

УДК 612.673.1.014.423—06:615.217.2/3

В. В. Файзулин

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА И ИЗАДРИНА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АЦИНАРНЫХ КЛЕТОК ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС IN VITRO

Работами Фролькиса с сотр. показано, что существенные сдвиги нейро-гуморальной регуляции органов и тканей в старости во многом обусловлены нарушением мембранных механизмов контроля функции клетки [2, 3]. Для изучения этих механизмов удачным объектом являются слюнные железы млекопитающих, поскольку в них тесно сопряжены три важнейших биологических процесса: синтез белка, секреция и электрическая активность.

В настоящей работе сделана попытка сопоставить влияние холино-адренергических факторов на электрическую активность ацинарных клеток околоушных слюнных желез (ОСЖ) взрослых и старых крыс.

Для выяснения роли электрогенного насоса в холино-адренергическом ответе мембраны ацинарных клеток и анализа возможных изменений активного транспорта неорганических ионов при старении в отдельной серии опытов использовался убаин.

Методика исследований

Опыты проведены на ОСЖ белых крыс-самцов двух возрастных групп: взрослых (6—10 мес) и старых (24—28 мес). Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением пентобарбитала (3 мг/100 г). Толстый срез ОСЖ помещали в проточную тканевую баню, объем которой составлял 1 мл, скорость протока 5 мл/мин. Для перфузии срезов использовали сбалансированный солевой раствор Krebs—Хенселейт [7]. Уровень раствора над поверхностью железы не превышал 1 мм. Аэрации раствора достигали в части опытов газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Большинство опытов проведены при оксигенации раствора воздухом с помощью микрокомпрессора. Температуру раствора поддерживали на постоянном уровне (37° С) микротермостатом.

Для отведения мембранного потенциала (МП) от поверхностных (ацинарных) клеток использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 3 М раствором KCl, с сопротивлением кончика 15—50 МОм. МП усиливали усилителем биопотенциалов «Nihon Kohden» и регистрировали на электропишущем приборе ЭПП-09М.

Холино-адренергическую стимуляцию поверхностных клеток осуществляли инъекцией ацетилхолина (АХ), норадреналина (НА) или изадрина (ИЗ) в тканевую баню у поверхности среза железы. Стимуляторы растворяли в перфузирующем растворе непосредственно перед опытом. Описанные условия опыта позволяли отводить МП отдельных ацинарных клеток в течение десятков минут и многократно тестировать одну и ту же клетку.

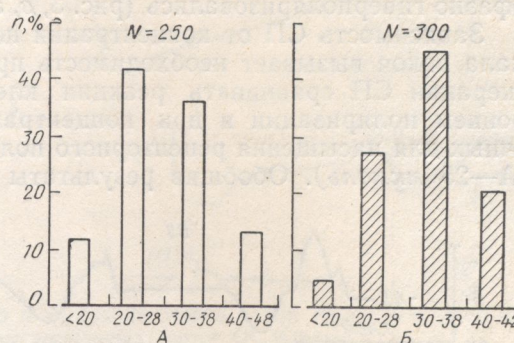
Результаты исследований

Контрольные измерения МП интактных ацинарных клеток обнаруживали большую вариабельность этого показателя функционального состояния ткани (рис. 1). У старых животных выявлено большее количество клеток с высоким уровнем МП. Средняя величина МП составила у взрослых крыс $-24,5 \pm 0,3$, у старых $-30,2 \pm 0,5$ мВ ($p < 0,05$).

Холинэргическая стимуляция срезов выявила высокую чувствительность ацинарных клеток к АХ животных обеих возрастных групп. Уже концентрация $25 \cdot 10^{-9}$ мкмоль вызывала генерацию «секреторных потенциалов» по терминологии Лундберга [цит. по [5]]. Зависимость секреторных потенциалов (СП) от концентрации АХ показана на рис. 2, а.

Чувствительность железистых клеток ОСЖ к НА оказалась значительно ниже, чем к АХ. Концентрации НА, необходимые для генерации СП, на несколько порядков превышали соответствующие концентрации АХ. При этом пороговая концентрация НА в наших условиях составила $5 \cdot 10^{-3}$ мкмоль для взрослых и $2,5$ мкмоль — для старых крыс.

