолютною специфічністю; він може пригнічувати також депокеровані Ca^{2+}-канали (SOC) плазматичної мембрани [50], а також Ca^{2+}-помпу ЕПР і стимулювати неспецифічний витік Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [51]. Проте пригнічення депокерованих Ca^{2+}-каналів плазматичної мембрани і Ca^{2+}-помпи ЕПР має супроводжуватися зменшенням вмісту депонованого Ca^{2+}, а пригнічення $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів – навпаки, збільшенням (це не стосується рівня цитозольного Ca^{2+}). Тому на підставі зареєстрованих змін депонованого Ca^{2+} ми можемо розрізняти, з інгібуванням якої системи ми маємо справу.

У досліджуваних клітинах 2-АФБ у низьких концентраціях (1–10 мкМ) спричиняє збільшення вмісту депонованого Ca^{2+}, якщо залози інкубували у номінально безкальцієвому середовищі або в середовищі з фізіологічною концентрацією Ca^{2+}. Цей ефект спричинений блокуванням $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів і, як наслідок, зміщенням рівноваги в бік нагромадження Ca^{2+} у депо [10]. За інкубування залоз у гіперкальцієвому середовищі 2-АФБ у всіх випадках спричиняє не збільшення, а зменшення вмісту Ca^{2+} в тканині. Зменшується вміст Ca^{2+} в тканині залоз за дії 2-АФБ у високих концентраціях (20–100 мкМ) незалежно від концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубування. Оскільки протокол цих дослідів не передбачав попереднього вивільнення депонованого Ca^{2+}, що є необхідною умовою для активації депокерованих Ca^{2+}-каналів, це 2-АФБ-індуковане зменшення зумовлено пригніченням Ca^{2+}-помпи ЕПР [10].

Є також дані, що 2-АФБ може впливати на трансмембранний потенціал і дихання мітохондрій опосередковано через пригнічення циклоспориннечутливої пори транзієнтної проникності, як це було виявлено для нейронів [52]. У цьому разі швидкість дихання ізольованих мітохондрій у стані 3 за Чансом як за окислення суміші глутамату і малату, так і сукцинату під впливом 2-АФБ зменшувалася [52], що повністю є логічним і закономірним (запобігання зниженню трансмембранного потенціалу мітохондрій пригнічує їх дихання). Тому в слинних залозах личинки дзвінця інтенсифікація субстратстимульованого дихання за дії 2-АФБ аж ніяк не може бути спричинена інгібуванням пори транзієнтної проникності мітохондрій.

Таким чином, на сьогодні є досить багато експериментальних робіт, які вказують на можливість регуляції іонами Ca^{2+} процесів мітохондріального окислення в різних тканинах. Ще в роботах МакКормака і співроб. доведено Ca^{2+}-залежність деяких мітохондріальних дегідрогеназ [41]. Проте ці дослідження було проведено на ізольованих мітохондріях, а не цілісних клітинах. Дещо пізніше встановлено, що цитозольні Ca^{2+}-сигнали супроводжуються змінами флуоресценції АТР і $NADH_2$ в цілісних клітинах [42, 44, 53]. Але залишається незрозумілим, що є причиною збільшення рівня АТР і $NADH_2$ у клітині – підвищення рівня гліколізу, окисного фосфорилювання чи пригнічення (модуляція) АТР-залежних внутрішньоклітинних процесів. Результати наших досліджень, проведених на інтактних секреторних клітинах дзвінця із використанням полярографічної реєстрації дихання, однозначно вказують на інтенсифікацію мітохондріального дихання за активації внутрішньоклітинних каналів вивільнення Ca^{2+}.

Попередніми дослідженнями встановлено, що ефекти ріанодину в активуючій ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали концентрації та рутенію червоного на вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз за умови поєднання їх у середовищі інкубації мають неадитивний характер [7]. Зокрема, функціонування Ca^{2+}-активованих Ca^{2+}-каналів ЕПР і Ca^{2+}-уніпортера мітохондрій якимось чином залежить одне від одного. По-друге, блокування рутенієм червоним процесу акумуляції Ca^{2+} мітохондріями запобігає активуванню вивільнення Ca^{2+} з $ІФ_3$-чутливого депо (див. [7]). Тому у досліджуваних клітинах Ca^{2+}-уніпортер мітохондрій перебуває, мабуть, у стані динамічної рівноваги з розміщеними поруч каналами вивільнення Ca^{2+} з депо, і за відсутності стимуляції між цими структурами відбувається обмін іонами Ca^{2+}. Ці системи транспортування Ca^{2+} і формують ендоплазматично-мітохондріальну Ca^{2+}-функціональну одиницю [6].

Ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+}-функціональна одиниця може перебувати в трьох станах – спокою, активності та інактивації. Чинниками, які за рахунок прямого позитивного чи зворотного негативного зв'язку забезпечують перехід Ca^{2+}-функціональної одиниці з одного стану в інший слугують, головним чином, катіони Ca^{2+}, оскільки активність більшості Ca^{2+}-транспортувальних систем залежить від їх цитозольної концентрації.

Ми передбачаємо, що стан активності відносно стану спокою характеризується більшою амплітудою або й частотою Ca^{2+}-спайків, що є достатньою умовою для активації тих чи інших внутрішньоклітинних процесів. Для стану стаціонарної інактивації, як і для стану спокою, характерними є Ca^{2+}-осциляції незначної амплітуди (частоти?), на рівні флуктацій. Але на відміну від стану стаціонарної інактивації за стану спокою Ca^{2+}-функціональна одиниця характеризується високою чутливістю до фізіологічних чи експериментальних агоністів. І, нарешті, перехід ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці у стан інактивації (пригнічення каналів вивільнення Ca^{2+} за надмірної його концентрації у цитозолі) обмежує тривалість трансдукції сигналу в часі, має захисний характер і перешкоджає розвитку апоптичних процесів у клітинах.

Ріанодин в активуючій ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали концентрації переводить ендоплазматично-мітохондріальну Ca^{2+}-функціональну одиницю в стан експериментально спричиненої активності, а 2-АФБ, інгібуючи $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, навпаки, – в стан інактивації. Чи впливає на стан ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці інгібування Ca^{2+}-помпи ЕПР за допомогою 2-АФБ, сказати важко. Щоб встановити, чи входить ця Ca^{2+}-транспортувальна система до складу ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці, потрібно провести додаткові дослідження із використанням більш специфічного її інгібітора. Хоча, теоретично, часткове (чи короткочасне) пригнічення системи активного транспортування Ca^{2+} спричиняє перехід Ca^{2+}-функціональної одиниці, до складу якої вона входить, у різновид експериментально спричиненої активності. Натомість, за повного інгібування всіх систем активного транспортування Ca^{2+} певної Ca^{2+}-функціональної одиниці, остання де-факто перестає існувати.

Рівень активності ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця, спричинений додаванням до середовища ріанодину, є достатнім для інтенсифікації клітинного дихання та окисного фосфорилювання. Він, мабуть, еквівалентний стану за дії фізіологічних агоністів у субмаксимальних дозах, коли Ca^{2+}-сигнал поширюється на всю клітину і стає загальним. Натомість, зміна рівня активності ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці за дії позаклітинного АТР (опосередковано через $P2Y_{АТР}$-рецептори і, відтак, активацію $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів) є недостатньою для суттєвої зміни окисних процесів у мітохондріях. Очевидно, що вже в стані спокою ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці (у контролі) спостерігається спонтанна активність $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів ЕПР, вивільнюваний ними Ca^{2+} акумулюється уніпортером у мітохондріях і модулює окисні процеси. Тому додавання екзогенного АТР до позаклітинного середовища істотно змінити рівень окисних процесів не може. Але $IФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали таки входять до складу ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці секреторних клітин досліджуваних слинних залоз, оскільки пригнічення їх модулює окисні процеси в мітохондріях.

Отже, наведені факти беззастережно підтверджують наявність ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця. Водночас вони свідчать про надзвичайну складність зв'язків між Ca^{2+}-транспортувальними системами цієї одиниці і важливу роль катіонів Ca^{2+} в них. Ми не можемо відкидати і роль інших фізіологічно активних речовин у забезпеченні цих зв'язків. Зокрема, такими сигнальними чинниками у разі ендоплазматично-мітохондріальної Ca^{2+}-функціональної одиниці можуть бути метаболіти циклу Кребса, протонний градієнт чи АТР. По правді кажучи, для з'ясування цієї ролі нам необхідно дослідити вплив різного ступеня енергізації мітохондрій на Ca^{2+}-сигналізацію.

