

А.Б. Котлярова<sup>1,2</sup>, В.М. Мерлавський<sup>1</sup>, О.М. Дорош<sup>1</sup>, В.В. Манько<sup>1</sup>

## Роль мітохондріального уніпортера у підтриманні кальцієвого гомеостазу секреторних клітин слюзової залози

<sup>1</sup>Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка; <sup>2</sup>Ін-т фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
E-mail: annkotliarova@gmail.com.ua

*Для встановлення ролі кальцієвого уніпортера мітохондрій у підтриманні кальцієвого гомеостазу в секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура досліджували його взаємозв'язки з іншими кальційтранспортними системами. Експерименти проведено на інтактних і пермеабілізованих дигітоніном клітинах. Ступінь взаємозалежності функціонування кальцієвого уніпортера та інших кальційтранспортних систем визначали на основі адитивності ефектів їхніх інгібіторів/агоністів, дія яких супроводжується зменшенням вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз. З'ясувалося, що за одночасного пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула та кальцієвого уніпортера мітохондрій  $Ca^{2+}$  пасивно вивільняється з різних депо, оскільки ефекти інгібіторів цих кальційтранспортних систем (тапсигаргіну і рутенію червоного) є адитивними. Подібно адитивними є процеси активації інозитол-1,4,5-трифосфатчутливих кальцієвих каналів і пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій. На відміну від цього, ефекти ріанодину і рутенію червоного на вміст  $Ca^{2+}$  у клітинах є статистично достовірно неадитивними. Крім того, ріанодин у концентраціях 1–3 мкмоль/л дозозалежно зменшував швидкість дихання досліджуваних клітин, і ефект зберігався за преінкубації клітин з рутенієм червоним чи тапсигаргіном. Отже, крім активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулула ріанодин пригнічує надходження  $Ca^{2+}$  у матрикс мітохондрій, яке нечутливе до рутенію червоного.*

*Ключові слова: кальцієвий уніпортер мітохондрій, рутеній червоний, кальцієва помпа ендоплазматичного ретикулула, інозитол-1,4,5-трифосфатчутливі кальцієві канали, ріанодинчутливі кальцієві канали, слюзові залози, секреторні клітини.*

### ВСТУП

Мітохондрії здійснюють комплексний вплив на регулювання кальцієвих сигналів у секреторних клітинах [1, 2]. Поглинання  $Ca^{2+}$  мітохондріями реалізується за рахунок функціонування у їхній внутрішній мембрані, зокрема, кальцієвого уніпортера, котрий є каналом [3] і для пригнічення якого часто застосовують рутеній червоний [4]. Нині є лише одна публікація, яка присвячена безпосередньому дослідженню функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій у клітинах слюзових залоз [5]. Автор статті з використанням флуоресцентних зондів вста-

новив, що рутеній червоний у концентрації 30 нмоль/л повністю пригнічував надходження  $Ca^{2+}$  у мітохондрії клітин слюзових залоз мишей. Крім того, пролонгована (протягом 2 год) стимуляція цих клітин агоністом М-холінорецепторів метахоліном супроводжується акумуляцією  $Ca^{2+}$  у мітохондріях. Ці дані є підтвердженням функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій в секреторних клітинах слюзових залоз, але його взаємодія з іншими кальційтранспортними системами клітини залишається нез'ясованою.

Метою нашої роботи було дослідити роль кальцієвого уніпортера мітохондрій у підтриманні кальцієвого гомеостазу в сек-

© А.Б. Котлярова, В.М. Мерлавський, О.М. Дорош, В.В. Манько

реторних клітинах зовнішньоорбітальної слъзової залози щура, а також його можливі взаємозв'язки з функціонуванням інших кальційтранспортних систем.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 52 нелінійних щурах масою 190–250 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

*Ізолювання секреторних клітин слъзової залози щура.* Після наркотизації хлороформом і декапітації тварини швидко виділяли зовнішньоорбітальну слъзову залозу (glandula orbitalis externa) та очищали її від сполучної тканини. Для ізолювання секреторних клітин використали модифікований метод Herzog і співавт. [6], як описано нами раніше [7]. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально під світловим мікроскопом з використанням барвника трипанового синього.

*Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин.* Плазматичну мембрану секреторних клітин слъзових залоз пермеабілізували дигітоніном («Fisher scientific», Великобританія); 50 мкг/мл у розрахунку на 0,5 млн клітин [7].