Рис. 1. Частотное распределение ацинарных клеток (п%) околоушных слюнных желез крыс по уровню МП. А — взрослые, Б — старые животные. N — количество измерений.



Изменения МП в ответ на холинэргическую и α -адренергическую стимуляцию при уровне потенциала покоя от -25 до -45 мВ были в большинстве случаев полифазного характера. При этом наблюдались три фазы СП: 1) быстрая первичная гиперполяризация (ПГ); 2) де-

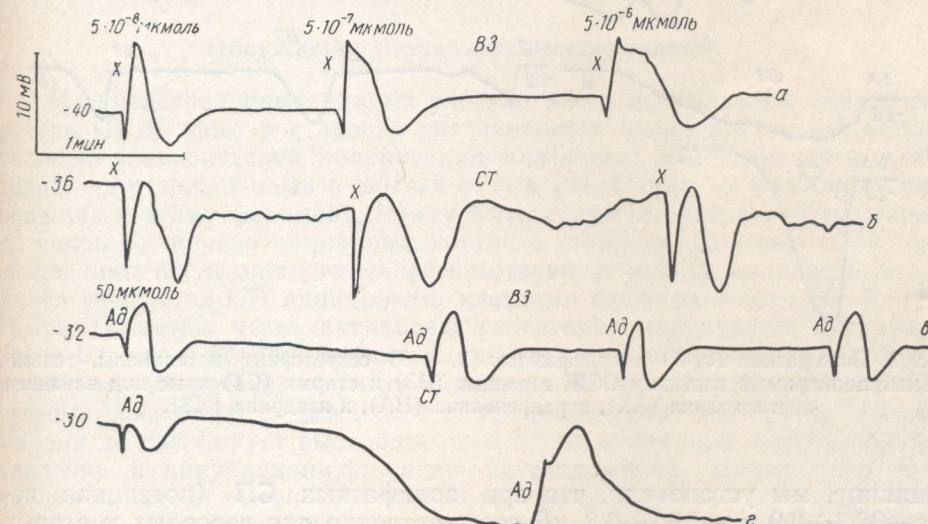


Рис. 2. Секреторные потенциалы в ответ на холинэргическую (X) и α -адренергическую (Ad) стимуляцию ацинарных клеток ОСЖ взрослых (B3) и старых (CT) крыс. Зависимость от концентрации нейромедиаторов (а, б) и потенциала покоя (в, г). Гиперполяризация — отклонение линии трансмембранного потенциала вниз.

поляризация; 3) медленная и более длительная вторичная гиперполяризация (ВГ). Общая длительность всех фаз СП составляла в этом случае около 45 с (рис. 2, а, б). Зависимость СП от уровня МП можно проследить на одной и той же клетке (рис. 2, в, г). Видно, что при повышении уровня МП до определенной («критической») величины гиперполяризация мембраны в ответ на стимул может смениться деполяри-

зацией. В наших опытах монофазная деполяризация или бифазные потенциалы (деполяризация-гиперполяризация) наблюдались при уровнях МП, превышающих -40 мВ (рис. 3, а).

Единичные клетки с МП -40 мВ отвечали длительной гиперполяризацией со значительной амплитудой (до 15 мВ), на фоне которой наблюдались низкоамплитудные колебания потенциала. В этих случаях длительность СП составляла несколько минут (рис. 3, б).

Клетки с низким МП (менее -25 мВ) в ответ на стимуляцию монофазно гиперполяризовались (рис. 3, в, г).

Зависимость СП от концентрации нейромедиатора и уровня потенциала покоя вызывает необходимость при оценке возрастных различий генерации СП сравнивать реакции клеток с одинаковым исходным уровнем поляризации и при концентрациях нейромедиаторов, достаточных для насыщения рецепторного поля клетки (АХ— $25 \cdot 10^{-3}$ мкмоль, НА— 25 мкмоль). Обобщив результаты наших исследований по этому

