

УДК. 576.17:612.014:612.4

ІДЕНТИФІКАЦІЯ Ca^{2+} -АКТИВОВАНОЇ, Mg^{2+} -ЗАЛЕЖНОЇ АТФ-АЗИ МІКРОСОМАЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ МЕМБРАН СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ІЗОЛЬОВАНИХ АЦИНУСІВ ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ

Н. Федірко, Ю. Вац, М. Клевець

Львівський національний університет імені Івана Франка,

вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,

e-mail: biolog@franko.lviv.ua

Запропоновано метод дослідження активностей АТФ-азних систем мембран мікросомальної фракції ізольованих ацинусів підщелепної слинної залози щурів. Визначено активності Mg^{2+} -АТФ-ази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази й Na^+ , K^+ -АТФ-ази. Зокрема, з'ясовано Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність плазматичної (2,74 нмоль P_i /мг білка за 1 год) та ендоплазматичної мембрани (2,66 нмоль P_i /мг білка за 1 год) везикул. Додатково, використовуючи оброблення дигітоніном мембран мікросомальної фракції, ми довели, що досліджувана фракція переважно містить везикули типу *inside-out*.

Ключові слова: секреція, плазматична мембрана, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза, дигітонін.

У забезпеченні мембранних механізмів контролювання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу, а також регулювання екзоцитозу травних ферментів та електролітів важливу роль відіграють Ca^{2+} -помпи, локалізовані у різних субклітинних структурах (зокрема, в плазматичній мембрані та мембрані ендоплазматичного ретикулуму). Зумовлено це, насамперед, тим, що стимулом для запуску секреції є транзйентне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яке виникає завдяки його надходженню із зовнішньоклітинного простору чи/або вивільнення із внутрішньоклітинних пулів цього катіона, а відновлення початкової концентрації кальцію та припинення секреції – головню внаслідок активного виведення Ca^{2+} з цитозолу Ca^{2+} -помпами. Відомо, що функцію Ca^{2+} -помпи виконують Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази.

Роль Ca^{2+} -помп у функціонуванні секреторних клітин доведена на підшлунковій залозі щурів і мишей [19–21, 23], слинних залозах личинки *Chironomus plumosus* L. [8], щурів [12] та мишей [17] з використанням специфічних блокаторів цієї транспортної системи. З'ясовано також її роль у регулюванні секреторної активності клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. [8] та ізольованих ацинусів підщелепної слинної залози щурів [12]. Проте прямим доказом функціонування у мембрані секреторних клітин мембранозв'язаної енергозалежної системи транспорту Ca^{2+} треба вважати ідентифікацію Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності мікросомальної фракції мембран із використанням маркерних ферментативних і

функціональних тестів [3]. Зазначимо також, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза ідентифікована у тканині слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L [1], однак нема відомостей про функціонування та ферментативну активність АТФ-азних систем у мембранах секреторних клітин ссавців.

З огляду на це нашою метою було ідентифікувати активність АТФ-азних систем мембран секреторних клітин ізольованих ацинусів підщелепної слинної залози щурів, і зокрема Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази, локалізованої в плазматичній мембрані та мембрані ендоплазматичного ретикулула.

