

ІДЕНТИФІКАЦІЯ КАНАЛІВ ВИВІЛЬНЕННЯ Ca^{2+} В СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИНАХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ КОМАРА-ДЕРГУНА

В. В. МАНЬКО, С. В. БИЧКОВА, М. Ю. КЛЕВЕЦЬ

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

С целью идентификации в секреторных клетках слюнной железы личинки *Chironomus plumosus* L. инозитолтрифосфат- и рианодинчувствительных Ca^{2+} -каналов исследовано влияние их блокаторов и активаторов на содержание Ca^{2+} в ткани. Для большей эффективности действия этих веществ экспериментально подобраны условия пермеабиллизации секреторных клеток сапонином.

Установлено, что инозитолтрифосфат вызывает снижение содержания Ca^{2+} в ткани слюнных желез, обработанных сапонином. Его действие полностью блокируется гепарином (блокатор инозитолтрифосфатчувствительных Ca^{2+} -каналов) и эозином Y (блокатор Ca^{2+} -насосов), хотя сам гепарин существенно не влияет на содержание Ca^{2+} в ткани желез. Предполагается, что эффект инозитолтрифосфата обусловлен наличием во внутриклеточных мембранах исследуемых секреторных клеток инозитолтрифосфатчувствительных Ca^{2+} -каналов.

Вследствие добавления в среду инкубации гепарина содержание Ca^{2+} в ткани интактных слюнных желез достоверно увеличивается при наличии в них верапамила и эозина Y и, таким образом, не связано с функционированием ни потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, ни Ca^{2+} -насосов.

Рианодин в концентрации 5 нМ уменьшает содержание Ca^{2+} в ткани железы, обработанной сапонином, а в концентрации 500 нМ — увеличивает, что свидетельствует о наличии в исследованных секреторных клетках рианодинчувствительных Ca^{2+} -каналов. Возможно, эти каналы относятся к кофеинчувствительным, поскольку кофеин существенно не влияет на содержание Ca^{2+} в ткани желез ни в отсутствие эозина Y в среде инкубации, ни при его наличии.

К л ю ч е в ы е с л о в а: IP_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы, рианодинчувствительные Ca^{2+} -каналы, экзокринные секреторные клетки, слюнные железы, *Chironomus plumosus* L.

Протягом останніх років внаслідок застосування методів, які дозволяють досліджувати зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$), було виявлено, що кальцієві сигнали в секреторних клітинах є значно витонченішим і складнішим механізмом, ніж просте підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} до певного порогового рівня. Ця комплексна відповідь включає повторювані коливання (осциляції) чи хвилі концентрації Ca^{2+} . Підвищення концентрації агоніста збільшує загальну частоту цих коливань, але незначно впливає на їхню амплітуду. Це дає змогу припустити, що первинний сигнал агоніста перетворюється у внутрішньоклітинний кальцієвий частотний сигнал. У поляризованих секреторних клітинах часові і просторові характеристики кальцієвого сигналу мають ще складніший характер у зв'язку з наявністю тісно розташованих "тригерних зон", де реалізуються зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} без ефекту на інші ділянки цитозолу [1].

Одним із найважливіших механізмів, які

забезпечують генерацію кальцієвих осциляцій в секреторних клітинах, є, мабуть, внутрішньоклітинні інозитол-1,4,5-трифосфатчутливі (IP_3 -чутливі) та рианодин(кофеїн)чутливі Ca^{2+} -канали. Так, ще у 1990 р. на ацинарних клітинах підшлункової залози мишей було показано, що викликані ацетилхоліном кальцієві осциляції є наслідком вивільнення депонованого Ca^{2+} кофеїнчутливими каналами, яке запускається незначним вивільненням Ca^{2+} із IP_3 -чутливого депо [2]. Сьогодні детально розробляється схема (модель) участі IP_3 - і рианодинчутливих Ca^{2+} -каналів у генерації кальцієвих осциляцій залежно від просторової організації ацинарних клітин екзокринних залоз вищих тварин і типу стимулятора [3,4].