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИ-МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ Ca^{2+}-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЕДИНИЦА: ЗАВИСИМОСТЬ ДЫХАНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК ОТ АКТИВНОСТИ РИАНОДИН- И $ИФ_3$-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ Ca^{2+}-КАНАЛОВ

О. Ю. Великопольская, Б. А. Манько, В. В. Манько

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина;
e-mail: vvmanko@franko.lviv.ua

Исследована зависимость функционирования митохондрий от активности каналов высвобождения Ca^{2+} с использованием полярографической регистрации утилизации O_2 (при помощи кислородного электрода Кларка) суспензии слюнных желез личинки *Chironomus plumosus* L. (комара-дергуна, или звонца). Чтобы обеспечить проникновение экзогенных субстратов дыхательной цепи, клетки подвергали АТР-пермеабилизации. Установлено, что сама по себе активация Р2Х-рецепторов (как и Р2Y-рецепторов) плазматической мембраны экзогенным АТР или ADP не изменяет эндогенного дыхания суспензии слюнных желез. То есть на функциональную активность митохондрий не влияет поступление Ca^{2+} из внеклеточной среды, хотя сами митохондрии расположены вдоль базальной части плазматической мембраны. Активация рианодинчувствительных Ca^{2+}-каналов интенсифицирует эндогенное и стимулируемое смесью пирувата и малата дыхание, но не сукцинатстимулированное. Ни активация $ИФ_3$-чувствительных Ca^{2+}-каналов (вследствие активации Р2Y-рецепторов), ни их ингибирование не изменяют эндогенного дыхания. Тем не менее, ингибирование $ИФ_3$-чувствительных Ca^{2+}-каналов с помощью 2-аминоэтоксифенилбората интенсифицирует сукцинатстимулированное дыхание. Указанные факты свидетельствуют, что высвободившийся из внутриклеточного депо через каналы Ca^{2+} меняет функциональную активность митохондрий, и безусловно подтверждают наличие эндоплазматически-митохондриальной Ca^{2+}-функциональной единицы в секреторных клетках слюнных желез личинки звонца. В состоянии покоя эндоплазматически-митохондриальной Ca^{2+}-функциональной единицы наблюдается спонтанная активность $ИФ_3$-чувствительных Ca^{2+}-каналов эндоплазматического ретикулума, высвобождающийся ими Ca^{2+} аккумулируется унипортером в митохондриях и модулирует окислительные процессы. Активация рианодинчувствительных Ca^{2+}-каналов вызывает переход эндоплазматически-митохондриальной Ca^{2+}-функциональной единицы в состояние активности, что необходимо для интенсификации клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования. Предполагается, что переход эндоплазматически-митохондриальной Ca^{2+}-функциональной единицы в состояние инактивации (вследствие ингибирования каналов высвобождение Ca^{2+} при запредельной его концентрации в цитозоле) ограничивает продолжительность процессов трансдукции сигнала во времени, имеет защитный характер и препятствует развитию апоптических процессов в клетках.

Ключевые слова: клеточное дыхание, митохондрии, Ca^{2+}-транспортные системы, рианодинчувствительные Ca^{2+}-каналы, $ИФ_3$-чувствительные Ca^{2+}-каналы, Р2Х-и Р2Y-рецепторы, эндоплазматически-митохондриальная Ca^{2+}-функциональная единица.

ENDOPLASMIC-MITOCHONRIAL Ca^{2+}-FUNCTIONAL UNIT: DEPENDENCE OF RESPIRATION OF SECRETORY CELLS ON ACTIVITY OF RYANODINE- AND IP_3- SENSITIVE Ca^{2+}-CHANNELS

O. Yu. Velykopolska, B. O. Manko, V. V. Manko

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;
e-mail: vvmanko@franko.lviv.ua

