

Н.В. Федірко, В.В. Манько, М.Ю. Клевець

Вплив парахлормеркурійбензоату та дитіотреїтолу на вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз та секрецію ними загального білка

*Исследовано влияние специфического блокатора сульфгидрильных групп парахлормеркурійбензоата (ПХМБ) и их протектора дитіотреїтола (ДТТ) на содержание Ca^{2+} в ткани слюнных желез личинки *Chironomus plumosus* L. и секрецию общего белка. Установлено, что ПХМБ в небольших концентрациях увеличивает содержание Ca^{2+} в ткани желез и секрецию белка, вероятно, путем стимуляции активности $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обменника в реверсивном режиме и/или блокирования Ca^{2+} -помпы плазматической мембраны посредством влияния на SH-группы в составе их молекул. ПХМБ в больших концентрациях значительно уменьшает вход Ca^{2+} клетки, что, соответственно, отражается в снижении секреторной активности желез. Обнаруженные эффекты, в зависимости от режима функционирования $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обменника (прямой или реверсивный) вызваны преобладающим ингибирующим влиянием ПХМБ либо на Ca^{2+} -помпу мембраны эндоплазматического ретикулума или натрий - зависимый вход Ca^{2+} в клетки желез. Вопрос о влиянии ПХМБ в высоких концентрациях на кальциевые каналы мембраны исследуемых клеток дискутируется. ДТТ увеличивает содержание Ca^{2+} в железах и уменьшает секрецию белка, наиболее вероятно, посредством хелатирования катионов тяжелых металлов, ингибирующих Ca^{2+} -помпу эндоплазматического ретикулума. Таким образом, результаты проведенных экспериментов подтверждают важную функциональную роль SH-групп в составе молекул $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обменника и Ca^{2+} -помпы секреторных клеток.*

Вступ

Відомо, що функціональна активність білкових молекул визначається реакційною здатністю іонізованих залишків амінокислот у їхньому складі. Зокрема високою реакційною здатністю характеризуються SH-групи, що входять до складу каталітичних центрів ферментів, а також можуть брати участь у регуляції функціонування білкових молекул. Наявність SH-груп виявлено в молекулах Ca^{2+} -АТФази [1] та $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [12, 21] мембрани збудливих клітин. Відомостей про наявність та функціональну роль SH-груп у підтриманні гомеостазу катіонів Ca^{2+} у незбудливих клітинах мало. Так, наявність SH-груп у складі молекули $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінника мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. було постульовано нами на основі змін амплітуди струму $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обміну внаслідок залужнення позаклітинного середовища [5] та аналізу дії на нього катіонів важких металів з різною спорідненістю до них [6].

Виходячи з того, що іони Ca^{2+} контролюють практично усі клітинні функції, в тому числі і запуск секреції травних ферментів [16, 26], метою цієї роботи є виявлення та дослідження властивостей високореакційноздатних SH-груп у складі молекул кальцій-транспортних білків клітин травних залоз за допомогою їх реагентів.

© Н.В. Федірко, В.В. Манько, М.Ю. Клевець

Методика

Дослідження проводили *in vitro* на ізольованих слинних залозах личинки *Chironomus plumosus* L. за описаною раніше методикою [4]. Для вивчення секреції та зміни вмісту Ca^{2+} в тканині залоз за фізіологічних умов використовували вихідний позаклітинний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 136,90, KCl – 5,36, CaCl_2 – 1,76, MgCl_2 – 0,95, Na_2HPO_4 – 0,35, KH_2PO_4 – 0,44; глюкоза – 5,55; рН 7,2. Зворотний режим функціонування Na^+ – Ca^{2+} -обмінника активували зменшенням $[\text{Na}^+]_3$ до 35 ммоль/л, еквімолярно замінивши 101,90 ммоль/л NaCl на тріс- Cl . Парахлормеркурійбензоат (ПХМБ) у концентраціях 1, 2,5, 5 та 10 мкмоль/л додавали до вихідного та гіпонатрієвого розчинів, а дитіотреїтол (ДТТ) у концентраціях 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5 ммоль/л – тільки до гіпонатрієвого розчину.