*Визначення вмісту  $Ca^{2+}$  у клітинах слъзових залоз.* Функціональну активність кальційтранспортних систем оцінювали за зміною вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз після інкубації (15 хв, 37°C) із відповідними інгібіторами чи агоністами. Склад середовища інкубації інтактних клітин (ммоль/л) був таким: NaCl – 119, KCl – 6, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, HEPES – 10, глюкоза – 10, NaHCO<sub>3</sub> – 25; (pH 7,4), а пермеабілізованих клітин: KCl – 140, MgCl<sub>2</sub> – 1,5, CaCl<sub>2</sub> – 0,0274, EGTA – 0,1 ( $[Ca^{2+}] \approx 10^{-7}$  моль/л), HEPES – 10; (pH 7,2). CaCl<sub>2</sub> використано фірми «Merck Chemicals» (Німеччина), інші речови-

ни-компоненти середовища інкубації фірми «Sigma-Aldrich» (США). Концентрацію  $Ca^{2+}$  визначали спектрофотометричним методом з використанням металохромного барвника арсеназо III за допомогою стандартного набору реактивів («Simko Ltd», Львів), як було описано раніше [8]. Для пригнічення кальцієвого уніпортера використовували рутеній червоний (10 мкмоль/л), кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулума – тапсигаргін («Sigma-Aldrich», США; 1 мкмоль/л), інозитол-1,4,5-трифосфат, (ІФ<sub>3</sub>)-чутливих кальцієвих каналів – 2-аміноетоксидифенілборат (2-АФБ; «Sigma-Aldrich», США; 10 мкмоль/л). Для активації ІФ<sub>3</sub>-чутливих кальцієвих каналів застосовували ІФ<sub>3</sub> («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 2 мкмоль/л і карбахолін у концентрації 10 мкмоль/л, а ріанодинчутливих кальцієвих каналів – ріанодин («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 0,1 мкмоль/л.

Для з'ясування ступеня взаємозалежності функціонування кальцієвого уніпортера та інших кальційтранспортних систем визначали адитивність ефектів їхніх інгібіторів/агоністів, дія яких супроводжується зменшенням вмісту  $Ca^{2+}$  у тканині залоз. Для цього в одній серії порівнювали зміни вмісту  $Ca^{2+}$  під впливом рутенію червоного ([K – A]), інгібітора/активатора іншої кальційтранспортної системи ([K – B]) та за дії обох речовин ([K – {A + B}]). Адитивними вважали ефекти таких речовин, за дії яких сума ефектів статистично достовірно з  $P_a \geq 0,05$  не відрізняється від їхнього ефекту за одночасної дії:

$$[K - A] + [K - B] \approx [K - \{A + B\}].$$

Відповідно, неадитивними є ефекти тих речовин, для яких статистично достовірно  $P_a \leq 0,05$ :

$$[K - A] + [K - B] > [K - \{A + B\}].$$

*Дослідження інтенсивності поглинання клітинами кисню.* Інтенсивність споживання кисню інтактними клітинами визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі полярографа YSI 5300, електрода Кларка, цифрового вольтме-

тра, комп'ютера та закритої термостатованої комірки об'ємом 1,6 мл при 37 °С. Інтенсивність поглинання кисню обчислювали виходячи із того, що в 1 мл суспензії розчинено 200 нмоль O<sub>2</sub>.

Склад середовища, яке використовували для полярографії, був таким (ммоль/л): NaCl – 119, KCl – 6, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкоза – 10, NaHCO<sub>3</sub> – 25, глютамін – 2, піруват – 2; рН 7,4. Для роз'єднання дихання та окисного фосфорилування застосовувався FCCP (1 мкмоль/л; «Sigma-Aldrich», США).

*Статистичний аналіз результатів досліджень.* Математично-статистичне опрацювання результатів здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за критерієм t Стьюдента, за статистично достовірні приймали зміни з P < 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виявлення можливих взаємозв'язків функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій і кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула секреторних клітин слюзових залоз спочатку ми перевірили, як впливає рутеній червоний на вміст Ca<sup>2+</sup> в інтактних і пермеабілізованих клітинах у контролі та

за наявності у середовищі специфічного інгібітора усіх відомих ізоформ кальцієвих помп ендоплазматичного ретикулула – тапсигаргіну.

З'ясувалося, що рутеній червоний зменшував вміст Ca<sup>2+</sup> в інтактних клітинах на 14,22 ± 5,42 %, а у пермеабілізованих – на 24,59 ± 9,09 % (рис. 1, а, б). Статистично достовірної різниці між ефектами рутенію червоного на вміст Ca<sup>2+</sup> у інтактних і пермеабілізованих клітинах не зареєстровано; спостерігалася лише певна тенденція до більш вираженого ефекту рутенію червоного у пермеабілізованих клітинах, що може бути зумовлено кращою доступністю інгібітора до мітохондрій.