Дослідження виконували на ізольованих ацинусах підщелепних слинних залоз нелінійних білих щурів-самців (1,5 місяця). Декапітацію тварин проводили після внутрішньо-черевної ін'єкції тіопентаналу натрію (10 мг/100г маси). Ізольовали ацину си шляхом ферментативно-механічної обробки тканини слинної залози за описаною раніше методикою [12]. Ізольовані ацинуси ресуспензували та гомогенізували з постійним охолодженням за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвейга у 2 мл *tris*-НСІ-буфера (50 мМ, рН 7,4). Рештки клітин і ядра осаджували центрифугуванням впродовж 10 хв при 1600 g. Постядерний супернатант, який містив інтегральну мікосомальну фракцію (мітохондрії, розчинні білки цитозолу, фрагменти плазматичної мембрани та мембрани ендоплазматичного ретикулула) центрифугували протягом 10 хв при 10000 g. Для визначення активності АТФ-азних систем мембрани секреторних клітин аліквоти (150 мкл) постмітохондріального супернатанту, який містив везикули плазматичної мембрани та мембрани ендоплазматичного ретикулула, інкубували при 37 °С у водяному ультратермостаті протягом 15 хв у середовищі інкубації (1 мл відповідного складу. Для визначення сумарної АТФ-азної активності використовували стандартне середовище інкубації такого складу, ммоль/л: NaCl – 50,0; KCl – 100,0; MgCl_2 – 3,0; CaCl_2 – 0,01; НЕРЕС/NAOH (рН = 7,4; 37 °С) – 20,0; АТФ – 3. Для визначення Na^+ , K^+ - та Mg^{2+} -АТФ-азної активності до стандартного середовища інкубації додавали 1 ммоль/л EGTA („Sigma”) за відсутності CaCl_2 . Питому Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність розраховували за різницею між сумарною та Mg^{2+} -, Na^+ , K^+ -АТФ-азною активностями; Mg^{2+} -АТФ-азну активність визначали за тих же умов, але в присутності 1 ммоль/л оубаїну; Na^+ , K^+ -АТФ-азну – за різницею між Mg^{2+} -, Na^+ , K^+ - та Mg^{2+} -АТФ-азною активностями. Для визначення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази плазматичної мембрани до стандартного безкальцієвого середовища інкубації додавали, ммоль/л: тапсигаргін (як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази мембрани ендоплазматичного ретикулула) – 0,1; EGTA – 1,0; оубаїн – 1,0; рутеній червоний – 0,2. З метою визначення характеру везикульованості мембранних фрагментів у досліджуваній фракції використовували методичний підхід, який ґрунтується на визначенні активності ферментів-маркерів у ній до і після обробки неіонним детергентом дигітоніном (0,1%).

Ферментативну реакцію припиняли додаванням 200 мкл 20 % трихлороцтової кислоти. Після центрифугування (5 хв, 1600 g) від супернатанту відбирали аліквоти (500 мкл) для визначення концентрації неорганічного фосфору P_i . Кількість продукту АТФ-гідролізної реакції визначали за методом Фіске-Суббароу. Актив-

ність АТФ-азних систем мембран досліджуваних клітин оцінювали за різницею вмісту P_i у середовищах різного складу й виражали в наномоль P_i у перерахунку на 1 мг білка за 1 год. Вміст білка в середовищі інкубації визначали за методом Лоурі [18].

Варіаційно-статистичний аналіз одержаних результатів виконували за допомогою непарного двобічного t-тесту Стьюдента.

З'ясовано, що вміст P_i який вивільнився внаслідок ферментативної реакції в стандартному безкальцієвому та безмагнієвому середовищі інкубації в разі додавання аліквоти ферментного білка, становив $5,91 \pm 0,66$ нмоль/мг білка за 1 год. Додавання до середовища такого складу $3,0$ ммоль/л Mg^{2+} супроводжувалось збільшенням кількості P_i у середньому на $25,7\%$ ($n = 6$). Це збільшення є позитивним тестом на наявність у досліджуваній мікросомальній фракції мембран секреторних клітин фермента-маркера плазматичної мембрани – Mg^{2+} -АТФ-ази. Визначення питомих активностей ферментів-маркерів плазматичної мембрани (5'-нуклеотидази, Na^+ , K^+ та Mg^{2+} -АТФ-ази) широко використовують як функціональний тест на чистоту фракцій субклітинних структур [6, 14, 24]. Подальше збільшення вмісту P_i в інкубаційному розчині відбувалось унаслідок додавання до стандартного Mg^{2+} -вмісного середовища 10^{-5} моль/л Ca^{2+} і становило в середньому $81,2\%$ ($n = 6$) порівняно з безкальцієвим і безмагнієвим. Таке збільшення є адекватним тестом на наявність у білковій фракції Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} та Na^+ , K^+ -АТФ-азної активностей. Підтвердженням Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності у фракції мембранних везикул є зменшення (порівняно з його вмістом за умов наявності Ca^{2+} у середовищі) концентрації P_i у безкальцієвому (Mg^{2+} -вмісному) інкубаційному розчині внаслідок додавання до нього 1 ммоль/л ЕГТА, яке в середньому становило $50,3\%$ (див. рис.). Тобто активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази мікросомальної фракції плазматичної мембрани та мембрани ендоплазматичного ретикулума становила в середньому $5,4$ нмоль P_i /мг білка за 1 год або ж $49,7\%$ від сумарної Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} та Na^+ , K^+ -АТФ-азної активностей.