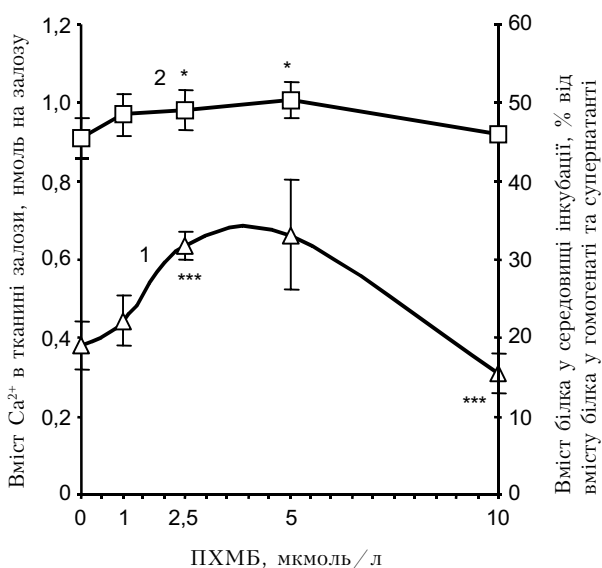
Вміст катіонів Ca^{2+} у тканині слинних залоз визначали з використанням арсеназо III і виражали в наномолях у перерахунку на одну залозу.

Вміст загального білка у гомогенаті та супернатанті визначали за методом Лоурі [18]. Його відносний вміст в інкубаційному середовищі, який був показником секреторної активності, розраховували як процентне співвідношення вмісту білка у супернатанті до сумарного його вмісту у гомогенаті та супернатанті.

Достовірність змін встановлювали за критерієм *t* Стьюдента, статистичну обробку здійснювали з використанням програмного пакету для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*.

Результати та їх обговорення

У першій серії експериментів специфічний сульфгідрильний реагент ПХМБ додавали до позаклітинного розчину із фізіологічною концентрацією катіонів Na^+ , в якому інкубували залози протягом 30 хв. Встановлено, що ПХМБ у концентраціях 1,0, 2,5 та 5,0 мкмоль/л підвищував вміст Ca^{2+} у тканині залоз у середньому на 12,34, 61,67 та 68,01 %, а секрецію загального білка –



на 6,50, 7,54 та 10,73 % відповідно. Проте підвищення концентрації блокатора до 10 мкмоль/л викликало зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині залози у середньому на 19,65 %, а вміст білка у середовищі інкубації при цьому практично не відрізнявся від контролю (рис. 1).

Рис. 1. Залежність вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз (1) та вмісту білка у середовищі інкубації (2) від концентрації парахлормеркурійбензоату; $[\text{Na}^+]_e = 136,9$ ммоль/л. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

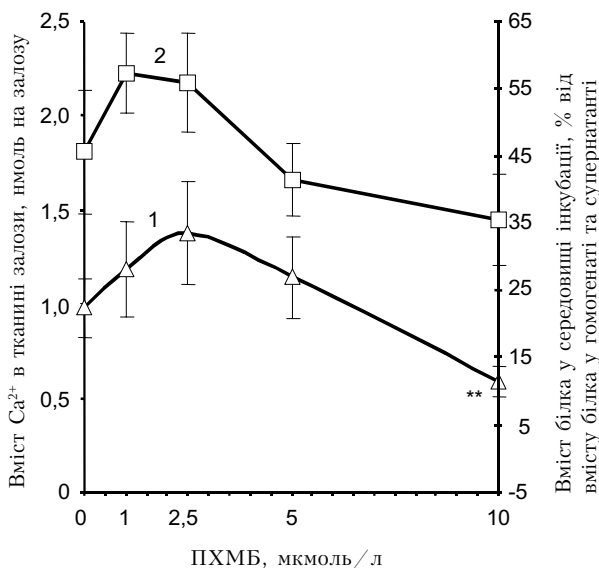
Таким чином, ПХМБ дійсно впливає на кальційтранспортні системи досліджуваних клітин, причому спрямованість цього впливу залежить від його концентрації. Це вказує на те, що він впливає не на одну, а на кілька кальційтранспортних систем, які, до того ж, характеризуються різною чутливістю до нього.