Секреторні клітини екзокринних залоз нижчих тварин, до яких належать слинні залози личинки комара-дергуна, за структурною організацією дещо відрізняються від секреторних клітин екзокринних залоз вищих тварин. Але якщо функціональні зв'язки між різними Ca^{2+} -транспортувальними системами, що є основою генерації кальцієвих осциляцій, мають загальнобіо-

логічне значення, то вони повинні бути притаманні також секреторним клітинам слинних залоз личинок комах, хоча можуть мати і деякі особливості. Аналіз цих особливостей та їхнього зв'язку із структурною організацією клітин дозволить з'ясувати роль певної Ca^{2+} -транспортної системи в формуванні кальцієвого сигналу, його часових і просторових параметрів.

Першим етапом у дослідженні вкладу певної Ca^{2+} -транспортної системи в генерацію кальцієвих осциляцій є її ідентифікація. Раніше нами встановлено, що в секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна функціонують потенціалкеровані Ca^{2+} -канали [5,6], Na^{+} - Ca^{2+} -обмінник [7], Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани і мембрани ендоплазматичного ретикулула [8], а також Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій [9]. У внутрішньоклітинних мембранах постулюється також наявність кофеїн(ріанодин)чутливих Ca^{2+} -каналів [10]. Щодо Ca^{2+} -каналів у внутрішньоклітинних мембранах досліджуваних клітин, які б активувалися збільшенням цитозольного рівня IP_3 , відомості відсутні, у зв'язку з чим метою цієї роботи є ідентифікація в секреторних клітинах слинних залоз личинок комара-дергуна IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів та спроба знайти пряме підтвердження наявності ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів. Але успішне виконання цього завдання є неможливим, коли внутрішньоклітинні мембрани недоступні для більшості фармакологічних чи фізіологічно активних речовин. Тому наші зусилля, перш за все, було спрямовано на підбір умов пермеабілізації досліджуваних секреторних клітин сапоніном.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на інтактних клітинах слинної залози личинок комара-дергуна (*Chironomus plumosus* L.), а також на таких, що пермеабілізовані за допомогою сапоніну.

Препаровані під мікроскопом залози інкубували протягом 30 хв у водяній бані при температурі 25 °С та помірному струшуванні. Базовий розчин для інкубації інтактних залоз містив (мМ): NaCl – 136,9; KCl – 5,36; CaCl_2 – 1,76; Na_2HPO_4 – 0,35; KH_2PO_4 – 0,44; MgCl_2 – 0,95; глюкоза – 5,55; рН 7,2. Після інкубації вміст пробірок протягом 5 хв центрифугували при 1600 g. Зливали супернатант, а до осаду додавали 1 мл бідистильованої води, гомогенізували у скляному гомогенізаторі, а потім гомогенат центрифугували протягом 10 хв. Функціональний стан Ca^{2+} -транспортних систем оцінювали за зміною вмісту Ca^{2+} у тканині залоз, виміряного за допомогою арсеназо III з використанням стандартного набору реактивів фірми «Simko Ltd» (Львів).

Для пермеабілізації секреторних клітин відпрепаровані слинні залози попередньо інкубували протягом 10 хв у базовому розчині, який містив сапонін у концентрації 0,1 мг/мл (рН 7,2). Робочу концентрацію сапоніну та час інкубації з ним підбирали експериментально. Залози відмивали від сапоніну і далі інкубували так, як описано вище. Базовий розчин для інкубації залоз, оброблених сапоніном, був за складом близьким до внутрішньоклітинного середовища і містив (мМ): NaCl – 15,30; KCl – 129,94; Na_2HPO_4 – 0,35; KH_2PO_4 – 0,44; глюкозу – 5,55; рН 7,0.

Для блокування IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів до базового розчину додавали гепарин (500 мкг/мл), для блокування Ca^{2+} -помпи – еозин Y (5 і 20 мкМ), для потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів – верапаміл (100 мкМ), а для ідентифікації природи каналів ендоплазматичного ретикулула – IP_3 у концентрації 10 мкМ та ріанодин у концентраціях 5 і 500 нМ.

Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Вірогідність змін визначали за Стьюдентом.

Результати та обговорення

Пермеабілізація секреторних клітин слинних залоз личинки комара створює можливість досягнути водночас двох ефектів. У поєднанні із вимірюванням зміни вмісту Ca^{2+} у тканині залоз вона дозволяє, по-перше, досліджувати тільки внутрішньоклітинні Ca^{2+} -транспортні системи, не використовуючи специфічних блокаторів Ca^{2+} -транспортних систем плазматичної мембрани. А по-друге, пермеабілізація клітин робить поверхню внутрішньоклітинних органел (ендоплазматичного ретикулула, ядра і мітохондрій) доступною для активаторів Ca^{2+} -транспортних систем цих органел чи їхніх інгібіторів, багато з яких погано проникають через плазматичну мембрану. Тому перед нами стояло завдання підібрати умови пермеабілізації досліджуваних клітин сапоніном.

Виявилось, що у тканині залоз, які обробляли сапоніном у концентраціях 0,001; 0,01 і 0,1 мг/мл протягом 5 хв при 25 °С, вміст Ca^{2+} в середньому зменшується на 21,5, 12,4 і 25,8% відповідно, але статистично вірогідно лише у разі найменшої концентрації, $n = 5-6$. Основною причиною цього зменшення є, очевидно, порушення цілісності плазматичної мембрани клітин. Проте куполоподібність кривої залежності свідчить про можливість існування інших механізмів дії сапоніну, що було зауважено іншими авторами [11].

Для встановлення ступеня пошкодження

плазматичної мембрани сапоніном клітини фарбували трипановим синім. З'ясувалося, що в залозах, оброблених сапоніном у концентрації 0,01 мг/мл, лише 48% клітин виявилися забарвленими. Цікаво, що після обробки дигітоніном у такій самій концентрації забарвлених клітин було 99%, причому забарвлення було надзвичайно інтенсивне (особливо ядра). У разі збільшення концентрації сапоніну до 0,05 мг/мл забарвленими були вже 58% клітин, а до 0,1 мг/мл – приблизно 90%. Щоб підвищити ефективність пермеабілізації клітин сапоніном час інкубації з ним залоз збільшили до 10 хв. За таких умов (0,1 мг/мл протягом 10 хв) практично всі клітини забарвлювалися трипановим синім із помірною інтенсивністю.

Виявилось також, що за впливу еозину Y (20 мкМ), який є блокатором Ca^{2+} -помп ендоплазматичного ретикулума і плазматичної мембрани, вміст Ca^{2+} у тканині залоз, оброблених сапоніном, зменшується на $(20,27 \pm 6,92)\%$ ($p < 0,05$, $n = 17$). Високоспецифічний блокатор Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулума – тапсигаргін у концентрації 1 мкМ теж зменшує вміст Ca^{2+} у тканині залоз на $(40,61 \pm 9,91)\%$ ($p < 0,05$, $n = 7$, рис. 1, А).

У разі додавання АТР в концентрації 100 мкМ до середовища інкубації, яке містило катіони Mg^{2+} (0,95 мМ) і Ca^{2+} (1,76 мМ), а також ріанодин (500 нМ) і гепарин (500 мкг/мл), вміст Ca^{2+} у тканині залоз збільшується на $(56,83 \pm 38,69)\%$, але p не досягає першого рівня вірогідності

($n = 6$). За додавання до середовища АТР (рис. 1, Б) у концентрації 1 мМ вміст Ca^{2+} збільшується статистично вірогідно на $(92,02 \pm 24,67)\%$ ($p < 0,05$), а в концентрації 10 мМ – на $(105,05 \pm 28,33)\%$ ($p < 0,01$).

Наведені дані свідчать, на нашу думку, про функціональну цілісність мембрани ендоплазматичного ретикулума. Тому в наступних дослідженнях з метою пермеабілізації секреторних клітин слинних залоз личинки комара-дергуна ми обробляли їх сапоніном у концентрації 0,1 мг/мл протягом 10 хв.

