

IP₃-ЧУТЛИВІ Ca²⁺-КАНАЛИ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ЗОВНІШНЬООРБИТАЛЬНИХ СЛЬОЗОВИХ ЗАЛОЗ ЩУРА

А. Б. КОТЛЯРОВА, В. В. МАНЬКО

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: annkotliarova@gmail.com

Встановлено роль інозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃)-чутливих Ca²⁺-каналів у підтриманні Ca²⁺-гомеостазу в секреторних клітинах слюзових залоз в умовах активації M-холіно- і P2Y-рецепторів. Дослідження проведено на інтактних та пермеабілізованих секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щурів. Клітини ізолювали за допомогою модифікованого нами методу Herzog, Sies, Miller (1976) та пермеабілізували дигітоніном (50 мкг/мл на 0,5 млн. клітин). Функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем оцінювали за зміною вмісту Ca²⁺ у досліджуваних клітинах, який визначили спектрофотометричним методом із використанням арсеназо III.

Показано, що IP₃-чутливі Ca²⁺-канали секреторних клітин слюзових залоз інгібуються 2-АФБ (10 мкМ) та активуються IP₃, а також за дії холіноміметиків (карбахолін) і агоністів пуринових рецепторів (АТР). За активації як M-холінорецепторів, так і P2Y-рецепторів Ca²⁺ вивільнюється з одного і того самого IP₃-чутливого депо, оскільки ефекти АТР і карбахоліну у високих концентраціях (1 мМ і 10 мкМ відповідно) є неадитивними. Збільшення вмісту Ca²⁺ у клітинах внаслідок відновлення його концентрації в позаклітинному середовищі після попередньої мобілізації з депо карбахоліном чи тапсигаргіном підтверджує наявність депокерованих Ca²⁺-каналів у секреторних клітинах слюзових залоз щурів.

Ключові слова: IP₃-чутливі Ca²⁺-канали, M-холінорецептори, P2Y-рецептори, депокерований вхід Ca²⁺, АТР, карбахолін, секреторні клітини, слюзові залози.

Ще у 1995 році було показано, що стимуляція АТР або ацетилхоліном ацинарних клітин слюзових залоз щурів індукує швидку генерацію інозитол-1,4,5-трифосфату (IP₃), що, в свою чергу, призводить до вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо IP₃-чутливими Ca²⁺-каналами [1]. Пізніше роботи в цьому напрямі не припинялися, хоча проводилися не так інтенсивно, як на інших залозах. Зокрема, із використанням вестернблот-аналізу та імуноцитохімічних методів встановлено, що в секреторних клітинах слюзових залоз мишей дійсно експресуються IP₃-чутливі Ca²⁺-канали [2]. Але щодо функціонування їх у секреторних клітинах слюзових залоз і ролі у секреції рідини та протейнів, особливо за одночасної стимуляції холіно- та пуринорецепторів, відомо недостатньо.

Раніше було встановлено, що IP₃-чутливі Ca²⁺-канали є важливими для забезпечення Ca²⁺-сигналізації в секреторних клітинах не лише слюзових [1, 3], а й інших (підшлункової [4, 5], слинних [4, 6], шлункових [7]) залоз ссавців, слинних залоз личинки дзвінця [8, 9]

та личинки дрозофіли [10] тощо. Утворюється IP₃ з фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату за дії фосфоліпази С і, відтак, активації рецепторів плазматичної мембрани, які зв'язані з G_{q/11}-протейнами.

IP₃ є вторинним месенджером, який активує IP₃-чутливі рецептори ендоплазматичного ретикулула, що спричинює вивільнення Ca²⁺ в цитозоль із IP₃-чутливого депо [11, 12], а це, в свою чергу, стимулює секрецію рідини та протейнів слюзовими залозами [11].

Механізми сигнальної трансдукції у секреторних клітинах слюзових залоз як за активації P2Y-рецепторів, так і M-холінорецепторів є однаковими, але відсутні дані, з яким саме нейротрансмітером (ацетилхоліном чи норадреналіном) вивільнюється АТР з нервових закінчень, що оточують слюзову залозу.

Залишається відкритим і питання про те, чи з одного і того самого IP₃-чутливого депо вивільнюється Ca²⁺ під час стимуляції клітин слюзових залоз за допомогою АТР і ацетилхоліну. Це питання є важливим з огляду на необхідність з'ясування фізіологічної доцільності вивільнення депонованого Ca²⁺ в

одних і тих самих клітинах під впливом різних агоністів.

Метою цієї роботи було дослідити роль IP_3 -чутливих Ca^{2+} каналів у підтриманні рівня депонованого Ca^{2+} за почергової та одночасної активації $P2U$ - і M -холінорецепторів секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щури.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на нелінійних щурах масою 170–240 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Усі 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 зовнішньоорбітальної сльозової залози щура. Після наркотизації хлороформом та декапітації у тварини швидко видаляли зовнішньоорбітальну сльозову залозу (*glandula orbitalis externa*) та очищали її від сполучної тканини. Для ізолювання секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура використовували модифікований нами метод Herzog, Sies, Miller (1976) [13]. З'ясувалося, що найоптимальнішим є використання дворазової почергової інкубації в (1) позаклітинному Ca^{2+} -вмісному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та лідази, і (2) позаклітинному середовищі, яке містить ЕГТА (2 мМ). Спочатку у відпрепаровану залозу ін'єкційно вводили суміш колагенази (690 У/мл) з лідазою (400 У/мл), розчинених на основі позаклітинного середовища такого складу (мМ): $NaCl$ – 119, KCl – 6, $MgCl_2$ – 1,2, $HEPES$ – 10, $CaCl_2$ – 1, глюкоза – 10, $NaHCO_3$ – 25; рН 7,4. Після цього залозу інкубували 25 хв у водному термостаті при 37 °С та за помірного струшування. Після завершення інкубації змінювали розчин на позаклітинний, що містив ЕГТА (2 мМ), та інкубували в ньому протягом 5 хв. Повторно інкубували в Ca^{2+} -вмісному позаклітинному середовищі, до складу якого входила суміш колагенази та лідази (15 хв), піпетували наконечниками з отвором різного діаметра в безкальцієвому ЕГТА-вмісному позаклітинному середовищі, після чого одержані клітини промивали в Ca^{2+} -вмісному розчині.

Кількість клітин підраховували в камері Горяєва. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально за допомогою світлового мікроскопа і з використанням

барвника трипанового синього. Для цього 0,2%-й розчин трипанового синього, виготовленого на основі номінально безкальцієвого позаклітинного середовища, змішували із суспензією клітин в однакових об'ємах і через 2–3 хв розглядали під мікроскопом. Відсутність забарвлення ядра свідчила про цілісність плазматичних мембран клітин.

Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин. Метод пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном часто застосовують для різних клітин [14–16]. Оптимальна концентрація дигітоніну для пермеабілізації секреторних клітин сльозових залоз становить 50 мкг/мл в розрахунку на 0,5 млн. клітин. Спочатку клітини інкубували з дигітоніном протягом 10 хв при 37 °С в середовищі, за іонним складом наближеному до внутрішньоклітинного (мМ): KCl – 140, $MgCl_2$ – 1,5, $CaCl_2$ – 0,0274, ЕГТА – 0,1 ($[Ca^{2+}] \approx 10^{-7}$ М), $HEPES$ – 10; рН 7,2. Після пермеабілізації клітини двічі промивали таким самим розчином, але без дигітоніну. Ступінь пермеабілізації оцінювали візуально шляхом фарбування трипановим синім. Концентрацію вільного Ca^{2+} розраховували за допомогою програми *Maxchelator* (<http://maxchelator.stanford.edu>).

Визначення вмісту Ca^{2+} у клітинах. Після ізолювання (або і пермеабілізації) клітини розділяли на аліквоти та інкубували у середовищі відповідного складу з використанням водного термостата при 37 °С та за помірного струшування. Після інкубації клітини центрифугували 10 хв при 1600 g, супернатант зливали та додавали 1 мл бідистильованої води. Одержану суспензію гомогенізували у скляному гомогенізаторі та центрифугували при 1600 g протягом 10 хв. Проби для визначення вмісту Ca^{2+} відбирали з надосадової рідини. Концентрацію Ca^{2+} визначали спектрофотометричним методом із використанням металохромного барвника арсеназо III за допомогою стандартного набору реактивів (*Simko Ltd*, Львів). Принцип методу полягає в тому, що в нейтральному середовищі Ca^{2+} з барвником арсеназо III утворює комплекс синього кольору, інтенсивність забарвлення якого визначають при 650 нм.

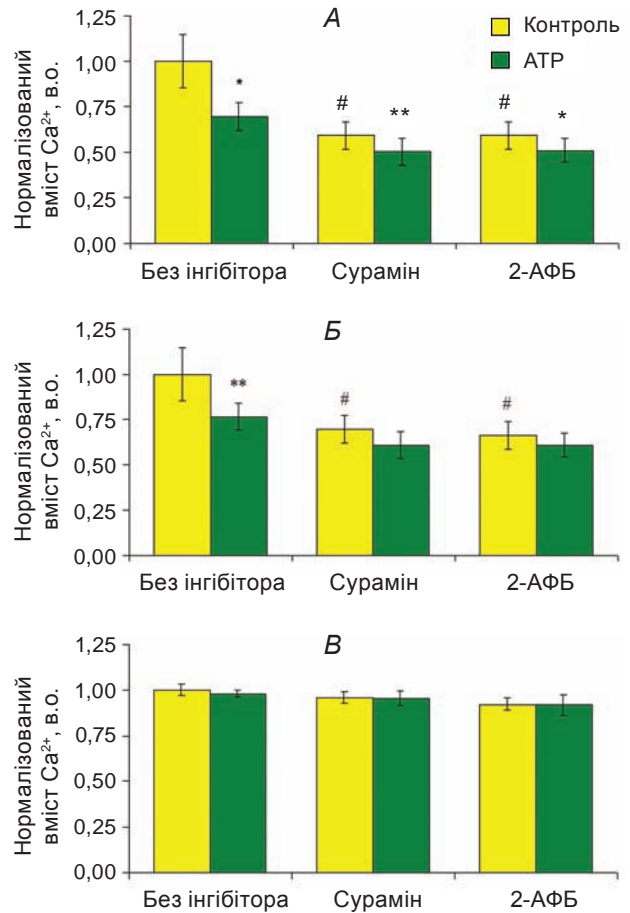
Статистичний аналіз результатів досліджень проводили, використовуючи пакет програм *Microsoft Excel*. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом, статистично значимими змінами вважали за $P < 0,05$. З метою обчислення частки впливу того чи іншого фактора на вміст

Ca²⁺ у досліджуваних клітинах застосовували двофакторний дисперсійний аналіз.

Результати та обговорення

Вплив АТР на вміст Ca²⁺ у секреторних клітинах слюзових залоз за умов інкубації в середовищах із різною концентрацією Ca²⁺. Активація P2Y-рецепторів плазматичної мембрани призводить до зменшення вмісту Ca²⁺ у IP₃-чутливих депо (за рахунок активації фосфоліпази С і генерації IP₃). І, навпаки, активація P2X-рецепторів спричинює надходження Ca²⁺ із позаклітинного середовища крізь плазматичну мембрану і, відповідно, збільшує його вміст у клітині. Щоб запобігти надходженню Ca²⁺ у клітину внаслідок активації P2X-рецепторів, ізольовані інтактні клітини слюзової залози інкубували в номінально безкальцієвому середовищі. У цьому разі надходження Ca²⁺ внаслідок активації P2X-рецепторів і системою депокерованого входу Ca²⁺ має бути мінімальним і ним можна знехтувати. З'ясовано, що після 15 хв інкубації сумарний вміст Ca²⁺ в інтактних секреторних клітинах слюзових залоз під впливом АТР (100 мкМ) статистично вірогідно зменшується на 30,46 ± 7,65% (P < 0,05; n = 6; рис. 1, А). Це зменшення дійсно спричинене активацією P2Y-рецепторів, бо за наявності в середовищі інкубації інгібітору P2-рецепторів – сураміну [17] в концентрації 100 мкМ вміст Ca²⁺ під впливом АТР зменшується лише на 15,38 ± 3,38% (P < 0,01, n = 6). Крім того, нами одержано підтвердження, що в основі механізму сигнальної трансдукції P2Y-рецепторів досліджуваних клітин дійсно лежить активація IP₃-чутливих Ca²⁺-каналів, оскільки за присутності їх інгібітору – 2-АФБ (2-амінооксидифенілборату) [18, 19] у концентрації 10 мкМ АТР-індуковане зменшення вмісту Ca²⁺ становить тільки 13,11 ± 4,06% (P < 0,05; n = 6; рис. 1, А). Хоча, звичайно, повністю відкидати наявність інших механізмів трансдукції сигналу за активації P2Y-рецепторів досліджуваних клітин ми не маємо підстав.