Для перевірки висловленого міркування ми додавали ПХМБ у тих же концентраціях до гіпонатрієвого середовища інкубації залоз, коли $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник транспортує катіони Ca^{2+} у клітини [4, 16], функціонуючи у зворотному режимі ($n\text{CDm}_{\text{Na}} < \text{Dm}_{\text{Ca}}$). З'ясувалось, що за цих умов ПХМБ у концентрації 1 мкмоль/л підвищував вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз на 26,72 %, тоді як вміст білка у середовищі інкубації був меншим за контроль. Внаслідок додавання до інкубаційного розчину блокатора у концентрації 2,5, 5,0 та 10,0 мкмоль/л відбувалось зменшення досліджуваних показників: вмісту Ca^{2+} у залозах у середньому на 39,63, 49,64 і 48,93 %, а вмісту білка у середовищі інкубації – на 8,98, 23,31 і 18,48 % відповідно (рис. 2).

Найімовірніше, що підвищення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз при дії ПХМБ у концентрації 1 мкмоль/л спричинене стимуляцією натрійзалежного входу Ca^{2+} (зворотного режиму функціонування $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника). Проте не можна відкидати і тієї можливості, що ПХМБ змінює одночасно і функціональну активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани чи Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулама.

Для того, щоб з'ясувати, зміни функціонування якої кальційтранспортної системи досліджуваних клітин викликають підвищення вмісту Ca^{2+} у залозах внаслідок дії ПХМБ у низьких концентраціях, до гіпонатрієвого середовища інкубації необхідно було б додати специфічний блокатор однієї з цих систем транспорту Ca^{2+} . Оскільки специфічних блокаторів $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника не виявлено [8], то ми використали еозин Y, який, згідно з даними літератури, ефективно пригнічує Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани (K_i для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази солубілізованої із сарколеми гладком'язових клітин міометрію складає 0,8 мкмоль) та не впливає, на відміну від інших, на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник, розташований у тій же субклітинній структурі [8]. На досліджуваних слинних залозах нами встановлено [11], що він ефективно пригнічує функціонування кальцієвої помпи плазматичної мембрани у концентрації 5 мкмоль/л.

Рис.2. Зміни вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз (1) та вмісту білка у гіпонатрієвому середовищі інкубації (2) під впливом парахлормеркурійбензоату. $[\text{Na}]_e^+ = 35$ ммоль/л. $**P < 0,01$.



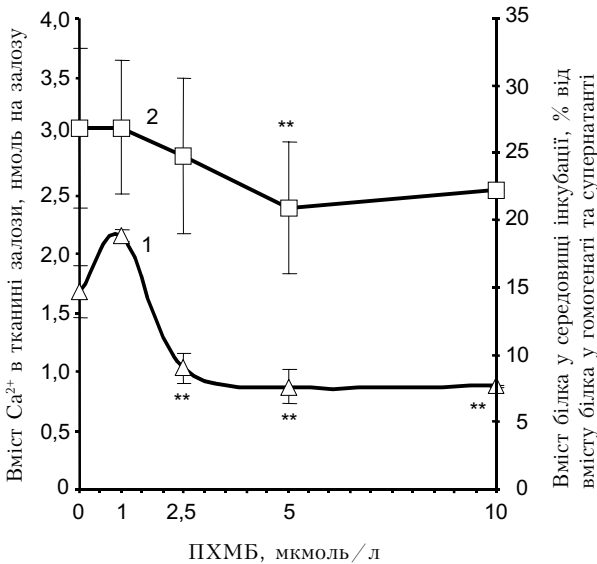
При додаванні до інкубаційного розчину еозину Y ПХМБ у концентрації 1 мкмоль/л викликав підвищення вмісту Ca^{2+} і вмісту білка в середовищі інкубації на 20,20 і 25,14 %, 2,5 мкмоль/л ПХМБ – на 39,4 та 21,98 %, 5 мкмоль/л – на 13,13 %, проте вміст білка при цьому зменшувався на 9,77 %. Внаслідок додавання до середовища ПХМБ у концентрації 10 мкмоль/л вміст Ca^{2+} у тканині залоз та білка у середовищі інкубації зменшувався на 40,4 та 22,3 % відповідно (рис. 3).