На наступному етапі було досліджено вплив активатора IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів IP_3 та їхнього блокатора гепарину на вміст Ca^{2+} у тканині пермеабілізованих залоз.

Визначено, що внаслідок додавання до середовища інкубації IP_3 у концентрації 10 мкМ вміст Ca^{2+} у тканині оброблених сапоніном залоз зменшується (рис. 2) статистично вірогідно на $(41,14 \pm 11,75)\%$ ($p < 0,05$, $n = 11$). Це свідчить на користь існування IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів у досліджуваних клітинах. За наявності гепарину в середовищі інкубації вміст Ca^{2+} у тканині залоз під впливом IP_3 не змінюється (рис. 2). Не змінюється він під впливом IP_3 і за наявності еозину Y (20 мкМ), який пригнічує Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулума і таким чином призводить до спустошення IP_3 -чутливого депо Ca^{2+} . Отже, в мембранах внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} -секреторних клітин слинних залоз личинки комара, як і в ацинарних клітинах вищих

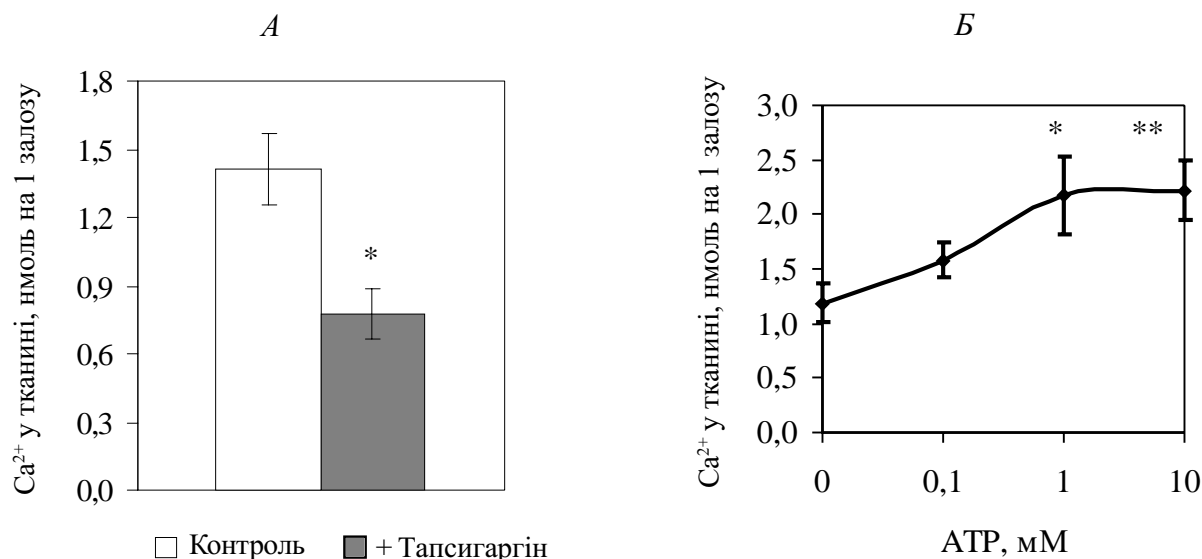


Рис. 1. Функціональна активність Ca^{2+} -помп ендоплазматичного ретикулума після пермеабілізації клітин сапоніном: А – зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз під впливом тапсигаргін (1 мкмоль/л), Б – збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз, спричинене додаванням до середовища екзогенного АТР за наявності Ca^{2+} , Mg^{2+} , гепарину та ріанодину.