Додавання тапсигаргіну до інтактних і пермеабілізованих клітин спричиняло статистично достовірне зменшення вмісту Ca<sup>2+</sup> у них на 17,72 ± 5,82 і 21,06 ± 6,52 % відповідно – за рахунок пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула, що узгоджується з отриманими раніше даними [9]. Як в інтактних, так і у пермеабілізованих клітинах сумарні ефекти рутенію червоного і тапсигаргіну становили 29,62 ± 5,37 і 33,15 ± 7,73 % відповідно (P < 0,01) і були такими самими, як сума ефектів кожної з цих речовин окремо, тобто адитивними (P<sub>a</sub> = 0,74 і 0,19). Це свідчить про те, що Ca<sup>2+</sup> за дії цих двох інгібіторів пасивно вивільняється з різних депо.

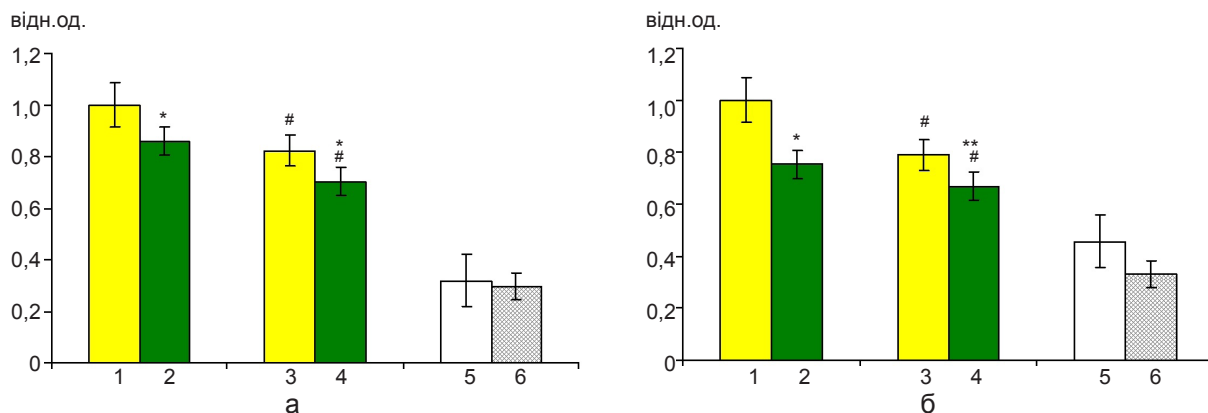
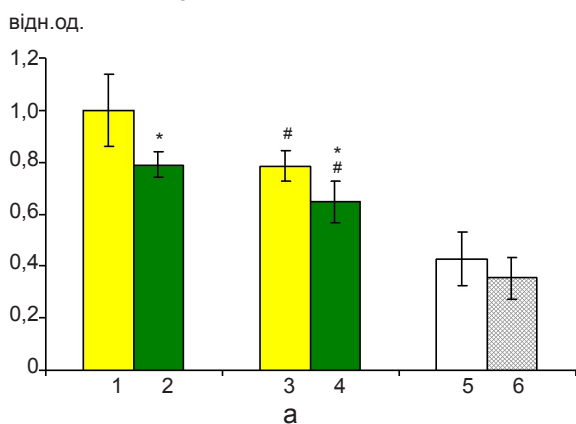


Рис. 1. Вплив рутенію червоного на вміст Ca<sup>2+</sup> у інтактних (а) і пермеабілізованих (б) клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура залежно від наявності тапсигаргіну у середовищі інкубації: 1 – контроль, 2 – рутеній червоний, 3 – тапсигаргін, 4 – одночасна дія обох інгібіторів, 5 – алгебраїчна сума змін вмісту Ca<sup>2+</sup> за окремої дії рутенію червоного і тапсигаргіну, 6 – зміна вмісту Ca<sup>2+</sup> за одночасної дії тапсигаргіну і рутенію червоного; вміст Ca<sup>2+</sup> у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила інгібіторів/агоністів; \* різниця достовірна стосовно контролю з P < 0,05, \*\*P < 0,01; # різниця достовірна стосовно відповідної проби без інгібітора/агоніста з P < 0,05; n = 6–7

Цікавим є і те, що 2-АФБ – речовина, яку використовують як інгібітор  $I\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів [10], також спричиняла достовірне зменшення вмісту  $Ca^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз на  $24,44 \pm 7,05$  % ( $P < 0,01$ ,  $n = 7$ ). Це узгоджується з нашими попередніми даними [11] і зумовлене інгібуванням кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула, оскільки за пригнічення  $I\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів вміст  $Ca^{2+}$  у тканині залоз повинен збільшуватися. У разі пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій рутенієм червоним 2-АФБ-індуковане зменшення вмісту  $Ca^{2+}$  у клітинах було практично таким самим і становило  $19,23 \pm 2,42$  % ( $P < 0,01$ ). Ефекти 2-АФБ і рутенію червоного на вміст  $Ca^{2+}$  у досліджуваних клітинах є адитивними ( $P_a = 0,27$ ).