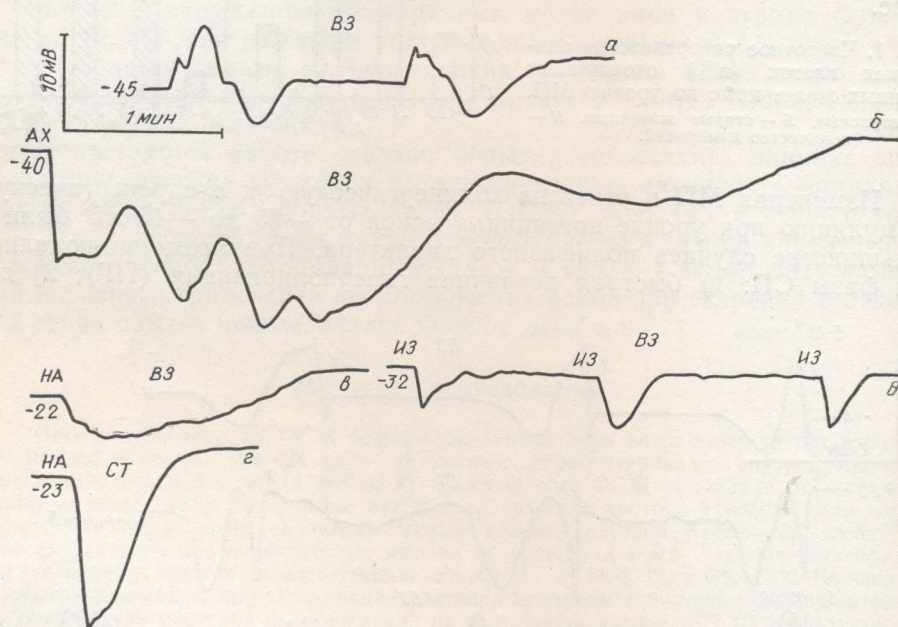


Рис. 3. Полифазные (а, б) и монофазные (в, г, д) секреторные потенциалы, генерируемые ацинарными клетками ОСЖ взрослых (ВЗ) и старых (СТ) крыс под влиянием ацетилхолина (АХ), норадреналина (НА), и изадрина (ИЗ).

принципу, мы установили, что при полифазных СП (потенциал покоя $-32,3 \pm 0,9$ и $-31,7 \pm 0,8$ мВ соответственно для взрослых и старых крыс) амплитуда фазы ПГ статистически выше у старых животных: $2,5 \pm 0,3$ и $5,0 \pm 0,7$ мВ соответственно ($p < 0,01$). Амплитуда фазы ВГ также достоверно выше у старых крыс: $4,2 \pm 0,6$ и $7,1 \pm 0,9$ мВ соответственно ($p < 0,05$). Амплитуда фазы деполяризации полифазных СП ниже у старых крыс: $5,5 \pm 0,6$ и $2,6 \pm 0,7$ мВ соответственно ($p < 0,02$).

Уровень монофазной гиперполяризации для клеток с низким МП выше у старых животных (рис. 3, в, г). Кроме того, из общего числа СП, зарегистрированных в наших опытах, количество ответов без фазы деполяризации составило в группе взрослых крыс 17%, а в группе старых — 40%.

Изадрин в концентрации 25 мкмоль всегда вызывал кратковременную гиперполяризацию (рис. 3, д). Возрастных различий изадрин-индуцированной гиперполяризации не обнаружено.

Инъекция в тканевую баню убаина (1 ммоль) в большинстве случаев вызывала кратковременную гиперполяризацию ацинарных клеток, более выраженную у старых крыс (рис. 4, а, б).

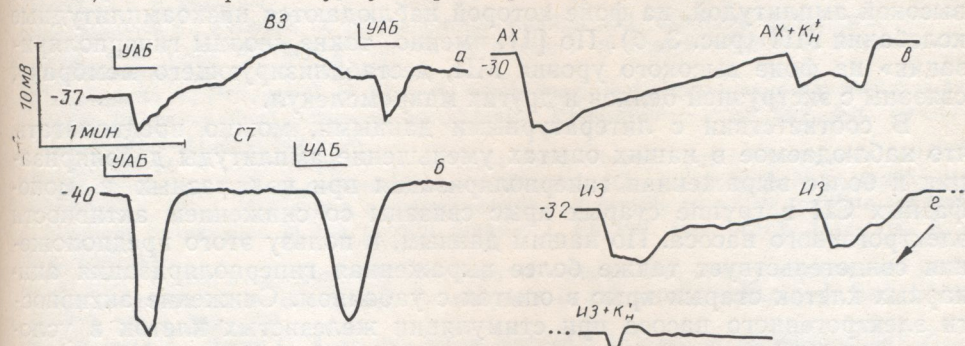


Рис. 4. Влияние убаина (УАБ) — а, б и экстраклеточного калия (K^+) — в, г на МП и секреторные потенциалы ацинарных клеток ОСЖ крыс.