За концентрації Ca²⁺ 1 мМ у середовищі АТР-індуковане зменшення його вмісту в клітинах виявилось дещо меншим, ніж у номінально безкальцієвому середовищі. Додавання до середовища сураміну практично повністю запобігає АТР-індукованому зменшенню вмісту Ca²⁺ в досліджуваних клітинах (рис. 1, Б). Дещо неочікуваним виявилось те, що на тлі 2-АФБ теж були відсутні статистич-



*Рис. 1. Вплив АТР на вміст Ca²⁺ в інтактних секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: А – номінально безкальцієве середовище; Б – середовище з фізіологічною концентрацією Ca²⁺; В – гіперкальцієве середовище (10 мМ); вміст Ca²⁺ у тканині нормалізували, приймаючи за одиницю його значення за відсутності сураміну і 2-АФБ; час інкубації 15 хв; [Na⁺] = 134 мМ, [K⁺] = 6 мМ; [АТР] = 100 мкМ; [сурамін] = 100 мкМ; [2-АФБ] = 10 мкМ; * різниця порівняно з контролем вірогідна з P < 0,05, ** з P < 0,01; # різниця порівняно із пробою за відсутності інгібітору вірогідна з P < 0,05; n = 6–8*

но вірогідні АТР-індуковані зміни вмісту Ca²⁺ (рис. 1, Б).

Після інкубації клітин у гіперкальцієвому середовищі (10 мМ) вміст Ca²⁺ в клітинах під впливом АТР не змінюється ні в контролі, ні за наявності інгібіторів (рис. 1, В), що опосередковано підтверджує наявність P2X-рецепторів. Очевидно, зниження вмісту Ca²⁺ в клітинах зумовлено активацією P2Y-рецепторів і вивільненням Ca²⁺ із IP₃-

чутливого депо, повністю нівелюється надходженням Ca^{2+} з позаклітинного середовища за градієнтом концентрації внаслідок активації P2X -рецепторів.

Аналіз одержаних даних, не дивлячись на відносну специфічність сураміну (як інгібітору P2 -рецепторів) і 2-АФБ (як інгібітору IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів), дозволяє зробити висновок, що ефект АТР дійсно спричинений активацією P2 -рецепторів. Зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах за дії АТР є наслідком активації IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів. Ці результати цілком узгоджуються з даними літератури стосовно змін цитозольної концентрації Ca^{2+} у секреторних клітинах слюзових залоз за дії АТР [20].

І, відповідно, таку модель (АТР-індуковані зміни вмісту Ca^{2+} у секреторних клітинах слюзових залоз за їхньої інкубації в номінально безкальцієвому розчині) можна використовувати для дослідження цих каналів.

Підтвердження наявності IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів у секреторних клітинах досліджуваних залоз. Ще одним типом рецепторів, які ідентифіковано в клітинах слюзових залоз і сигнальний шлях трансдукції яких зв'язаний з фосфоліпазою С, є мускаринові рецептори M_3 -типу [11, 12]. І, справді, за дії агоніста M -холінорецепторів карбахоліну (1 мкМ) вміст Ca^{2+} в інтактних клітинах досліджуваних залоз вірогідно зменшується на $11,38 \pm 2,33\%$ ($P < 0,01$; $n = 5$;

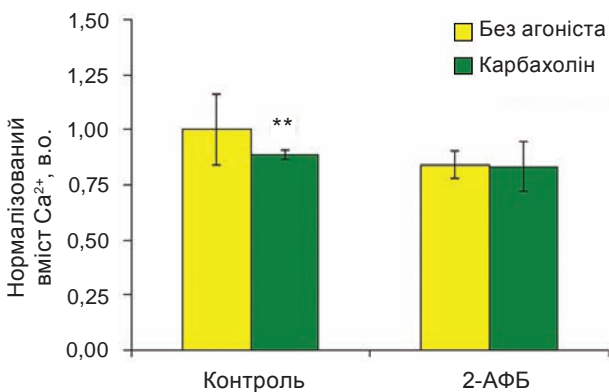


Рис. 2. Вплив карбахоліну на вміст Ca^{2+} в інтактних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення за відсутності карбахоліну і 2-АФБ; час інкубації 15 хв; $[\text{Na}^+] = 134 \text{ мМ}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ мМ}$; $[\text{карбахолін}] = 1 \text{ мкМ}$; $[\text{2-АФБ}] = 10 \text{ мкМ}$; ** різниця порівняно з контролем за відсутності інгібітору вірогідна з $P < 0,01$; $n = 5$

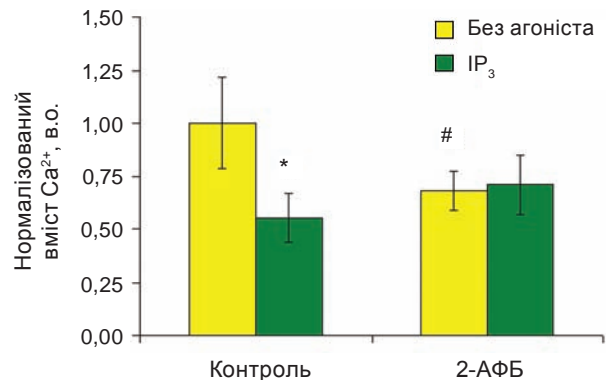


Рис. 3. Вплив IP_3 на вміст Ca^{2+} в ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: вміст Ca^{2+} в тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення за відсутності IP_3 і 2-АФБ; час інкубації 15 хв; $[\text{K}^+] = 140 \text{ мМ}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7} \text{ М}$; $[\text{IP}_3] = 2 \text{ мкМ}$; $[\text{2-АФБ}] = 10 \text{ мкМ}$; * різниця порівняно з контролем вірогідна з $P < 0,05$; # різниця порівняно із пробою за відсутності інгібітору вірогідна з $P < 0,05$; $n = 6$

рис. 2). А 2-АФБ у концентрації 10 мкМ повністю інгібує карбахолініндуковане зменшення вмісту Ca^{2+} в клітинах ($P = 0,94$; $n = 5$; рис. 2).

Прямим підтвердженням наявності IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів може слугувати зменшення вмісту депонованого Ca^{2+} під впливом IP_3 . Для цього в наступній серії експериментів плазматичну мембрану досліджуваних клітин було пермеабілізовано дигітоніном. Це уможливило безпосередній доступ екзогенного IP_3 до ендоплазматичного ретикулула. З'ясувалося, що за дії екзогенного IP_3 в концентрації 2 мкМ внаслідок прямої активації IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів, вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах вірогідно зменшився на $44,63 \pm 11,50\%$ ($P < 0,05$; $n = 6$; рис. 3).