Для виявлення можливих взаємозалежностей функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій і систем вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулула ми вирішили перевірити, як впливає рутеній червоний на вміст  $Ca^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз за умов активації  $I\Phi_3$ - і ріанодинчутливих кальцієвих каналів. Активация  $I\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів за допомогою  $I\Phi_3$  спричиняла зменшення вмісту



$Ca^{2+}$  у них на  $21,03 \pm 5,05$  %, що узгоджується з даними, отриманими раніше [8]. На тлі дії рутенію червоного це  $I\Phi_3$ -індуковане зменшення становило  $18,32 \pm 5,67$  % (рис. 2,а), але сума змін вмісту  $Ca^{2+}$  за дії цих речовин окремо не відрізнялася від зміни вмісту  $Ca^{2+}$  за одночасної їх дії. Отже, і у цьому разі ефекти досліджуваних речовин є адитивними ( $P_a = 0,13$ ), що свідчить про дію  $I\Phi_3$  та рутенію червоного на різні кальцієві депо. Цей висновок підтвердився і під час дослідження адитивності ефекту агоніста М-холінорецепторів – карбахоліну та рутенію червоного на цілісні клітини. Відомо, що в інтактних секреторних клітинах сльозових залоз ефект карбахоліну значною мірою реалізується активацією  $I\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів [8]. У цій серії дослідів клітини інкубували у номінально безкальцієвому середовищі з метою запобігання депокерованого входу  $Ca^{2+}$ . За таких умов під впливом карбахоліну вміст  $Ca^{2+}$  у клітинах зменшувався на  $20,78 \pm 2,96$  % (див. рис. 2,б). Пригнічення рутенієм червоним кальцієвого уніпортера мітохондрій не впливає на карбахолініндуковані зміни вмісту  $Ca^{2+}$  в інтактних і пермеабілізованих секреторних клітинах сльозових залоз. Тобто ефекти цих речовин також виявились адитивними ( $P_a = 0,32$ ).

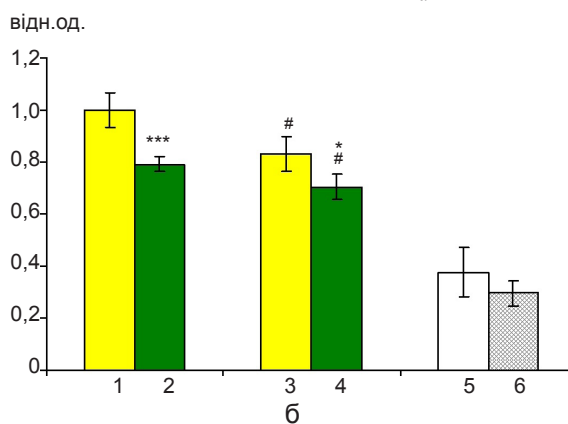


Рис. 2. Залежність впливу інозитол-1,4,5-трифосфату ( $I\Phi_3$ ) (а) і карбахоліну (б) на вміст  $Ca^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах зовнішньоорбітальної сльозової залози щура від наявності рутенію червоного у середовищі інкубації: 1 – контроль, 2 –  $I\Phi_3$  чи карбахолін, 3 – рутеній червоний, 4 – дія обох речовин, 5 – алгебраїчна сума змін вмісту  $Ca^{2+}$  за окремої дії  $I\Phi_3$ /карбахоліну і рутенію червоного, 6 – зміна вмісту  $Ca^{2+}$  за одночасної дії обох речовин. Вміст  $Ca^{2+}$  у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила інгібіторів/агоністів; \* різниця достовірна стосовно контролю з  $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; # різниця достовірна стосовно відповідної проби без інгібітора/агоніста з  $P < 0,05$ ;  $n = 6-7$

Активация рiанодинчутливих кальцiєвих каналiв пермеабiлiзованих клiтин слiзових залоз рiанодином супроводжувалася зменшенням вiмiсту  $Ca^{2+}$  у них на  $34,00 \pm 7,24$  % (рис. 3,а). Одночасне додавання до середовища iнкубацiї рiанодину i рутенiю червоного супроводжувалося дещо бiльш вираженим зменшенням цього показника  $Ca^{2+}$  у клiтинах – на  $50,11 \pm 6,37$  % ( $P < 0,001$ ). Але ефекти цих дiючих речовин – рiанодину i рутенiю червоного – виявилися статистично достовiрно ( $P_a = 0,04$ ) неадитивними.

Вiдсутнiсть ефекту рiанодину на тлi рутенiю червоного може бути зумовлена кiлькама чинниками. По-перше, рутенiй червоний пригнiчує рiанодинчутливі кальцiєві канали ендоплазматичного ретикулума, що ранiше було продемонстровано, зокрема, для незбудливих клiтин [12]. Але описанi ефекти цiєї сполуки на вiмiст  $Ca^{2+}$  у тканинi слiзової залози, на нашу думку, не пов'язанi з цим, оскiльки зниження функцiональної активностi таких каналiв повинно супроводжуватися збiльшенням (а не зменшенням) цього показника.