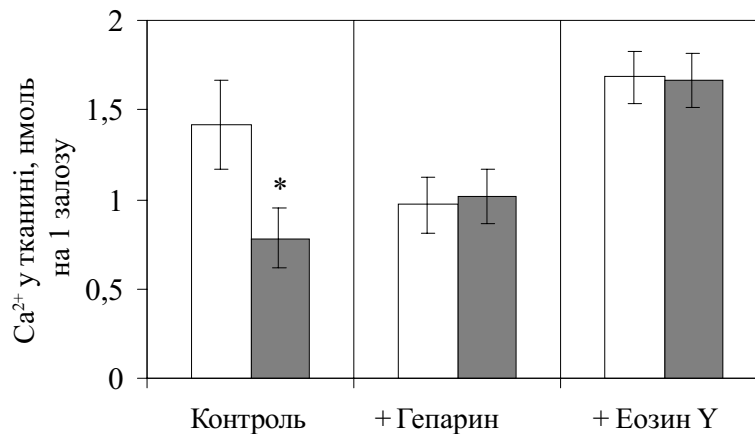


Рис. 2. Вплив IP_3 (10 мкМ) на вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз за відсутності (контроль) та наявності гепарину (500 мкг/мл) і еозину Y (20 мкМ) у середовищі інкубації.

тварин, наявні IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали.

Слід зауважити, що внаслідок додавання до середовища інкубації гепарину вміст Ca^{2+} у тканині залоз, оброблених сапоніном, статистично достовірно не змінюється ($p = 0,43$ при $n = 14$). Відсутність ефекту гепарину ми розцінюємо як свідчення того факту, що за таких умов експерименту (відсутність агоністів та Ca^{2+} в середовищі, порушення цілісності плазматичної мембрани тощо) IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали неактивні або кількість відкритих IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів є незначною.

На відміну від такого, під впливом гепарину вміст Ca^{2+} у тканині інтактних залоз збільшується порівняно з контролем статистично вірогідно ($p < 0,05$, $n = 9$) на $(67,12 \pm 22,60)\%$. Мало ймовірно, що цей ефект гепарину зумовлений його прямою дією на IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали внутрішньоклітинних депо. Скоріше за все, гепарин у цьому випадку діє на інші Ca^{2+} -транспортувальні системи. Тому ми перевірили можливість впливу гепарину на ті Ca^{2+} -транспортувальні системи об'єкта досліджень, які попередньо вже були ідентифіковані: потенціалкеровані Ca^{2+} -канали плазматичної мембрани [5,6], Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани та Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулула [8].

Відомо, що частина потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани досліджуваних секреторних клітин відкрита у стані спокою (при інкубації у вихідному розчині) і забезпечує базальне надходження Ca^{2+} в цитозоль [12]. Якщо гепарин може якимось чином стимулювати потенціалкеровані Ca^{2+} -канали (збільшувати ймовірність активації чи перебування каналу відкритим через зміну ступеня фосфорилування відповідних його доменів тощо), то інкубування з ним залоз приведе до збільшення вмісту Ca^{2+} в

їхній тканині опосередковано шляхом збільшення його надходження із позаклітинного середовища через ці канали. Таке саме збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз спостерігалось б і тоді, коли гепарин пригнічував би Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани або стимулював Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулула.

Але з'ясувалося, що за наявності в середовищі інкубації блокатора потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів – верапамілу вміст Ca^{2+} у тканині залоз під впливом гепарину збільшується ($p < 0,05$, $n = 8$) на $(38,88 \pm 18,87)\%$. За наявності в середовищі інкубації еозину Y в концентрації 5 і 20 мкМ (для пригнічення Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулула відповідно [8]) гепаринстимульоване збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз становить $(44,00 \pm 10,07)$ і $(60,20 \pm 19,33)\%$ відповідно ($p < 0,05$, $n = 6$).

Таким чином, виявлений нами ефект гепарину не пов'язаний зі зміною функціональної активності потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани, Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани чи Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулула. Проте мало ймовірним є те, що за таких умов гепарин впливає на функціонування IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулула.