За наявності 2-АФБ в середовищі під впливом IP_3 статистично вірогідних змін не зареєстровано ($P > 0,05$; $n = 6$; рис. 3). Це підтверджує те, що IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура інгібуються 2-АФБ. Правда, сам по собі 2-АФБ у частині дослідів (але не завжди, див. рис. 1–3) спричинює зменшення вмісту Ca^{2+} у досліджуваних клітинах. Це можна пояснити тим, що 2-АФБ може інгібувати також і депокерований вхід Ca^{2+} в клітину [21] або Ca^{2+} -помпу ендоплазматичного ретикулула [18, 22]. Константа напівінгібування IP_3 -чутливих

Ca²⁺-каналів пермеабілізованих клітин A7r5 для цього інгібітору становить 36 мкМ, а напівмаксимальне інгібування Ca²⁺-помп і немітохондріальних Ca²⁺-депо спостерігається за 91 мкМ 2-АФБ. За підвищення концентрацій 2-АФБ спричиняє неспецифічний витік Ca²⁺ з депо [18].

Вміст Ca²⁺ в інтактних секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура за умов одночасної активації холіно- та пуринорецепторів. Оскільки за активації P2Y і M-рецепторів механізм сигнальної трансдукції у досліджуваних клітинах однаковий, ми вирішили перевірити як впливатимуть агоністи цих рецепторів за їх одночасної дії. Знову ж таки, для запобігання впливу активації P2X-рецепторів, клітини інкубували в номінально безкальцієвому середовищі.

У цій серії дослідів під час інкубації з АТР (100 мкМ) вміст Ca²⁺ в досліджуваних клітинах зменшується на 10,70 ± 1,94% (n = 5, P < 0,01; рис. 4, А), а з карбахоліном (1 мкМ) — на 19,46 ± 3,85% (n = 5, P < 0,01). Сумарний ефект АТР і карбахоліну в наведених концентраціях виявився адитивним — за їх одночасної дії вміст Ca²⁺ в клітинах зменшується на 25,99 ± 4,25% (P < 0,01; n = 5; рис. 4, А). Подібне агоніст-індуковане зменшення (на 23,81 ± 3,48%; P < 0,01; n = 5) зареєстроване і за преінкубації секреторних клітин з АТР протягом 5 хв. За вищих концентрацій АТР і карбахоліну (1 мМ і 10 мкМ відповідно) їх сумарний ефект є таким самим, як ефект АТР (P = 0,39; n = 5; рис. 4, Б) чи карбахоліну (P = 0,68; n = 5). За преінкубації з АТР зменшення вмісту Ca²⁺ внаслідок одночасної дії АТР і карбахоліну за вищих концентрацій є сильнішим, але не досягає рівня вірогідності.

Одержані дані свідчать, що за активації як P2Y-рецепторів, так і M-холінорецепторів Ca²⁺ вивільняється з одного і того самого IP₃-чутливого депо.

Депокерований вхід Ca²⁺ у секреторні клітини слюзових залоз. Агоністіндуковане вивільнення Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо в цитозоль (і його виведення із клітини) спричинює зменшення пулу депонованого Ca²⁺, що в свою чергу активує депокерований вхід Ca²⁺ із позаклітинного середовища. Спорожнювання IP₃-чутливого Ca²⁺ депо тапсигаргіном або IP₃ [23] активує надходження Ca²⁺ крізь плазматичну мембрану з позаклітинного середовища в ацинарних клітинах слюзових залоз мишей [24], а також у клітинах привушних залоз щура [25], парієтальних секреторних клітинах кроля

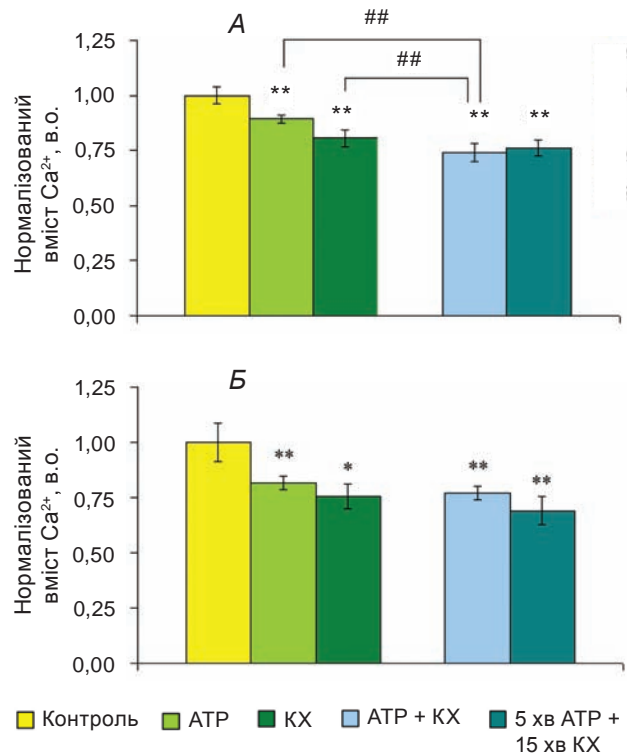


Рис. 4. Вплив АТР і карбахоліну, за сумісної дії, на вміст Ca²⁺ у інтактних секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: А — [Na⁺] = 134 мМ, [K⁺] = 6 мМ, [карбахолін] = 1 мкМ, [АТР] = 100 мкМ; Б — [Na⁺] = 134 мМ, [K⁺] = 6 мМ, [карбахолін] = 10 мкМ, [АТР] = 1 мМ; вміст Ca²⁺ у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення за відсутності агоністів; час інкубації 15 хв; * різниця вірогідна з P < 0,05; ** P < 0,01; n = 5

[26]. Канали, що опосередковують таке надходження Ca²⁺, називають депокерованими Ca²⁺-каналами. Їхня активність регулюється концентрацією Ca²⁺ у депо [27]. Показано, що депокеровані Ca²⁺-канали взаємодіють з IP₃-чутливими Ca²⁺-каналами [28]. Дослідження з використанням 2-АФБ вказують на те, що активність IP₃-чутливих Ca²⁺-каналів є необхідною для активації депокерованого входу Ca²⁺ [29], проте таке трактування не є однозначним, оскільки 2-АФБ інгібує також Ca²⁺-помпу ендоплазматичного ретикулума і депокерований вхід Ca²⁺ [18, 21, 22].