Summary

Using Clark oxygen electrode, dependence of mitochondrial functions on Ca_{2+}-release channels activity of *Chironomus plumosus* L. larvae salivary glands suspension was investigated. Cells were ATP-permeabilized in order to enable penetration of exogenous oxidative substrates. Activation of plasmalemmal P2X-receptors (as well as P2Y-receptors) per se does not modify the endogenous respiration of salivary gland suspension. That is, Ca^{2+}-influx from extracellular medium does not influence functional activity of mitochondria, although they are located along the basal part of the plasma membrane. Activation of RyRs intensifies endogenous respiration and pyruvate-malate-stimulated respiration, but not succinate-stimulated respiration. Neither activation of IP_3Rs (via P2Y-receptors activation), nor their inhibition alters endogenous respiration. Nevertheless, IP_3Rs inhibition by 2-APB intensifies succinate-stimulated

respiration. All abovementioned facts testify that Ca^{2+}, released from stores via channels, alters functional activity of mitochondria, and undoubtedly confirm the existence of endoplasmic-mitochondrial Ca^{2+}-functional unit in *Ch. plumosus* larvae salivary glands secretory cells. In steady state of endoplasmic-mitochondrial Ca^{2+}-functional unit the spontaneous activity of IP_3Rs is observed; released through IP_3Rs, Ca^{2+} is accumulated in mitochondria via uniporter and modulates oxidative processes. Activation of RyRs induces the transition of endoplasmic-mitochondrial Ca^{2+}-functional unit to the active state, which is required to intensify cell respiration and oxidative phosphorylation. As expected, the transition of endoplasmic-mitochondrial Ca^{2+}-functional unit to inactivated state (i. e. inhibition of Ca^{2+}-release channels at excessive $[Ca^{2+}]_i$) limits the duration of signal transduction, has protective nature and prevents apoptosis.

K e y w o r d s: cell respiration, mitochondria, Ca^{2+}-transporting systems, ryanodine receptors (RyRs), IP_3 receptors (IP_3Rs), P2X- and P2Y-receptors, endoplasmic-mitochondrial Ca^{2+}-functional unit.

1. *Straub S. V., Giovannuccia D. R., Yule D. I.* // J. Gen. Physiol. – 2000. – **116**, N 4. – P. 547–560.
2. *Park M. K., Ashby M. C., Erdemli G. et al.* // EMBO J. – 2001. – **20**, N 8. – P. 1863–1874.
3. *Rizzuto R., Pinton P., Carrington W. et al.* // Science. – 1998. – **280**. – P. 1763–1766.
4. *Carafoli E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**, Iss. 3. – P. 1115–1122.
5. *Rizzuto R., Pozzan T.* // Physiol. Rev. – 2006. – **86**. – P. 369–408.
6. *Манько В. В.* // Біологічні студії / Studia Biologica. – 2008. – **2**, № 1. – С. 33–50.
7. *Бичкова С., Манько В., Клевець М., Кулачковський О.* // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2007. – **44**. – С. 3–14.
8. *Carpenter J. H.* // Limnol. Oceanogr. – 1966. – **11**. – P. 264–277.
9. *Chance B., Williams G. R.* // J. Biol. Chem. – 1955. – **217**. – P. 383–394.
10. *Великопольська О. Ю., Манько В. В.* // Біологічні студії / Studia Biologica. – 2009. – **3**, № 3. – С. 39–50.
11. *Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є.* Курс варіаційної статистики. – К.: Вища шк., 1977. – 210 с.
12. *Saks V. A., Veksler V. I., Kuznetsov A. V. et al.* // Mol. Cell. Biochem. – 1998. – **184**, N 1–2. – P. 81–100.
13. *Мерлавський В. М., Манько Б. О., Іккерт О. В., Манько В. В.* // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2010. – **4**, № 3. – С. 15–22.
14. *Манько Б. О., Гренюх В. П., Манько В. В.* // Молодь і поступ біології: VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (5–8 квітня 2011 року, м. Львів): тези доповідей. – 2011. – С. 392–393.
15. *Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V. et al.* // Cell Biol. Int. – 2012. – **36** (1) – P. 71–77.
16. *Манько В., Великопольська О.* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. – 2005. – **40**. – С. 134–139.
17. *Nishikawa M., Nojima Sh., Akiyama T. et al.* // Biochem. J. – 1984. – **96**, N 4. – P. 1231–1239.
18. *Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А.* // Биохимия. – 1997. – **62**. – С. 1666–1671.
19. *Colbeau A., Nachbaur J., Vignais P. M.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1971. – **249**, № 2. – P. 462–492.
20. *Іккерт О.* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. – 2004. – **38**. – С. 194–200.
21. *Cook G. A., Gattone V. H., Evan A. P. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – **763**. – P. 356–367.
22. *Холмухамедов Э. Л.* Роль митохондрий в обеспечении нормальной жизнедеятельности и выживания клеток млекопитающих: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Пущино, 2008. – 35 с.
23. *Ralevic V., Burnstock G.* // Pharmacol. Rev. – 1998. – **50**, N 3. – P. 413–492.
24. *Tenneti L., Gibbons S. J., Talamo B. R.* // J. Biol. Chem. –1998. – **273**. – P. 26799–26808.
25. *Buell G., Lewis C., Collo G. et al.* // EMBO J. – 1996. – **15**. – P. 55–62.
26. *North R. A.* // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 1013–1067.
27. *Hede S. E., Amstrup J., Christoffersen B. C., Novak I.* // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, N 45. – P. 31784–31791.
28. *Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E. et al.* // Science. – 1996. – **272**. – P. 735–738.
29. *Virginio C., MacKenzie A., Rassendren F. A. et al.* // Nat. Neurosci. – 1999. – **2**, N 4. – P. 315–321.
30. *Hems R., Stubbs M., Krebs H. A.* // Biochem. J. – 1968. – **107**, N 6. – P. 807–15.
31. *Великопольська О., Мерлавський В., Манько В.* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. – 2008. – Вип. 47. – С. 146–152.
32. *Cockcroft S., Gomperts B. D.* // Nature. – 1979. – **279**. – P. 541–542.
33. *Bennett J. P., Cockcroft S., Gomperts B. D.* // J. Physiol. – 1981. – **317**. – P. 335–345.