Передбачається, що IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали в основному локалізовані в апікальній частині секреторної клітини [4]. На відміну від цього більшість ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів, згідно з імунохімічним аналізом [13], розміщені в базальній частині; в апікальній частині їх небагато, але в ділянці, де починаються агоністспричинені сигнали, вони повністю відсутні. В досліджах з використанням флуоресцентного ріанодину [14] продемонстровано, що він переважно зв'язується

ся в базальній частині клітини, поблизу краю гранулярної ділянки (близько до більшості мітохондрій [15]). Припускається, що ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали в цій частині клітини відіграють важливу роль у поширенні кальцієвої хвилі до базальної ділянки клітини [14].

У секреторних клітинах слинних залоз личинки комара попередніми дослідженнями [10] постулюється наявність ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів: за наявності в середовищі інкубації еозину Y або бутилгідроксигінону вміст Ca^{2+} у тканині інтактних залоз внаслідок дії кофеїну в концентрації 4–15 мМ зменшується. Для підтвердження припущення про наявність ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів у внутрішньоклітинних мембранах секреторних клітин слинних залоз личинок комара ми дослідили вплив кофеїну та ріанодину на вміст Ca^{2+} у тканині залоз, оброблених сапоніном.

Встановлено, що внаслідок додавання кофеїну в концентрації 4 мМ середньоарифметичне значення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз, оброблених сапоніном, змінюється від $(1,144 \pm 0,181)$ до $(0,976 \pm 0,159)$ нмоль на 1 залозу ($n = 16$), але це зменшення виявилось статистично невірогідним ($p = 0,16$). Можливою причиною цього може бути те, що кофеїн не лише здатний активувати ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, але й блокувати IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали [16], а також може, теоретично, стимулювати Ca^{2+} -помпу мембрани ендоплазматичного ретикулула досліджуваних клітин опосередковано через фосфорилування фосфоламбану внаслідок пригнічення фосфодіестерази та збільшення вмісту cAMP. Відомо, що нефосфорильований фосфоламбан при-

гнічує Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулула, а його фосфорилування усуває це інгібування [17]. Проте і за наявності еозину Y в концентрації 20 мкМ кофеїн також вірогідно не змінює вміст Ca^{2+} у тканині залоз.

Відсутність змін вмісту Ca^{2+} у тканині залоз під впливом кофеїну не є переконливим доказом відсутності ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів досліджуваних секреторних клітин. Відомо, що існує кофеїнечутливий ріанодинчутливий механізм вивільнення Ca^{2+} у міометрії [17]. Кофеїнечутливі ріанодинові рецептори ідентифіковано і у клітинах слинних залоз собак [18]. На ацинарних клітинах підшлункової залози було показано, що кофеїн не запускає вивільнення Ca^{2+} ріанодинчутливими Ca^{2+} -каналами, хоча їхню наявність у цих клітинах було неодноразово підтверджено [19]. Можливо кофеїн активує ці канали, але не безпосередньо, а опосередковано, через якусь ланку, яка за умов пермеабілізації клітини може порушуватися. Тому однозначний висновок можна зробити, використовуючи лише ріанодин, який у наномолярних концентраціях є агоністом цих каналів, а у мікромольних – ефективним блокатором [20].

З'ясувалося, що за наявності ріанодину в концентрації 5 нМ у середовищі інкубації вміст Ca^{2+} у тканині слинних залоз, оброблених сапоніном, зменшується на $(35,18 \pm 3,87)\%$ ($p < 0,001$, $n = 13$), а у концентрації 500 нМ – збільшився на $(40,72 \pm 12,52)\%$ ($p < 0,05$, $n = 7$) (рис. 3). Зменшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз за впливу ріанодину в низькій концентрації зумовлено власне активацією ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів і переконливо свідчить про їхню наявність у вну-