Для оцінки депокерованого входу Ca²⁺ суспензію секреторних клітин слюзових залоз розділяли на аліквоти та інкубували за таких умов: 1) 15 хв у номінально безкальцієвому середовищі (контроль); 2) 15 хв у номінально безкальцієвому середовищі з карбахоліном (1

або 10 мкМ) чи тапсигаргіном (1 мкМ); 3) 5 хв у номінально безкальцієвому середовищі з карбахоліном (або тапсигаргіном), після чого додавали 2 мМ Ca^{2+} та інкубували ще 10 хв. Дві наступні аліквоти клітин інкубували згідно з другим і третім протоколом, але через 5 хв від початку інкубації з карбахоліном/тапсигаргіном до середовища додавали 2-АФБ (10 мкМ). Депокерований вхід Ca^{2+} в клітини визначали як різницю вмісту Ca^{2+} в клітинах, які інкубували з карбахоліном чи тапсигаргіном, і клітинах, преінкубованих із цими речовинами і наступним збільшенням у середовищі $[\text{Ca}^{2+}]$ до 2 мМ.

Преінкубація секреторних клітин із карбахоліном (рис. 5, А) як і у попередньому досліді (див. рис. 4, А) зменшує вміст Ca^{2+}

в цих клітинах. Збільшення в середовищі інкубації концентрації Ca^{2+} до 2 мМ (після преінкубації з карбахоліном) відновлює вміст Ca^{2+} в клітинах до вихідного рівня за рахунок, очевидно, депокерованого входу Ca^{2+} (рис. 5, А). Причому, наявність 2-АФБ в середовищі інкубації істотно не позначається на його амплітуді. Оскільки Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулула не є заінгібованою, то, ймовірно, за додавання до середовища 2-АФБ, інгібування IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів частково маскується інгібуванням цієї помпи. Або карбахолін у концентрації 1 мкМ спричинює депокерований вхід досить малої амплітуди, тому дію 2-АФБ зареєструвати не вдалося.

Для перевірки цих припущень у наступних серіях експериментів для спорожнювання

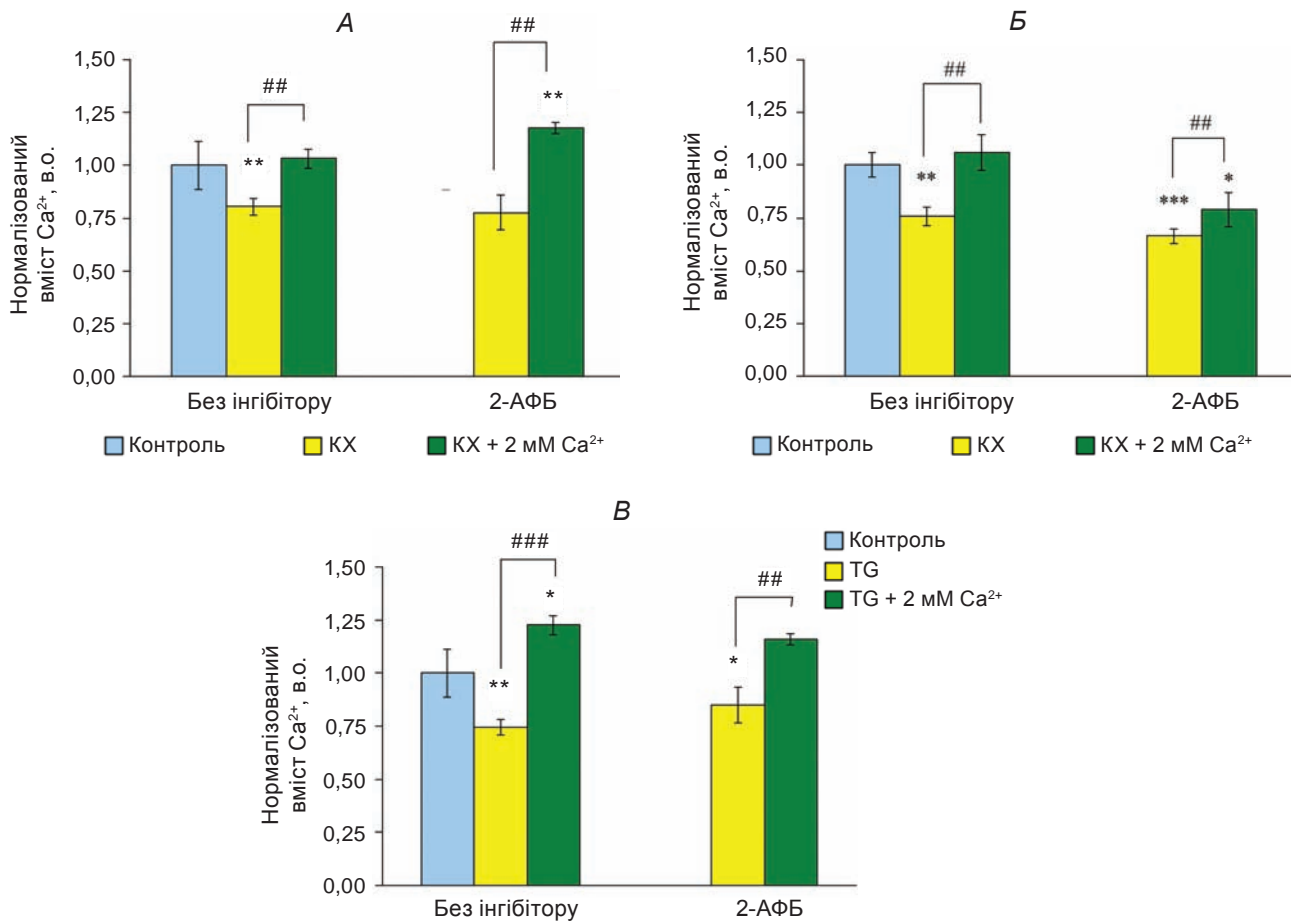


Рис. 5. Депокерований вхід Ca^{2+} в клітини зовнішньоорбітальної слъзової залози щура в контролі та за наявності інгібітору IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів 2-АФБ у середовищі: депокерований вхід Ca^{2+} , який розраховували як приріст вмісту Ca^{2+} в клітинах після відновлення його концентрації в середовищі, індукували карбахоліном у концентрації 1 мкМ (А) або 10 мкМ (Б) або тапсигаргіном (В); на діаграмі вміст Ca^{2+} в клітинах нормалізували, прийнявши за одиницю його значення в пробах, інкубованих у номінально безкальцієвому середовищі; $[\text{Na}^+] = 134 \text{ мМ}$, $[\text{K}^+] = 6 \text{ мМ}$; $[\text{Ca}^{2+}] = 2 \text{ мМ}$; $[\text{2-АФБ}] = 10 \text{ мкМ}$; $[\text{карбахолін}] = 1 \text{ мкМ}$; 10 мкМ ; $[\text{тапсигаргін}] = 1 \text{ мкМ}$; * різниця вірогідна з $P < 0,05$; ** з $P < 0,01$; *** з $P < 0,001$; $n = 5-7$; ## різниця вірогідна з $P < 0,01$; ### різниця вірогідна з $P < 0,001$

депо використали карбахолін у концентрації 10 мкМ. З'ясувалося, що депокерований вхід Ca^{2+} в клітини під впливом 2-АФБ зменшується на $62,59 \pm 17,02\%$ ($n = 7$, $P < 0,05$; рис. 5, Б).