Можна припустити також, що ефект рiанодину зумовлений не лише вивiльненням  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума, але i з активацiєю рiанодинчутливих кальцiєвих

каналiв у мiтохондрiях, якi iдентифiкованi, наприклад, у внутрiшнiй мембранi мiтохондрiй кардiомiоцитiв i пригнiчуються рутенiєм червоним [13]. Цiлком можливо, що цi канали вiдiграють важливу роль у кальцiєвiй сигналяцiї i в секреторних клiтинах слiзових залоз. Для пiдтвердження чи спростування такого припущення ми перевiрили адитивнiсть ефектiв  $I\Phi_3$  та рiанодину. Одночасне додавання їх до середовища iнкубацiї супроводжувалося зменшенням вiмiсту  $Ca^{2+}$  у клiтинах, яке було таким самим, як за дiї кожної з цих речовин окремо ( $n = 5$ ; рис. 3,б). Їх ефекти були статистично достовiрно ( $P_a = 0,03$ ) неадитивними. Отже, рiанодин та  $I\Phi_3$  вивiльняють  $Ca^{2+}$  з одного i того самого депо. Даних про наявнiсть  $I\Phi_3$ -чутливих кальцiєвих каналiв у мiтохондрiях немає. Це дає змогу нам припустити, що рiанодинчутливі кальцiєві канали мiтохондрiй досліджуваних клiтин або вiдсутнi, або чутливі до рiанодину в iншому дiапазонi концентрацiй. У 2007 р., використовуючи метод patch-clamp мiтохондрiальної мембрани, показано [14], що вже за концентрацiї 10 мкмоль/л рiанодину рiанодинчутливі кальцiєві канали переходять у стан субнормальної провiдностi (субпровiдностi). Для рiанодинчутливих кальцiєвих

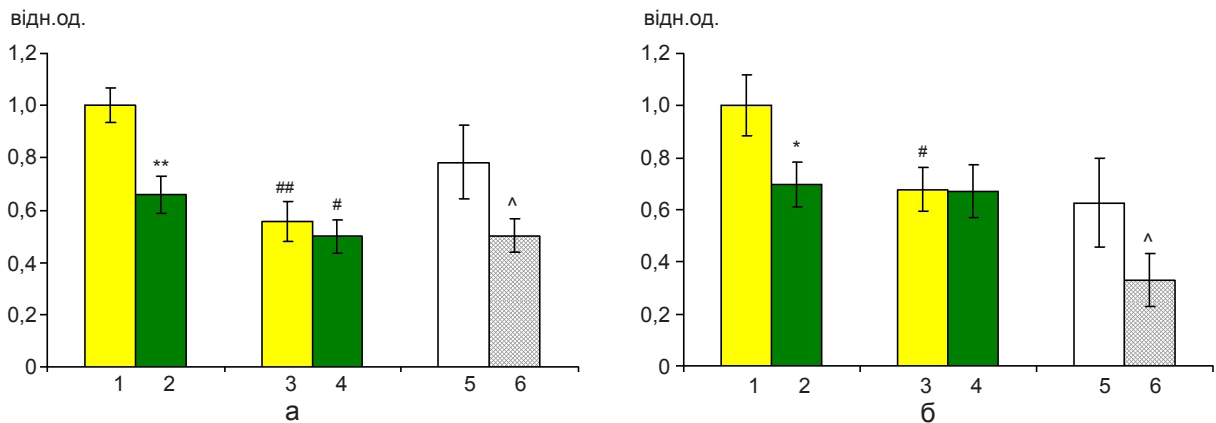


Рис. 3. Вплив рiанодину на вiмiст  $Ca^{2+}$  у пермеабiлiзованих клiтинах слiзових залоз за наявностi рутенiю червоного (а) та iнозитол-1,4,5-трифосфату ( $I\Phi_3$ ) (б): 1 – контроль, 2 – рiанодин, 3 – рутенiй червоний чи  $I\Phi_3$ , 4 – за одночасної дiї обох речовин, 5 – алгебраїчна сума змiн вiмiсту  $Ca^{2+}$  за окремої дiї рiанодину та рутенiю червоного/ $I\Phi_3$ , 6 – змiна вiмiсту  $Ca^{2+}$  за одночасної дiї обох речовин. Вiмiст  $Ca^{2+}$  у тканинi нормалiзували, прийнявши за одиницю його значення у пробi, котра не мiстила iнгiбiторiв/агонiстiв; \* рiзниця достовiрна стосовно контролю з  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; # рiзниця достовiрна стосовно вiдповiдної проби без iнгiбiтора/агонiста з  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,001$ ; ^ достовiрна рiзниця мiж сумою змiн за окремої дiї двох речовин та змiною за їхньої одночасної дiї ( $P_a < 0,05$ );  $n = 5-6$



каналів ендоплазматичного ретикулума цей стан настає за концентрації ріанодину понад 70 мкмоль/л [15].