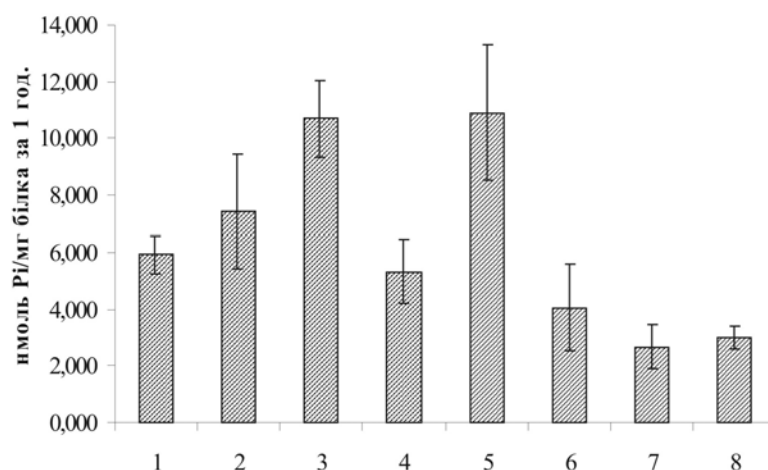
Оскільки в процесі виділення мембранних везикул, переважно, утворюється інтегральна популяція фрагментів, які мають різний характер везикульованості [15, 16], тоді як відсутність контролю за вмістом „вивернутих” везикул може бути причиною отримання суперечливих даних [7] під час вивчення систем активного транспорту Ca^{2+} , та необхідно проводити відповідні маркерні тести для ідентифікації орієнтованості мембранних фрагментів. З метою з'ясування характеру везикульованості мембранних фрагментів у дослідженнях на мікросомальних фракціях широко використовують обробку їх розчином неіонного детергента дигітоніну з низькою концентрацією [2, 5]. З огляду на це для з'ясування топології замкнутості мембранних фрагментів і наявності невезикульованих структур у досліджуваній фракції до стандартних кальцій- та магнійвмісного й безкальцієвого (з додаванням ЕГТА) середовищ додавали дигітонін ($0,1\%$), який, як відомо [13], взаємодіє з плазматичною мембраною клітин, утворюючи важкорозчинні комплекси з холестериним, і не зумовлює деструкції мембран внутрішньоклітинних струк-

тур (саркоплазматичного ретикула та мітохондрій). З'ясувалось, що внаслідок додавання дигітоніну до стандартного кальцій-, магнійвмісного середовища інкубації вміст P_i в ньому майже був таким, як у середовищі без дигітоніну ($10,93 \pm 2,38$ та $10,71 \pm 1,36$ нмоль P_i /мг білка за 1 год, відповідно). Додавання детергента до безкальцієвого ЕГТА-вмісного середовища інкубації супроводжувалось зменшенням концентрації у ньому продукту АТФ-гідролазної реакції (P_i) у середньому на 23,7 % порівняно з його вмістом у середовищі такого ж складу без дигітоніну (див. рис.). Отже, відсутність зростання Mg^{2+} -АТФ-азної активності, яка тестує цитоплазматичну поверхню мембрани, після обробки фракції везикул дигітоніном свідчить про те, що одержані мембранні везикули в переважній більшості замкнені цитоплазматичною поверхню назовні (*inside-out*). Незначне зменшення Mg^{2+} -, Na^+ , K^+ -АТФ-азної, а отже, й збільшення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активностей унаслідок дії дигітоніну може бути зумовлене частковим руйнуванням везикульованих структур плазматичної мембрани за цих умов, оскільки, як відомо, Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФ-ази є ферментами-маркерами плазматичної мембрани [6, 11]. Одержані нами дані цілком узгоджуються з результатами досліджень Костері на та співавторів (1990) щодо впливу дигітоніну на Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФ-азну активності сарколеми міомеріа. Ці автори також з'ясували відсутність зростання Mg^{2+} -АТФ-азної активності після обробки мембранної фракції дигітоніном, і відсутність за таких умов АТФ-залежного накопичення Ca^{2+} у везикулах, що дало змогу зробити висновок про „неправильність” (*inside-out*) замкнутості більшості з них.