В некоторых опытах вместе с нейромедиаторами в тканевую баню инъецировали контрольный раствор с десятикратной концентрацией K^+ (47 ммоль). В этом случае амплитуда СП резко снижалась по сравнению с контролем (рис. 4, в, г).

Обсуждение результатов исследований

Из представленных данных следует, что в поляризации ацинарных клеток ОСЖ крыс в старости увеличивается число клеток с высоким уровнем электрической поляризации мембраны. Эти результаты идентичны полученным нами в опытах *in situ* [4]. Одним из факторов, приводящих к этому феномену, может быть снижение активного транспорта ионов K^+ внутрь ацинарных клеток в старости. Действительно, исследования последних лет свидетельствуют в пользу калиевого механизма генерации СП ацинарными клетками слюнных желез [6—8, 11]. Нейромедиаторы через активацию рецепторов индуцируют высвобождение K^+ , что и обуславливает начальную гиперполяризацию клеточной мембраны. Считается, что высвобождение K^+ является пассивным процессом, связанным с изменением проницаемости мембраны [6—9]. Убаин не ингибирует высвобождение K^+ из ацинарных клеток при добавлении в инкубационную среду катехоламинов. Более того, сам убаин вызывает высвобождение K^+ из клеток [6].

Фаза деполяризации при полифазных реакциях, согласно литературным данным [7], связана с обратным захватом K^+ , протекающим с участием $Na^+—K^+$ АТФазы, и изменением проницаемости для Na^+ . Высокая активность $Na^+—K^+$ АТФазы зарегистрирована в подчелюстных железах крыс [12]. Таким образом, сдвиг МП ацинарных клеток при холино-адренергической стимуляции является следствием аддитивного действия двух противоположно направленных процессов: пассивного высвобождения K^+ и обратного захвата этого иона электрогенным насосом, сопряженного с пассивным входом Na^+ . В этом случае деполяризующий эффект нейромедиаторов будет зависеть, очевидно, от активности электрогенного насоса. Показано также, что в условиях

стимуляции активируются локусы мембраны, ответственные за транспорт Ca^{++} внутрь ацинарной клетки — фактора, стимулирующего секрецию макромолекул [10]. Вторичная гиперполяризация связана, очевидно, с активным транспортом Na^+ из ацинарных клеток и выходом K^+ и Ca^{++} по электрохимическим градиентам. В случае готовности клетки к экстррузии макромолекул эта фаза СП протекает волнообразно, с высокой амплитудой, на фоне которой наблюдаются низкоамплитудные колебания МП (рис. 3, б). По [1], именно такие «волны гиперполяризации» на фоне высокого уровня МП, дестабилизирующего мембрану, связаны с экстррузией белков и других макромолекул.

В соответствии с литературными данными, можно предполагать, что наблюдаемое в наших опытах уменьшение амплитуды деполяризации и более выраженная гиперполяризация при полифазных и монофазных СП в группе старых крыс связаны со снижением активности электрогенного насоса. По нашим данным, в пользу этого предположения свидетельствует также более выраженная гиперполяризация ацинарных клеток старых крыс в опытах с убаином. Снижение активности электрогенного насоса при стимуляции железистых клеток в условиях стареющего организма должно приводить к нарушению водно-солевого состава клеток, их обезвоживанию, снижению интенсивности секреторных и синтетических процессов.