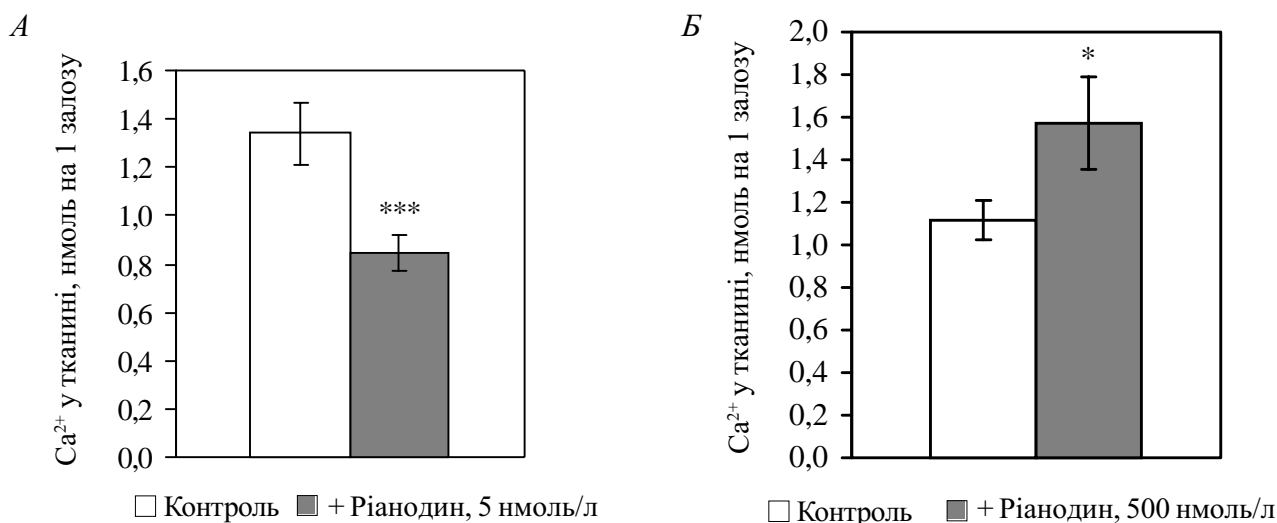


Рис. 3. Зміна вмісту Ca^{2+} у тканині слинних залоз, оброблених сапоніном, під впливом ріанодину у концентрації 5 (А) і 500 (Б) нмоль/л.

трішньоклітинних мембранах досліджуваних клітин. Мабуть частина цих каналів, як і IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів досліджуваних клітин, за інкубації у контрольному розчині знаходиться в активному стані, оскільки ріанодин у вищій концентрації спричинює збільшення вмісту Ca^{2+} у тканині залоз за таких умов.

Отже, в секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна, як і в секреторних клітинах екзокринних залоз вищих тварин, наявні IP_3 -чутливі та ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали. IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали досить ефективно блокуються гепарином, а ріанодинчутливі – мікромолярними концентраціями ріанодину. Але питання про властивості цих каналів, їхню локалізацію і взаємодію між собою залишаються на сьогодні не з'ясованими. Наразі ще немає відповіді на надзвичайно цікаве питання, що є первинним посередником, який запускає синтез IP_3 у цих клітинах. З'ясування цих особливостей функціонування Ca^{2+} -вивільняючих каналів досліджуваних секреторних клітин дозволить ширше розглядати проблему регуляції Ca^{2+} -гомеостазу екзокринних залоз взагалі.

Робота виконана за сприяння Західно-Українського центру біомедичних досліджень.

IDENTIFICATION OF Ca^{2+} RELEASE CHANNELS IN SALIVARY GLANDS SECRETORY CELLS OF *Chironomus plumosus* L.

V. V. Manko, S. V. Bychkova, M. Yu. Klevets

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

S u m m a r y

The presence of two types of well-characterised Ca^{2+} release channels, namely IP_3 -receptors (Ins(1,4,5) P_3 Rs) and ryanodine-receptors (RyRs), was detected in the salivary glands secretory cells of *Chironomus plumosus* L. For this aim different blockers and activators of these Ca^{2+} -transport systems were used. The conditions for permeabilization of these cells by saponine were experimentally chosen for their more intensive action.