Крім того, ми довели, що внаслідок додавання до стандартних безкальцієвих (1 ммоль/л ЕГТА) середовищ без та з дигітоніном специфічних блокаторів Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази мембрани ендоплазматичного ретикула та Na^+ , K^+ -АТФ-ази в обох випадках відбувалося зменшення кількості P_i , який вивільнився під час ферментативної реакції в середньому на 49,81 та 26,4 %, відповідно (див. рис.). Отже, активність Mg^{2+} -АТФ-ази становить у середньому 2,67 нмоль P_i /мг білка за 1 год у середовищі без дигітоніну та 2,99 нмоль P_i /мг білка за 1 год – у середовищі з дигітоніном. Розраховані за різницею активності Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази везикулярних структур плазматичної мембрани секреторних клітин без дигітоніну і на його фоні становили в середньому: 2,65 та 1,06; 2,74 та 3,87 нмоль P_i /мг білка за 1 год, відповідно (див. рис.). Зумовлене дигітоніном незначне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а не навпаки, як виявлено в дослідженнях на фракції мембранних фрагментів сарколеми міомеріа [5]), очевидно, спричинене наявністю в мікросомальній фракції мембран досліджуваних клітин незначної кількості невезикульованих структур. Збільшення ж як сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності, як і активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази, плазматичної мембрани під впливом дигітоніну, найімовірніше зумовлене наявністю в досліджуваній фракції певної кількості „правильно” замкнутих структур (*outside-out*). З літературних джерел відомо, що на стадії гомогенізування тканини термодинамічно ймовірність утворення везикул замкнутих цитоплазматичного поверхню назовні значно більша, ніж утворення везикул замкнених всередину, що зумовлено, здебільшого, особливостями ультраструктурної організації базальної мем-

брани клітин. Одержані нами результати про переважний вміст у мікосомальній фракції мембран досліджуваних секреторних клітин „неправильно” орієнтованих везикулярних структур цілком узгоджується з наведеними в літературі. Зокрема, таке міркування підтверджено в ході електронно-мікроскопічних досліджень гладком’язових клітин [10, 22].

Отже, мембранні структури секреторних клітин ізольованих ацинусів підщелепної слинної залози щурів мають Mg^{2+} -АТФ-, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азною та Na^+ , K^+ -АТФ-азні активності. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азна активність властива мембранним везикулам плазматичної мембрани (2,74 нмоль P_i / мг білка за 1 год) та мембрани ендоплазматичного ретикулула (2,66 нмоль P_i / мг білка за 1 год).



Активність АТФ-азних систем мікосомальної фракції мембран ізольованих ацинусів підщелепної слинної залози щурів.

На рисунку по осі ординат наведено кількість P_i , який вивільнився в результаті ферментативної реакції в інкубаційних середовищах різного складу; по осі абсцис – склад середовищ інкубації: безмагнієве та безкальцієве стандартне середовище інкубації;

безкальцієве стандартне середовище інкубації з MgCl_2 (3 ммоль);

стандартне середовище інкубації з CaCl_2 (10 мкмоль);

магніймісне безкальцієве (1 ммоль ЕГТА) стандартне середовище інкубації;

кальцій- та магніймісне стандартне середовище інкубації з додаванням дигітоніну (0,1 %);

магніймісне безкальцієве (1 ммоль ЕГТА) стандартне середовище інкубації з додаванням дигітоніну (0,1 %);

магнійвмісне безкальцієве стандартне середовище інкубації з додаванням: ЕГТА (1 ммоль), оубаїну (1 ммоль), рутенієвого червоного (20 мкмоль), тапсигаргіну (0,1 мкмоль);

магнійвмісне безкальцієве стандартне середовище інкубації з додаванням: ЕГТА (1 мМ), дигітоніну (0,1 %), оубаїну (1 ммоль), рутенієвого червоного (20 мкмоль), тапсигаргіну (0,1 мкмоль).

1. *Король Т. В., Манько В. В., Клевець М. Ю.* Дослідження активного транспорту Ca^{2+} у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. //Біологія тварин. 2000. Вип. 1. С. 92–97.
2. *Костерин С. А., Курский М. Д., Фомин В. П.* Пассивный транспорт кальция во фракции плазматических мембран клеток миомерия //Биохимия. 1984. Вып. 9. С. 1407–1417.
3. *Костерин С. А.* Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наук. Думка, 1990. 216 с.
4. *Костерин С. О.* Кінетичні та енергетичні аспекти впливу діелектричної проникності середовища інкубації на каталітичну та транспортну активність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани //Укр. біохім. журн. 2000. Вип. 4–5. С. 44–60.
5. *Курский М. Д., Фомин В. П., Шинлова О. П., Костерин С. А.* Влияние мембранного потенциала на пассивный транспорт Ca^{2+} во фракции везикул сарколеммы миомерия// Биохимия. 1980. Вып. 2. С. 242–248.
6. *Невилл Д.* Получение фракций, обогащенных поверхностными клеточными мембранами //Биохимическое исследование мембран /Под ред. Э. Медди. М.: Мир, 1979. С. 99–105.
7. *Орлов Р. С., Покудин Н. И., Гулак П. В., Кравцов Г. М.* Механизмы АТР-зависимого поглощения кальция плазматическими мембранами //Докл. АН СССР. 1982. Вып. 2. С. 482–485.
8. *Федірко Н. В., Клевець М. Ю.* Вплив еозину Y та ортованадату на стаціонарний вхід Ca^{2+} у секреторні клітини екзокринних залоз та базальну секрецію //Фізіол. журн. 2000. Вип. 6. С. 3–9.
9. *Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А.* Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума миомерия //Биохимия. 1997. Вып. 12. С. 1666–1671.
10. *Bond M., Kitazawa T., Somlyo A. V.* Release and recycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea pig portal vein smooth muscle //J. Physiol. 1984. Vol. 355. P. 677–695.
11. *Daniel E. E* The use of subcellular membrane fractions in analysis of control of smooth muscle function //Experientia. 1985. Vol. 41. P. 905–913.