Выводы

1. В опытах *in vitro* на срезах околоушной слюнной железы крыс с использованием проточной тканевой бани обнаружено увеличение количества ацинарных клеток с высоким МП в группе старых животных.
2. При холинергической и α -адренергической стимуляции срезов выявлены изменения МП ацинарных клеток, зависящие от концентрации нейромедиатора и уровня потенциала покоя клетки. В диапазоне МП от -25 до -40 мВ зарегистрированы полифазные секреторные потенциалы. В этом случае установлено статистически достоверное увеличение амплитуды быстрой и медленной гиперполяризации в группе старых крыс. В то же время для ацинарных клеток старых крыс характерно снижение амплитуды фазы деполяризации. Клетки с МП ниже -25 мВ монофазно гиперполяризовались, а клетки с МП ≥ -45 мВ монофазно деполяризовались или генерировали бифазные секреторные потенциалы.
3. β -адренергическая стимуляция ацинарных клеток вызывает кратковременную гиперполяризацию. Возрастных различий при этом не обнаружено.
4. Убаин вызывал кратковременную гиперполяризацию клеток, более выраженную в группе старых животных.
5. Чувствительность ацинарных клеток к норадреналину выше в группе взрослых крыс.

Литература

1. Гуткин В. И. Механизм генерации секреторных потенциалов железистыми клетками. — Усп. соврем. биол., 1976, 82, № 3, с. 460—471.
2. Фролькис В. В., Мартыненко О. А., Коротконожкин В. Г. Влияние ингибиторов биосинтеза белка на развитие гиперполяризации одиночных мышечных волокон. — Биофизика, 1974, 17, № 15, с. 839—843.
3. Фролькис В. В. Изменение связи между активностью генетического аппарата и уровнем поляризации мембраны клетки — важный механизм старения. — В кн.: Физиологические и молекулярные аспекты онтогенеза. К.: Наукова думка, 1977, с. 35—42.

4. Файзулін В. В. Вікові особливості збудження ацинарних клітин привушної слинної залози щура при адренергічній стимуляції.— Фізіологічний журнал., 1977, 23, № 1, с. 88—91.
5. Яременко М. С. Механізм утворення водно-солевого складу секрету слинних залоз.— Усп. фізіол. наук., 1976, 7, № 1, с. 118—132.
6. Martinez J. R., Quissell D. O., Giles M. Potassium release from the rat submaxillary gland in vitro. 1. Induction by catecholamines.— J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1976, 198, N 2, p. 385—394.
7. Nishiyama A., Petersen O. H. Membrane potential and resistance measurement in acinar cells from salivary glands in vitro effect of acetylcholine.— J. Physiol. (Gr. Brit.), 1974, 242, N 1, p. 173—188.
8. Nishiyama A., Petersen O. H. Biphasic membrane potential changes in pancreatic acinar cells following short pulses of acetylcholin stimulation.— Proc. Roy. Soc. London., 1975, 191, N 1105, p. 549—553.
9. Petersen O. H. The dependence of the transmembrane potential on the external potassium and sodium concentration.— J. Physiol. (Gr. Brit.) 1970, N 1, p. 205—215.
10. Putney J. W., J. Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland.— J. Physiol. (Gr. Brit.), 1977, 268, N 1, p. 139—149.
11. Selinger Z., Batzri S., Eimerl S., Schramm M. Calcium and energy requirements to K⁺ release mediated by the epinephrine receptors in rat parotid slices.— J. Biol. Chem., 1973, 248, p. 369—372.
12. Schwartz A., Moore C. A. Highly active Na⁺—K⁺ ATP-ase in rat submaxillary gland bearing on salivary secretion.— Am. J. Physiol., 1968, 214, p. 1163—1167.

Лаборатория физиологии Института
геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила в редакцию
4.VII 1978 г.

V. V. Faizulin

AGE PECULIARITIES OF ACETYLCHOLINE, NOREPINEPHRINE
AND NEOEPINEPHRINE EFFECTS ON MEMBRANE POTENTIAL IN
ACINAR CELLS OF RAT PAROTID SALIVARY GLAND IN VITRO

Summary

The effects of acetylcholine, norepinephrine and neopinephrine on the membrane potential (MP) of acinar cells of the parotid gland were studied in vitro in adult and old rats. The dependence was found between the changes in MP and the resting potential, transmitter concentrations and animal age. The polyphase «secretory potentials» generated by acinar cells of old rats was characterized by a higher amplitude of rapid (primary) and slow (secondary) hyperpolarizations. The depolarization phase was more pronounced in adult animals. Ouabain caused hyperpolarization of acinar cells which was more developed in old animals.

Laboratory of Physiology,
Institute of Gerontology,
Academy of Medical Sciences, USSR, Kiev