It was shown that IP_3 decreased calcium content in saponine-treated gland tissue by $(41.14 \pm 11.75)\%$. The effect of IP_3 was not observed under condition of heparin and eosin Y presence in the incubation medium, but heparin alone did not cause any action on calcium content in saponine-treated gland tissue. The observed effects of IP_3 are supposed to be the evidences of Ins (1,4,5) P_3 Rs presence in the intracellular membrane of this object.

It was also shown that calcium content in intact gland tissue increased by $(67.12 \pm 22.60)\%$ in presence of heparin (500 mkg/ml) in the incubation medium. This effect of heparin was also observed with presence of verapamil (100 mkM) and eosin Y (5, 20 mkM) in incubation medium. So, this effect is not connected with function of voltage-gated Ca^{2+} -channels and Ca^{2+} -pumps.

Ryanodine in concentration of 5nM decreased calcium content in saponine-treated gland tissue by $(35.18 \pm 3.87)\%$ but it caused the increase of calcium content at high concentration (500 nM) by $(40.72 \pm 12.52)\%$. It improved the presence of RyRs in intracellular membrane of secretory cells of this object. Besides, these channels, perhaps, belong to "non-sensitive" to caffeine, because caffeine did not affect calcium content in the gland tissue neither in presence nor with absence of eosin Y.

К е у w o r d s: IP_3 -sensitive Ca^{2+} -channels, ryanodine-sensitive Ca^{2+} -channels, secretory cells, digestive glands, *Chironomus plumosus* L.

1. Shuttleworth T. J. // J. Exp. Biol. 1997. **200**. P. 303–314.
2. Wakui M., Osipchuk Y. V., Petersen O. H. // Cell. 1990. **63**, N 5. P. 1025–1032.
3. Petersen O. H., Burdakov D., Tepikin A. V. // Bio. Essays. 1999. **21**, N 10. P. 851–860.
4. Cancela J. M., Van Coppenolle F., Galione A. et al. // EMBO J. 2002. **21**, N 5. P. 909–919.
5. Клевець М. Ю., Манько В. В. // Физиол. журн. 1992. **38**, № 3. С. 70–75.
6. Король Т., Манько В., Клевець М. // Галицький лікарський вісник. 1998. **5**, № 3. С. 46–48.
7. Клевець М. Ю., Манько В. В., Федірко В. В. // Доп. НАН України. 1995. № 11. С. 123–126.
8. Манько В. В., Клевець М. Ю., Федірко Н. В., Король Т. В. // Укр. біохім. журн. 2000. **72**, № 2. С. 36–41.
9. Манько В. В., Стельмах С. В. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. 2002. Вип. 29. С. 171–176.
10. Король Т. В., Клевець М. Ю., Манько В. В. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 1999. № 4 (8). С. 49–53.
11. Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А. // Биохимия. 1997. **62**, вып. 12. С. 1666–1671.
12. Федірко Н. В., Клевець М. Ю. // Физиол. журн. 1999. **45**, № 4. С. 84–91.
13. Leite M. F., Dranoff J. A., Gao L., Nathanson M. H. // Biochem. J. 1999. **337** (Pt 2). P. 305–309.
14. Straub S. V., Giovannucci D. R., Yule D. I. // J. Gen. Physiol. 2000. **116**, N 4. P. 547–560.

15. Park M. K., Ashby M. C., Erdemli G. et al. // EMBO J. 2001. **20**, N 8. P. 1863–1874.
16. Ehrlich B. E., Kaftan E., Bezprozvannaya S., Bezprozvanny I. // Trends Pharmacol. Sci. 1994. **15**, N 5. P. 145–149.
17. Бабіч Л. Г. // Укр. біохім. журн. 1999. **71**, № 5. С. 10–22.
18. Yamaki H., Morita K., Kitayama S. et al. // Dent Res. 1998. **77**, N 10. P. 1807–1816.
19. Ashby M. C., Petersen O. H., Tepikin A. V. // J. Biochem. 2003. **369**, pt 3. P. 441–445.
20. Zucchi R., Ronca-Testoni S. // Pharmacol. Rev. 1997. **49**, Issue 1. P. 1–52.

Отримано 30.09.2003