Додавання до номінально безкальцієвого середовища специфічного інгібітору Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулу та тапсигаргіну в концентрації 1 мкМ спричиняє зменшення вмісту Ca^{2+} в досліджуваних клітинах на $25,53 \pm 4,50\%$ (рис. 5, В). Після такого пасивного вивільнення депонованого Ca^{2+} збільшення концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації супроводжується збільшенням вмісту Ca^{2+} в досліджуваних клітинах на $66,71 \pm 7,83\%$. Показано, що 2-АФБ теж частково інгібує депокерований вхід Ca^{2+} в клітини – на $49,18 \pm 11,15\%$ ($n = 7$, $P < 0,01$; рис. 5, В). У цьому разі Ca^{2+} -помпа ендоплазматичного ретикулу є повністю заінгібованою. Очевидно, за таких умов ефект 2-АФБ зумовлений інгібуванням IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулу і/або інгібуванням депокерованого входу Ca^{2+} .

Отже, у секреторні клітини зовнішньоорбітальної слізозової залози щура наявний депокерований вхід Ca^{2+} , який індукується вивільненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу карбахоліном чи тапсигаргіном та інгібується 2-АФБ.

Як відомо, IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали відіграють визначальну роль у генерації Ca^{2+} -сигналу в секреторних клітинах багатьох залоз [3–8, 10, 19, 30]. Мікроін'єкція в секреторні клітини слізозової залози мишей інозитол-2,4,5-трифосфату – метаболічно стабільного аналога інозитолу-1,4,5-трифосфату – стимулює як мобілізацію Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, так і його надходження з позаклітинного середовища [3]. Одержані нами результати (зменшення вмісту депонованого в клітинах Ca^{2+} за дії карбахоліну чи додавання IP_3 та інгібування цього процесу за допомогою 2-АФБ, а також збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} внаслідок відновлення його концентрації в позаклітинному середовищі після попередньої мобілізації із депо) повністю узгоджуються з цим і підтверджують наявність IP_3 -чутливих і депокерованих Ca^{2+} -каналів у секреторних клітинах слізозових залоз щурів.

Активация IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів досліджуваних клітин відбувається внаслідок взаємодії речовин, що є медіаторами вегетативної нервової системи (ацетилхолін, АТР), з відповідними рецепторами плазматичної мембрани [1, 12]. Властиво, в процесі досліджень функціонування слізозових залоз

ефекти подразнення парасимпатичних і симпатичних нервових волокон часто моделюють дією різних холінергічних і адренергічних агоністів. Водночас, додатковим медіатором (комедіатором) як холінергічних, так і адренергічних синапсів у багатьох тканинах є АТР, вивільнення якого може істотно модулювати ефект основного медіатору [31, 32].

Позаклітинний АТР спричинює збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} в екзокринних ацинарних клітинах різних залоз, взаємодіючи з P2-типом пуринорецепторів [33–35]. Із цієї групи, в базальній мембрані ацинарних клітин слізозових залоз мишей, експресуються P2Y_{11} і P2Y_{13} -рецептори [36]. АТР-індуковані відповіді ацинарних клітин слізозових залоз щурів реалізуються (поряд з активацією P2X-рецепторів) переважно через активацію P2Y_1 -рецепторів і наступну IP_3 -опосередковану мобілізацію Ca^{2+} , що показано з використанням гепарину та інгібітору фосфоліпази С – U73122, а також зворотної транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції [20].

Також було ідентифіковано [20] (крім P2Y_1) у секреторних клітинах слізозових залоз $\text{P2Y}_{2,4,12,14}$, але не підтвердили експресії P2Y_{11} і P2Y_{13} -рецепторів. Питання про те, через які саме підтипи P2Y -рецепторів опосередковується механізм сигнальної трансдукції під впливом АТР є дуже важливим, адже механізм сигнальної трансдукції під час активації різних P2Y -рецепторів може залучати різні сигнальні шляхи [8, 37, 38].

Отже, в основі механізму сигнальної трансдукції P2Y -рецепторів досліджуваних клітин дійсно лежить активація IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів, оскільки за присутності їхнього інгібітору – 2-АФБ (1 мкМ) у номінально безкальцієвому середовищі (що унеможливує активацію P2X-рецепторів) АТР-індуковані зміни вмісту Ca^{2+} були менш виражені. І це зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах справді спричинене активацією P2Y -рецепторів, тому що інгібується (правда, не повністю) сураміном (100 мкМ). Сигнальний шлях за активації P2Y -рецепторів у секреторних клітинах слізозових залоз частково опосередковується активацією IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів. Але відкидати наявність інших механізмів внутрішньоклітинної трансдукції АТР-індукованого сигналу ми не можемо, оскільки карбахолін- та IP_3 -індуковане (але не АТР-індуковане) зменшення вмісту Ca^{2+} у досліджуваних клітинах повністю інгібується 2-АФБ. Це також підтверджується тим, що

інгібітор фосфоліпази C – U73122 (5 мкМ) лише частково інгібує АТР-індуковане збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} [20].

Як за активації М-холінорецепторів, так і P2Y-рецепторів механізм сигнальної трансдукції в секреторних клітинах слюзових залоз той самий. Проте питання, чи з одного і того ж IP_3 -чутливого депо вивільнюється Ca^{2+} під час стимуляції досліджуваних клітин карбахоліном і/або АТР, залишається нез'ясованим. Враховуючи наведене вище, важливим є те, з якого депо вивільнюється Ca^{2+} під час стимуляції клітин слюзових залоз холіноміметиками (карбахолін) і агоністами пуринових рецепторів (АТР).