Для того, щоб з'ясувати, чи впливає ріанодин на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях досліджуваних клітин, ми вивчили його вплив на споживання ними кисню. Вважається, що  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій активує ферменти циклу Кребса – піруват-,  $\alpha$ -кетоглутарат- та ізоцитратдегідрогеназу, що супроводжується збільшенням інтенсивності мітохондріального дихання [16].

На підставі отриманих даних ми зробили висновок, що ріанодин (1–3 мкмоль/л) пригнічує (!) надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, оскільки дозозалежно зменшує швидкість дихання (рис. 4).

Статистично достовірних змін у диханні за дії ріанодину у концентрації 100 нмоль/л не виявлено, а у концентрації 1, 2 і 3 мкмоль/л швидкість дихання досліджуваних клітин зменшувалася на  $11,22 \pm 3,25$ ,  $19,61 \pm 4,10$  і  $30,06 \pm 5,60$  % відповідно. Це є наслідком, на нашу думку, пригнічення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій. І цей ефект зберігався за преінкубації клітин з рутенієм червоним чи тапсигаргіном.

Роз'єднувач дихання і окисного фосфорилювання ціанід-р-трифлуорометоксифенілгідрозон (FCCR) у контролі збільшував інтен-

сивність дихання секреторних клітин слюзових залоз на  $96,79 \pm 8,09$  %, що свідчить про високу їхню життєздатність [17]. Збільшення інтенсивності дихання під впливом (FCCP) при додаванні до середовища ріанодину статистично достовірно не відрізняється від такого у контролі у жодному із наведених варіантів досліду.

Отже, ріанодин у зазначених концентраціях не лише активує ріанодинчутливі кальцієві канали ендоплазматичного ретикулума чи інших немітохондріальних депо, а й пригнічує нечутливий до рутенію червоного транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій. В обох випадках така дія ріанодину повинна спричиняти зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах.

Відомо, що у багатьох клітинах активація акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях відбувається завдяки тісному контакту мембран ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій [1, 18, 19]. Зокрема, продемонстровано наявність складної взаємодії  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів і кальцієвого уніпортера мітохондрій [2, 20]. У 2012 р. групою авторів [1] запропоновано модель такої взаємодії. Вона передбачає формування ендоплазматично-мітохондріального зв'язку, утворення і функціонування якого регулюється великою кількістю шаперонів, сигнальних і регулятор-

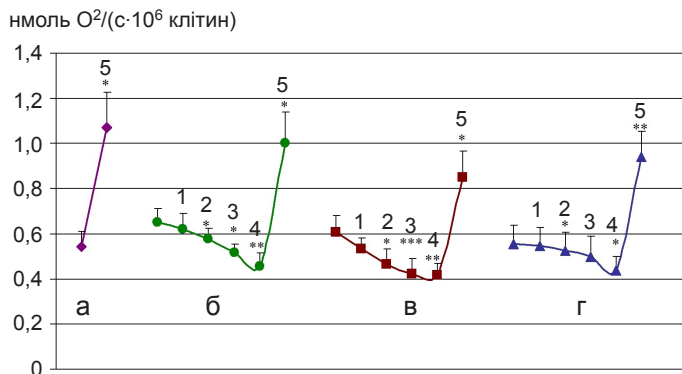


Рис. 4. Вплив ріанодину та FCCP на інтенсивність дихання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози за пригнічення кальційтранспортних систем: а – контроль, б – дія ріанодину, в – дія ріанодину на тлі рутенію червоного, г – на тлі тапсигаргіну; 1, 2, 3, 4 – додавання ріанодину до кінцевої концентрації 0,1, 1, 2 і 3 мкмоль/л, 5 – додавання FCCP (1 мкмоль/л), \* різниця достовірна стосовно проби без додавання ріанодину чи FCCP з  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ,  $n = 5$

них білків. У міжмембранному просторі мітохондрії виникають кальцієві мікродомени (ділянки з підвищеною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ ) у відповідь на активацію потенціалкерованих аніонних каналів зовнішньої мембрани мітохондрії. Після цього  $\text{Ca}^{2+}$  акумулюється у матриксі мітохондрій завдяки функціонуванню кальцієвого уніпортера у внутрішній мітохондріальній мембрані. Взаємодію потенціалкерованих аніонних та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів опосередковує шаперон GRP75, пришвидшуючи цим поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями [1]. Тим не менше, у гладеньком'язових клітинах аорти [21], вентрикулярних міоцитах [22], хромафінних клітинах [23] наявний виражений зв'язок між кальцієвим уніпортером мітохондрій і ріанодинчутливими кальцієвими каналами.