Оскільки зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз внаслідок додавання ПХМБ до гіпонатрієвого середовища у концентрації 2,5-5 ммоль/л (див. рис. 2) практично не спостерігається за наявності у середовищі еозину Y , ми маємо всі підстави вважати, що дане зменшення зумовлено зміною функціонування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани або (чи одночасно) мембрани ендоплазматичного ретикулула. А оскільки це зменшення спостерігалось за фізіологічної концентрації натрію у середовищі (правда, при концентрації ПХМБ 10 ммоль/л; див. рис. 1), ми робимо висновок, що воно зумовлено в основному пригніченням помпи ендоплазматичного ретикулула. Це створює несприятливі умови для акумуляції Ca^{2+} секреторними клітинами в гіпонатрієвому середовищі навіть за умови повного блокування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани.

Останнє зумовлене тим, що SH-групи в складі активного центру Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФази, як і інших ферментативних систем, характеризується високою специфічною чутливістю до реагентів, які утворюють меркаптиди [2]. Внаслідок цього похідні ртуті пригнічують транспортну Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФазу [18, 22, 28], а протектори SH-груп стимулюють її [25].

Збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз на фоні блокування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани еозином Y зумовлене, найімовірніше, стимуляцією $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обмінника у зворотному режимі.

Раніше нами було показано, що катіони Cd^{2+} (0,01 – 0,5 ммоль/л), які характеризуються високою спорідненістю до SH-груп амінокислотних



залишків [27], викликали підвищення амплітуди вхідного струму $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обміну мембрани досліджуваних клітин [6, 7] та збільшення вмісту Ca^{2+} у їх тканині і секреції білка, стимульованих гіпонатрієвим

Рис. 3. Зміни вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз (1) та вмісту білка у середовищі (2) внаслідок додавання до гіпонатрієвого інкубаційного розчину (136,9 ммоль/л NaCl) парахлормеркурійбензоату на фоні еозину Y (5 мкмоль/л). ** $P < 0,01$.

середовищем [15]. На основі цього ми припустили, що після зв'язування катіонів кадмію з обмінником вони транспортуються всередину клітин, де можуть взаємодіяти з сульфгідрильними групами у складі його регуляторного центру з наступними змінами в результаті цього його конфігурації.

Оскільки ПХМБ у низьких концентраціях стимулює функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, то очевидно, його активність визначається лише незначною кількістю SH-груп [2]. Наявні в літературі відомості доводять здатність катіонів ртуті та її органічних сполук ефективно стимулювати вхід Ca^{2+} у клітини через потенціалзалежні кальцієві-канали [28]. Тому логічно припустити, що зменшення вмісту Ca^{2+} у залозах та секреції при вищих концентраціях блокатора може бути викликане стимуляцією вхідного потоку Ca^{2+} через потенціалзалежні кальцієві канали як за умов фізіологічного, так і гіпонатрієвого середовища інкубації. Наявність потенціалозалежних кальцієвих каналів [3], які забезпечують, в тому числі, і стаціонарний вхід Ca^{2+} , доведена для клітин досліджуваних залоз [10].

Таким чином, з одержаних результатів слід зробити висновок, що блокатор сульфгідрильних груп ПХМБ викликає зміни функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулума та, можливо, потенціалзалежних кальцієвих каналів секреторних клітин травних залоз, що підтверджує важливу роль SH-груп у регуляції їх діяльності.

Підтвердженням важливої ролі сульфгідрильних груп у функціонуванні мембранних систем транспорту Ca^{2+} можуть служити виявлені нами зміни його вмісту у тканині досліджуваних залоз та секреції їх клітинами загального білка внаслідок дії протектора SH-груп ДТТ. З'ясувалось, що хоча додавання до гіпонатрієвого середовища інкубації залоз ДТТ у концентрації 0,01 ммоль/л не супроводжувалось достовірними змінами досліджуваних показників, у вищих концентраціях (0,1, 0,5, 1 та 5 ммоль/л) ДТТ спричинював збільшення вмісту Ca^{2+} у залозах у середньому на 15,66, 40,96, 53,01 та 24,10 %, а вміст білка у середовищі інкубації – зменшувався в середньому на 8,43, 17,17, 25,11 та 29,29 %. Власне таке збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз і одночасне зменшення рівня секреції свідчить про непрямую стимуляцію цією речовиною Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулума за рахунок хелатування катіонів важких металів, наявних у середовищі інкубації у слідових кількостях.