12. *Fedirko N., Klevets M., Vat's Ju.* Isolated acini as an object for the investigation of the Ca²⁺-transporting system of the secretory cell membranes //Нейрофізіологія /Neurophysiology. 2000. Vol. 32. P. 183–184.
13. *Fiskum G.* Intracellular levels and distribution of Ca²⁺ in digitonin-permeabilized cells //Cell Calcium. 1985. Vol. 6. P. 25–37.
14. *Godfraind T., Sturbois X., Verbeke N.* Calcium incorporation by smooth muscle microsomes //Biochem. et biophys. acta. 1976. Vol. 455. P. 254–268.
15. *Grover A. K., Crankshaw J., Garfield R. E., Daniel E. E.* Smooth muscle membrane vesicles orientation: a study on intactness and sidedness of rat myometrium plasma membrane vesicles //Can. J. Physiol. Pharmacol. 1980. Vol. 58. P. 1202–1211.
16. *Hopfer U.* Transport in isolated plasma membranes //Amer. J. Physiol. 1978. Vol. 234. P. F89–F96.
17. *Liu P., Scott J., Smith M.* Intracellular calcium signalling in rat parotid acinar cells that lack secretory vesicles // Biochem. J. 1998. Vol. 330. P. 847–852.
18. *Lowry J. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* //J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
19. *Mogami H., Gardner J., Gerasimenko O., et al.* Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells //Journal of Physiology. 1999. Vol. 518. P. 463–467.
20. *Petersen O., Cancela J.* Nerve guidance: Attraction or repulsion by local Ca²⁺ signals //Current Biology. 2000. Vol. 10. P. 311–3145.
21. *Pfeiffer F., Sternfeld A., Schulz I.* Control of Ca²⁺ wave propagation in mouse pancreatic cells //AJP – Cell Physiology. 1998. Vol. 274. P. 663–672.
22. *Popescu L. M.* Conceptual model of excitation-contraction coupling in smooth muscle: the possible role of the surface microvesicles //Stud. Biophysica. 1974. Vol. 44. P. 141–153.(587)
23. *Tinel H., Cancela J., Modami H., et al.* Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol triphosphate-evoked local cytosolic Ca²⁺ signals //The EMBO Journal. 1999. Vol. 18. P. 4999–5008.
24. *Zachowski A., Evans W. H., Paraf A.* Immunological evidence that plasma membrane 5'-nucleotidase is a transmembrane protein //Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol. 644. P. 121–127.

**IDENTIFICATION OF Ca^{2+} -ACTIVATED, Mg^{2+} -DEPENDENT
ATPase IN MEMBRANE MICROSOMAL FRACTION OF
SECRETORY CELL OF ISOLATED ACINI FROM RAT
SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND**

N. Fedirko, Ju. Vats, M. Klevets

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevs'oho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

The method for investigation the ATPase-systems activities of membrane microsomal fraction of isolated acini from rat submandibular salivary gland has been elaborated. It was revealed Mg^{2+} -ATPase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase activities in the membrane vesicles fraction of secretory cells. Specifically, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity has been shown in the plasma membrane (2,74 nmol P_i /mg protein per 1 hour) and endoplasmic membrane (2,66 nmol P_i /mg protein per 1 hour) vesicles. Additionally using dygitonin treatment of membrane microsomal fraction we have shown that mostly investigated fraction contains *inside-out* vesicles.

Keywords: secretion, plasma membrane, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, dygitonin.

Стаття надійшла до редколегії 20.06.2001

Прийнята до друку 18.07.2001