У досліджуваних клітинах суттєвих морфологічних відмінностей між АТР-стимульованими і карбахолінстимульованими клітинами зареєстровано не було [20]. Відмінності між поширенням Ca^{2+} -хвилі, індукованої активацією P2Y- і мускаринових рецепторів, показано для панкреатитів та клітин привушних залоз [39]. А у клітинах слюзових залоз ацетилхолін і АТР індукують Ca^{2+} -сигнали, які ініціюються з апікальної частини клітини і швидко поширюються до базальної частини [35]. Водночас встановлено, що АТР-індуковані збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} починаються з периферійних ділянок ацинусів, а карбахолін-індуковані – від центральних ділянок [20]. Така відмінність може бути зумовлена тим, що АТР активує також і P2X-рецептори, оскільки досліджувані клітини інкубували у Ca^{2+} -вмісному середовищі і без відповідних інгібіторів. У той же час, у безкальцієвому середовищі або в умовах інкубації клітин з Gd^{3+} АТР-індуковане збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} інгібується, але не повністю [20]. Хоча, цілком можливо, під час активації за допомогою АТР певних підтипів P2Y-пуринорецепторів досліджуваних клітин відбувається зміна рівня cAMP, який в свою чергу модулює активність IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів.

З'ясувалося також [1], що стимуляція клітин слюзових залоз ацетилхоліном зумовлює Ca^{2+} -відповідь максимальної амплітуди, незалежно від часу після стимуляції АТР. Автори дійшли висновку, що АТР спричиняє вивільнення лише невеликої частини доступного Ca^{2+} , дозволяючи ацетилхоліну зумовлювати повторне вивільнення Ca^{2+} з того самого депо [1]. Такого ефекту не спостерігали на клітинах підщелепної залози, де АТР запобігав вивільненню Ca^{2+} з депо за

стимуляції норадреналіном або карбахоліном [40].

Але реєстрація змін цитозольної концентрації Ca^{2+} не дає повного уявлення про те, з якого саме депо вивільнюється Ca^{2+} в клітині за дії агоністів різної природи. Відповідь на це питання можна одержати, реєструючи зміни депонованого Ca^{2+} . Враховуючи те, що цитозольна концентрація Ca^{2+} є низькою, сумарний вміст Ca^{2+} в клітинах практично відображає депонований Ca^{2+} в досліджуваних клітинах.

Нами оцінено зміни вмісту Ca^{2+} в клітинах за дії АТР і карбахоліну, що дозволило дійти висновку, що за активації як P2Y-рецепторів, так і М-холінорецепторів Ca^{2+} -вивільняється з одного і того самого IP_3 -чутливого депо. Це підтверджується тим, що за високих концентрацій АТР і карбахоліну (1 мМ і 10 мкМ відповідно) їх сумарний ефект є таким самим, як ефект АТР чи карбахоліну.

Отже, IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали відіграють важливу роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу в секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щурів. Ці канали ефективно інгібуються 2-АФБ (10 мкМ) та активуються IP_3 , а також за дії на плазматичну мембрану прямих холіноміметиків (карбахолін) і агоністів пуринових рецепторів (АТР). Мобілізація Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо під впливом цих агоністів запускає депокерований вхід Ca^{2+} у секреторні клітини досліджуваних залоз. Сигнальний шлях за активації P2Y-рецепторів у секреторних клітинах слюзових залоз частково опосередковується активацією IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів.

Робота частково виконана за фінансової підтримки Західно-Українського біомедичного дослідного центру (WUBMRC).

IP_3 -ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ Ca^{2+} -КАНАЛЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК ВНЕОРБИТАЛЬНОЙ СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

А. Б. Котлярова, В. В. Манько

Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина
e-mail: annkotliarova@gmail.com

Показана роль инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3)-чувствительных Ca^{2+} -каналов в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза в секреторных клетках слезных желез в условиях активации

М-холинорецепторов и P2Y-рецепторов. Исследование проведено на интактных и пермеабилizованных секреторных клетках внеорбитальной слезной железы крыс. Клетки изолировали с использованием модифицированного метода Herzog, Sies, Miller (1976) и пермеабилizировали дигитонином (50 мкг/мл на 0,5 млн клеток). Функционирование Ca²⁺-транспортующих систем оценивали по изменению содержания Ca²⁺ в исследуемых клетках, которое определяли спектрофотометрическим методом с использованием арсеназо III.

Показано, что IP₃-чувствительные Ca²⁺-каналы исследуемых клеток достаточно эффективно ингибируются 2-АФБ (10 мкМ) и активируются IP₃, а также холиномиметиками (карбахолином) и агонистами пуриновых рецепторов (АТР). При активации как М-холинорецепторов, так и P2Y-рецепторов Ca²⁺ высвобождается из одного и того же IP₃-чувствительного депо, поскольку эффекты АТР и карбахолина в высоких концентрациях (1 мМ и 10 мкМ соответственно) являются неаддитивными. Увеличение содержания Ca²⁺ в клетках вследствие восстановления его концентрации во внеклеточной среде после предварительной мобилизации из депо карбахолином или тапсигаргином подтверждает наличие депозависимых Ca²⁺-каналов в секреторных клетках слезных желез крыс.

Ключевые слова: IP₃-чувствительные Ca²⁺-каналы, М-холинорецепторы, P2Y-рецепторы, депозависимый вход Ca²⁺, АТР, карбахолин, секреторные клетки, слезная железа.

IP₃-SENSITIVE Ca²⁺-CHANNELS OF ENDOPLASMIC RETICULUM IN SECRETORY CELLS OF THE RAT EXORBITAL LACRIMAL GLAND

A. B. Kotliarova, V. V. Manko

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;
e-mail: annkotliarova@gmail.com

The role of inositol-1,4,5-trisphosphate of (IP₃)-sensitive Ca²⁺ channels in Ca²⁺ homeostasis maintenance under activation of M-cholinergic receptors and P2Y receptors in the secretory cells of the rat lacrimal gland was investigated.

The study was carried out on intact and permeabilized secretory cells of exorbital lacrimal glands of rats. The cells were isolated using the modified Herzog, Sides, Miller method (1976) and permeabilized with digitonin (50 μg per 0.5 mil-

lion cells). The functioning of the Ca²⁺-transport systems was estimated by changes of Ca²⁺ content in the studied cells, which was determined by the spectrophotometric method using arsenazo III.

It was shown that IP₃-sensitive Ca²⁺ channels (IP₃Rs) of investigated cells are directly inhibited by 2-APB (10 μM/l). On the other hand, the channels are activated by IP₃, cholinomimetic (carbacholine) and purine receptor agonist (ATP). When both M-cholinergic receptors and P2Y receptors were activated Ca²⁺ was released from the same IP₃-sensitive store because the effects of ATP and carbacholine at high concentrations (1mM/l and 10 μM/l, respectively) on the Ca²⁺ content were non-additive.