Робота виконана за сприяння Західно-Українського центру біомедичних досліджень

N. V. Fedirko, V. V. Manko, M. Yu. Klevets

INFLUENCE OF p-CHLORMERCURIBENZOATE AND DITHIOHREITOL ON THE Ca^{2+} CONTENT IN THE SALIVARY GLANDS AND THEIR PROTEIN SECRETION

It has been shown, less concentrations of p-chlormercuribenzoate (1 and 2,5 mM) increased Ca^{2+} content in gland tissue and thereby protein secretion level that may occurred mainly by suppression Ca^{2+} -pump or /and stimulation of Na^+ - Ca^{2+} -exchange (both in cell plasma membrane) through modulation of SH-groups which form part of their molecules. Higher PCMB concentrations markedly decreased Ca^{2+} content in gland tissue as well as protein secretion. Effects of PCMB (5 and 10 mM), depending

on the direction of Na^+ - Ca^{2+} -exchange functioning (Ca^{2+} -efflux or Ca^{2+} -influx), were evoked or presumably by suppression of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump (at conditions Na^+ -dependent Ca^{2+} -efflux) or Na^+ -dependent Ca^{2+} -influx into the cells that clearly confirmed when PCMB was added on the background of eosin Y (specific Ca^{2+} -ATPase inhibitor). Possible role of potentialdependent Ca^{2+} -channels in the mediating of PCMB effects is discussed. Introducing of dithiothreitol (DTT) increased Ca^{2+} content in glands and decreased secretion level obviously by protection of SH-groups of cell Ca^{2+} -transporting systems and thereby diminished $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Finally, we confirm important functional role of SH-groups in the regulation of Ca^{2+} -homeostasis in secretory cells of exocrine glands.

Ivan Franko National University of Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. – 206 с.
2. Диксон М., Уэбб И. Ферменты / Под ред. А.И.Опарина.- Изд-во иностр. лит.,1961. – 726 с.
3. Клевець М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин // Физиол. журн. – 1992. – **38**, 3. – С. 70 – 75.
4. Клевець М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В. Дослідження нагромадження кальцію секреторними клітинами ізольованих слинних залоз личинки хірономуса та його значення для секреторного процесу – Львів: Львів. ун-т. 1996. – 22 с.: іл. 2.– Бібліогр.: 42 назв. – Укр. – Деп. в Укр. ІНТЕІ 29.10.96, N 87 – Ук 96.
5. Клевець М. Ю., Манько В. В., Федірко Н. В. Зависимость тока натрий-кальциевого обмена через мембрану клеток слюнной железы личинки хирономуса от pH внеклеточного раствора // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 1996. – **28**, 4/5. – С. 193–196.
6. Манько В.В. Вплив катіонів перехідних металів на Na^+ - Ca^{2+} -обмін плазматичної мембрани клітини // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70**, 6. – С. 3–12.
7. Манько В.В., Клевець М.Ю., Федірко Н.В. Вплив катіонів нікелю і кадмію на амплітуду вхідного струму Na - Ca -обміну мембрани секреторних клітин екзокринних залоз // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 1997. – **2**. – С. 214 – 215.
8. Слишченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Черныш И.Г. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg^{2+} , АТР-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. - 1998. – **63**, 6. - С. 812 - 819.
9. Горчинский Ю. Сера в белках. – М.: Наука, 1977. – 355 с.
10. Федірко Н.В., Клевець М.Ю. Докази стаціонарного входу Ca^{2+} у секреторні клітини слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. та його роль у базальній секретії // Физиол. журн. – 1999. - **45**, 4. – С. 84-92.
11. Федірко Н.В., Клевець М.Ю. Вплив еозину Y та ортованадату на стаціонарний вхід Ca^{2+} у секреторні клітини екзокринних залоз та базальну секретію // Физиол. журн. – 2000. - **46**, 6. - С. 3-9.
12. Beauge L., DiPolo R. Chemical modification of intracellular sulfhydryl groups drastically modifies the affinity of the Ca_i regulatory site of the Na/Ca exchanger // Biophysical J. - 1992. - **61**. - P. A388. - 2236.
13. Busselberg D. Calcium channels as target sites of Heavy metals // Toxicol. Lett. - 1995. - **12**, 82/83. - P. 255-261.
14. Egger M., Ruknudin A., Niggli E. et al. Ni^{2+} uptake mediated by the human cardiac Na - Ca exchange // Abstract of 41st Annual Meeting of the Biophysical Society, New Orleans, Louisiana, USA. - Biophys. J. - 1997. - **72**, N 2, part 2. - P. A164. - Tu-Pos145.
15. Fedirko N., Klevets M., Manko V. Modulation influence of Cd^{2+} and La^{3+} on Na -dependent Ca^{2+} influx in exocrine secretory cells and secretory process //