Вищенаведені дані є свідченням важливої ролі кальцієвого уніпортера мітохондрій у кальцієвій сигналізації різних клітин. Про функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій секреторних клітин слизових залоз і його взаємозв'язок з іншими кальційтранспортними системами дійсно відомо мало.

Нами встановлено, що за одночасного пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулума і кальцієвого уніпортера мітохондрій секреторних клітин слизових залоз  $\text{Ca}^{2+}$  пасивно вивільняється з різних депо, оскільки ефекти інгібіторів цих кальційтранспортних систем є адитивними. Адитивними є і процеси активації  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів і пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій.

Тим не менше, депонований  $\text{Ca}^{2+}$  вивільняється з ендоплазматичного ретикулума під час стимуляції клітин слизових залоз агоністами (наприклад, карбахоліном)  $\text{I}\Phi_3$ -чутливими кальцієвими каналами [8]. Цей процес супроводжується підвищенням цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , як наслідок, активацією ріанодинчутливих кальцієвих каналів. Це в свою чергу спричиняє акумуляцією  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях [5] і наступну активацію мітохондріального дихання [24],

що має важливе загальнобіологічне значення, оскільки дає змогу реалізувати регуляцію мітохондріального дихання за рахунок прямого позитивного зв'язку – заздалегідь до того, як виникає нестача АТФ і запускається зворотні регуляторні впливи, гомеостатичні (а не сигнальні) за своєю суттю. Здійснюється така акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі кальцієвим уніпортером і чутливими до рутенію червоного ріанодинчутливими кальцієвими каналами внутрішньої мембрани мітохондрій.

Отже, у секреторних клітинах слизових залоз функціонує кальцієвий уніпортер мітохондрій, який пригнічується рутенієм червоним. За одночасного його інгібування і кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулума  $\text{Ca}^{2+}$  вивільняється з різних депо. Подібну картину спостерігали і за активації  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів. Ріанодин, крім активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулума, пригнічує надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, нечутливе до рутенію червоного.

**А.Б. Котлярова, В.М. Мерлавський,  
О.М. Дорош, В.В. Манько**

### **РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО УНИПОРТЕРА В ПОДДЕРЖАННІ Кальцієвого ГОМЕОСТАЗА СЕКРЕТОРНИХ КЛІТОК СЛЕЗНОЇ ЖЕЛЕЗИ**

Для исследования роли кальциевого унипортера митохондрий в поддержании кальциевого гомеостаза в секреторных клетках *внеглазничной* слезной железы крысы изучали его взаимосвязи с другими кальцийтранспортными системами. Эксперименты выполнены на интактных и пермеабиллизированных дигитонином клетках. Степень взаимозависимости функционирования кальциевого-унипортера и других кальцийтранспортных систем определяли на основе аддитивности эффектов их ингибиторов/агонистов, действие которых сопровождается уменьшением содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в ткани желез. Выяснилось, что при одновременном ингибировании кальциевого насоса эноплазматического ретикулума и кальциевого унипортера митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  пассивно высвобождается из различных депо, поскольку эффекты ингибиторов этих кальцийтранспортных систем (тапсигаргина и рутения красного) являются аддитивными. Также аддитивные процессы активации инозитол-1,4,5-трифосфатчувствительных кальциевых каналов и ингибирования кальциевого унипортера митохондрий. В

отличие от этого, эффекты рианодина и рутения красного на содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках являются статистически достоверно неаддитивными. Кроме того, рианодин в концентрации 1–3 мкмоль/л дозозависимо уменьшал скорость дыхания исследуемых клеток, и этот эффект сохранялся после преинкубации клеток с рутением красным или тапсигаргином. Это позволяет предположить, что кроме активации рианодинчувствительных кальциевых каналов эндоплазматического ретикула рианодин ингибирует поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс митохондрий, которое нечувствительно к рутению красному.

Ключевые слова: кальциевый уніпортер митохондрий, рутений красный, кальциевый насос эндоплазматического ретикула, инозитол-1,4,5-трифосфат чувствительные кальциевые каналы, рианодинчувствительные кальциевые каналы, слезные железы, секреторные клетки.