34. *Cutaia M., Davis R., Parks N. et al.* // J. Appl. Physiol. – 1996. – **81**. – P. 509–515.
35. *Innocenti B., Pfeiffer S., Zrenner E. et al.* // J. Neurosci. – 2004. – **24**(39). – P. 8577–8583.
36. *Bulanova E., Budagian V., Orinska Z. et al.* // J. Immunol. – 2005. – **174**. – P. 3880–3890.
37. *Мотыль Chironomus plumosus* L. Систематика, морфология, экология, продукция. – М.: Наука, 1983. – 312 с.
38. *Buck E., Zimanyi I., Abramson J. J. et al.* // J. Biol. Chem. – 1992. – **267**. – P. 23560–23567.
39. *Манько В. В., Бичкова С. В., Клевець М. Ю.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 65–71.
40. *Walsh C., Barrow S., Voronina S. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – **1787**. – P. 1374–1382.
41. *McCormack J. G., Denton R. M.* // Biochem. J. – 1980. – **190**, N 1. – P. 95–105.
42. *Voronina S., Sukhomlin T., Erdemli G. et al.* // J. Physiol. – 2002. – **539**, N 1. – P. 41–52.
43. *Moreno-Sanchez R.* // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**, N 7. – P. 4028–4032.
44. *Jouaville L. S., Pinton P., Bastianutto C. et al.* // PNAS. – 1999. – **96**, N 24. – P. 13807–13812.
45. *Spat A., Eberhardt I., Kiesel L.* // Biochem. J. – 1992. – **287** (Pt 1). – P. 335–336.
46. *Rardon D. P., Cefali D. C., Mitchell R. D. et al.* // Circ. Res. – 1989. – **64**. – P. 779–789.
47. *McIntosh D. B., Woolley D. G., Vilsen B., Andersen J. P.* // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 42. – P 25778–25789.
48. *Berridge M. J.* // Nature. – 1993. – **361**, N 6410. – P. 315–325.
49. *Foskett J. K., White C., Cheung K.-H., Mak D.-O. D.* // Physiol. Rev. – 2007. – **87**. – P. 593–658.
50. *Bootman M. D., Collins T. J., Mackenzie L. et al.* // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1145–1150.
51. *Maruyama T., Kanaji T., Nakade S. et al.* // Japan. J. Biochem. – 1997. – **122**. – P. 498–505.
52. *Chinopoulos Ch., Starkov A. A., Fiskum G.* // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**. – P. 27382–27389.
53. *Voronina S. G., Barrow S. L., Simpson A. W. M. et al.* // Gastroenterology. – 2010. – **138**. – P. 1976–1987.

Отримано 14.10.2011