- III International Congress of Pathophysiology, Lahti, Finland, 28 June – 3 July 1998: Abstract book. – Pathophysiology. – 1998. – **5**, Suppl. 1, June. – P. 134.
16. *Fedirko N.V., Klevets M.Yu., Manko V.V.* Investigation of the role of Na-Ca-exchanger of the secretory cell membrane in secretory process // XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, June 30 – July 5 1997: Abstracts. – St.Petersburg, 1997. – P015.11
 17. *Frame M.D.S., Milanick M.A.* Mn and Cd transport by the Na-Ca exchanger of ferret red blood cells // Amer. J. Physiol. - 1991. - **261**. - P. C467 - C475.
 18. *Lee, C., Okabe, E.* Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca-ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum. - Jpn. Pharmacol. - **67**, 1. – P. 21 - 28.
 19. *Lowry O.H., Rosenbrough N.H., Farr A.L., Kondall R.J.* Protein measurements with Folin protein reagent // J. Biol. Chem. - 1952. - **193**, N 2. - P. 265 - 275.
 20. *Monte D., Bellomo G., Thor H., Nicotera P., Orrenius S.* Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis // Arch. Biochem. and Biophys. - 1984. - **235**, 2. - P. 343-350.
 21. *Nicoll D.A., Longoni S., Philipson K.D.* Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na-Ca-exchanger // Science. – 1990. – **250**. – P. 78 – 81.
 22. *Senchuk, V.V., Pikulev, A.T., Dashkevich, I.N.* Study of the modification of histidine residues, SH- and epsilon-NH₂-groups of rat sarcoma-45 myosin by specific reagents // Biokhimiya. – **55**, 9. – P. 1648 – 1654.
 23. *Shepard K., Simkiss K.* The effects of heavy metal ions on Ca²⁺-ATPase extracted from fish gills // Comp. Biochem. Physiol. - 1978. - **61B**. - P. 69-72.
 24. *Smith J.B., Cragoe E.J., Smith L.* Na-Ca antiport in cultured smooth muscle cells. Inhibition by magnesium and other divalent cations // J. Biol. Chem. - 1987. - **262**, 25. - P. 11988 - 11994.
 25. *Takahashi, H., Yamaguchi, M.*, Role of regucalcin as an activator of Ca²⁺-ATPase activity in rat liver microsomes // J.Cell Biochem., - **74**, 4. – P. 663 – 669.
 26. *Tepikin, A.V., O.H.Petersen.* Mechanisms of cellular calcium oscillations in secretory cells // Biochim. et Biophys. acta. - 1992. - **1137**. - P. 197-207.
 27. *Valenzuela, Bender (1971)* - цит. За Ленинджер А. Биохимия: Пер. с англ. – М.: Мир, 1974. – 955 с.
 28. *Viarengo A., Nicotera P.* Possible role of Ca²⁺ in heavy metal cytotoxicity // Comp. Biochem. Physiol. - 1991. - **100C**, 1/2. - P. 81 -84.

Львів ун-т ім. Івана Франка
М-ва освіти і науки України

Матеріал надійшов
до редакції 4.09.2000