The presence of the store-operated Ca²⁺-channels in secretory cells of the lacrimal gland is confirmed by the observed increase of cellular Ca²⁺ content as a result of Ca²⁺ mobilization from the store by carbacholine or thapsigargin and following restoration of Ca²⁺ concentration in the extracellular solution.

Key words: IP₃Rs, M-cholinoreceptors, P2Y-purinoreceptors, store-operated Ca²⁺ entry, ATP, carbacholine, secretory cells, lacrimal gland.

1. Gromada J., Jurgensen T., Dissing S. // Pflügers Arch-Eur. J. Physiol. — 1995. — **429**, N 4. — P. 578–586.
2. Medina-Ortiz W. E., Gregg E. V., Brun-Zinkernagel A. M., Koulen P. // Open Ophthalmol. J. — 2007. — **1**. — P. 8–16. DOI: 10.2174/1874364100701010008
3. Bird G. St. J., Putney J. W., Jr. // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**, N 12. — P. 6766–6770.
4. Lee M. G., Xu X., Zeng W. et al. // J. Biol. Chem. — 1997. — **272**, N 25. — P. 15765–15770.
5. Cancela J. M., Van Coppenolle F., Galione A. et al. // EMBO J. — 2002. — **21**, N 5. — P. 909–919.
6. Ambudkar I. S. // Crit. Rev. Oral Biol. Med. — 2000. — **11**, N 1. — P. 4–25.
7. Дубицький Л. О. Енергозалежні Ca²⁺-транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз та механізми взаємодії їх з катіонами металів : автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 2006. — 39 с.
8. Манько В. В. Системи транспортування Ca²⁺ у секреторних клітинах екзокринних залоз. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. — 2011. — 271 с.
9. Манько В. В., Бичкова С. В., Клевець М. Ю. // Укр. біохім. журн. — 2004. — **76**, № 1. — С. 65–71.
10. Чорна Т., Манько В., Клевець М. // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол. — 2009. — **49**. — С. 182–189.

11. *Dartt D. A.* // *Curr. Eye Res.* – 1989. – **8**, N 6. – P. 619–636.
12. *Mauduit P., Jammes H., Rossignol B.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1993. – **264**, (6 Pt. 1). – P. C1550–C1560.
13. *Herzog V., Sies H., Miller F.* // *J. Cell Biol.* – 1976. – **70**. – P. 692–706.
14. *Великопольська О. Ю., Манько Б. О., Манько В. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – **84**, № 5. – С. 76–88.
15. *Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А.* // *Биохимия.* – 1997. – **62**. – С. 1666–1671.
16. *Manko B. O., Klevets M. Y., Manko V. V.* // *Cell Biochem. Funct.* – 2013. – **31**, N 2. – P. 115–121.
17. *Voogd T. E., Vansterkenburg E. L.M., Wilting J., Janssen L. H. M.* // *Pharmacol. Rev.* – 1993. – **45**, N 2. – P. 177–203.
18. *Missiaen L., Callewaert G., De Smedt H., Parys J. B.* // *Cell Calcium.* – 2001. – **29**, N 2. – P. 111–116.
19. *Wu J., Kamimura N., Takeo T. et al.* // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – **58**, N 6. – P. 1368–1374.
20. *Kamada Y., Saino T., Oikawa M. et al.* // *Histochem. Cell Biol.* – 2012. – **137**, N 1. – P. 97–106.
21. *Bootman M. D., Collins T. J., Mackenzie L. et al.* // *FASEB J.* – 2002. – **16**, N 10. – P. 1145–1150.
22. *Великопольська О. Ю., Манько В. В.* // *Біологічні студії / Studia Biologica.* – 2009. – **3**, № 3. – С. 39–50.
23. *Putney J. W., Jr.* // *Cell Calcium.* – 1986. – **7**, Issue 1. – P. 1–12.
24. *Kwan C. Y., Takemura H., Obie J. F. et al.* // *Am. J. Physiol.* – 1990. – **258**, (6 Pt. 1). – P. C1006–C1015.
25. *Foskett J. K., Roifman C. M., Wong D.* // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266**, N 5. – P. 2778–2782.
26. *Chew C. S., Petropoulos A. C.* // *Cell Regul.* – 1991. – **2**, N 1. – P. 27–39.
27. *Putney J. W., Jr., McKay R. R.* // *BioEssays.* – 1999. – **21**, N 1. – P. 38–46.
28. *Kiselyov K. I., Mamin A. G., Semyonova S. B., Mozhayeva G. N.* // *FEBS Lett.* – 1997. – **407**. – P. 309–312.
29. *Ma H.-T., Patterson, R. L., van Rossum D. B. et al.* // *Science.* – 2000. – **287**, N 5458. – P. 1647–1651.
30. *Mikoshiha K., Hisatsune Ch., Futatsugi A. et al.* // *Cornea.* – 2008. – **27**, N 8, Supp. 1. – P. S3–S8.
31. *Dubyak G. R., EI-Moatassim C.* // *Am J Physiol.* – 1993. – **265**, (3 Pt. 1). – P. C577–C606.
32. *Burnstock G.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – **147**, N 1. – P. S172–S181.
33. *McMillian M. K., Soltoff S. P., Lechleiter J. D. et al.* // *Biochem. J.* – 1988. – **255**, N 1. – P. 291–300.
34. *Sasaki T., Gallacher D. V.* // *FEBS Lett.* – 1990. – **264**, N 1. – P. 130–134.
35. *Toescu E. C., Lawrie A. M., Petersen O. H., Gallacher D. V.* // *EMBO J.* – 1992. – **11**, N 4. – P. 1623–1629.
36. *Shatos M., Masli S., Hodges R., Dartt D.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – **52**. – P. 3706.
37. *Abbracchio M. P., Burnstock G., Boeynaems J. M. et al.* // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – **58**, N 3. – P. 281–341.
38. *Bruce J. I. E., Shuttleworth T. J., Giovannucci D. R., Yule D. I.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 2. – P. 1340–1348.
39. *Sneyd J., Tsaneva-Atanasova K., Bruce J. I. et al.* // *Biophys. J.* – 2003. – **85**, N 3. – P. 1392–1405.
40. *Hurley T. W., Shoemaker D. D., Ryan M. P.* // *Am. J. Physiol.* – 1993. – **265**, (6 Pt. 1). – P. C1472–C1478.

Отримано 22.01.2013