**A.B.Kotliarova<sup>1,2</sup>, V.M. Merlavs'ky<sup>1</sup>, O.M. Dorosh<sup>1</sup>, V.V. Manko<sup>1</sup>**

### THE ROLE OF MITOCHONDRIAL UNI-PORTER IN CALCIUM-HOMEOSTASIS OF THE EXORBITAL LACRIMAL GLAND SECRETORY CELLS

The role of mitochondrial calcium-uniporter in calcium-homeostasis maintenance and correlations of calcium-uniporter with other calcium-transport systems of the rat exorbital lacrimal gland secretory cells were studied. The experiments were performed on intact and digitonin-permeabilized cells. The interdependence of calcium-uniporter and other calcium-transporting systems functioning was estimated on the basis of additivity of their inhibitors/agonists effects, which was accompanied with a decrease in the  $\text{Ca}^{2+}$  content in the gland cells. It was found that in conditions of simultaneously inhibition of sarco endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) and mitochondrial calcium-uniporter  $\text{Ca}^{2+}$  passively released from different calcium stores, because the effects of these calcium-transport systems inhibitors (thapsigargin and ruthenium red, respectively) were additive. Similarly, the processes of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) activation and Calcium-uniporter inhibition were additive. In contrast, the effects of ryanodine and ruthenium red on the  $\text{Ca}^{2+}$  content in cells were significantly non-additive. In addition, ryanodine at concentrations 1–3  $\mu\text{M}$  reduced respiration rate of studied cells in dose-dependent manner, and this effect was persisted at cells preincubation with ruthenium red or thapsigargin. Thus, besides the activation of ryanodine receptors (RyRs) in endoplasmic reticulum, ryanodine inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx to the mitochondrial matrix, that was insensitive to ruthenium red.

Key words: Calcium-uniporter of mitochondria, ruthenium red, sarcoendoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), inositol-1,4,5-trisphosphate receptors ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), ryanodine receptors (RyRs), lacrimal glands, secretory cells.

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of L'viv;

<sup>2</sup>Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv

### REFERENCES

1. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):566–78.
2. Zimmermann B. Control of  $\text{InsP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol.* 2000;525(3): 707–19.
3. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 2004;427(6972):360–4.
4. Griffiths EJ. Use of ruthenium red as an inhibitor of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in single rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2000; 486(3):257–60.
5. Bird G St J, Obie JF, and Putney JW Jr. Functional homogeneity of the non-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  pool in intact mouse lacrimal acinar cells. *Biol Chem Journ.* 1992;267(26):18382–86.
6. Herzog V, Sies H, Miller F. Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. Peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation. *J Cell Biol.* 1976;70:692–706.
7. Kotliarova A, Manko V. Permeabilized secretory cells of rats exorbital lacrimal glands as a model for  $\text{Ca}^{2+}$ -transport systems study. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Biological series.* 2013;64(2):11–5.
8. Kotliarova AB, Manko VV.  $\text{IP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland. *Ukr Biochem Journ.* 2013;85(5):27–36. [Ukrainian].
9. Kotliarova AB, Manko VV.  $\text{Ca}^{2+}$  transporting systems in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland I  $\text{Ca}^{2+}$  pumps of plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Studia Biologica.* 2012;6(2):99–114. [Ukrainian].
10. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J Biochem.* 1997;122(3):498–505.
11. Kotliarova A., Manko V. Effect of 2-APB on SERCA of lacrimal gland secretory cells. *Exp Clin Physiol Biochem.* 2013;(3):38–43. [Ukrainian].
12. Ozawa T. Ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanism in non-excitabile cells. *Int J Mol Med.* 2001;7(1):21–5.
13. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci D, Yule D, Sheu S-S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21482–8.
14. Altschafel BA, Beutner G, Sharma VK, Sheu SS, Valdivia HH. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmacokinetic profile. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(7):1784–95.
15. Buck E, Zimanyi I, Abramson JJ, Pessah IN. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 1992; 267:23560–7.



16. Denton RM, McCormack JG. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS Lett. 1980;119(1):1–8.
17. Brand DM, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem J. 2011;435:297–312.
18. Kohlhaas M, Maack Ch. Calcium release microdomains and mitochondria. Cardiovasc Res. 2013;98(2):259–68.
19. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F, Fogarty K, Lifshitz L et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. Science. 1998;280(5370):1763–66.
20. Hajnóczky G, Hager R, Thomas AP. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by Ca<sup>2+</sup>. J Biol Chem. 1999;274:14157–62.
21. Vallot O, Combettes L, Lompré A-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. Biochem J. 2001;357(Pt 2):363–71.
22. Sharma VK., Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu S-S. Transport of Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. J Bioenerg Biomembr. 2000;32(1):97–104.
23. Montero M, Alonso M, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García A et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. Nat Cell Biol. 2000;2(2):57–61.
24. Kotliarova AB, Manko BO, Manko VV. The effect of carbacholine on respiration of the rat exorbital lacrimal cells. Actual problems of Humanities and Sciences. 2013;12(2):41–3. [Russian].

*Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка;  
Ин-т фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: annkotliarova@gmail.com*

*Матеріал надійшов  
до редакції 28.03.2014*