

Роль кальция в экстррузии пищеварительных ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы

М. Я. Гринькив, М. Ю. Клевец, И. В. Шостаковская

Холинергический механизм — важное звено в регуляции секреторной деятельности ацинарных клеток поджелудочной железы. Считается, что вторичным посредником в реализации холинергической регуляции на внутриклеточном уровне является кальций [28]. Доказано, что для стимуляции выделения ферментов ацинарными клетками необходимо повышение концентрации этого катиона в цитозоле [11]. Однако данные относительно соотношения роли внутри- и внеклеточных ионов кальция, а также участия в экстррузии кальмодулина (КМ) малочисленны и противоречивы [13, 15, 18, 25]. Не выяснены также пути трансмембранного входа Ca^{2+} из внеклеточного пространства в панкреатические клетки. Перечисленные вопросы и составили предмет исследований, описанных в данной статье.

Методика

Исследования проведены на суспензии диспергированных панкреатических ацинусов белых крыс, получаемой с помощью метода Вильямса [27]. Для определения зависимости экстррузии ферментов от концентрации внеклеточного Ca^{2+} необходимое количество CaCl_2 в растворе Кребса [1] заменяли NaCl . Гиперкалиевый раствор (100 ммоль/л) готовили добавлением сухой соли KCl к раствору Кребса, а также заменой 100 ммоль/л NaCl таким же количеством KCl . Гипонатриевый раствор (26,3 ммоль/л) содержал соответствующее количество сахарозы. Блокаторы Ca -каналов MnCl_2 (10^{-4} моль/л) и верапамил (10^{-6} моль/л) растворяли в изотоническом растворе NaCl и вносили по 0,1 мл на 2 мл инкубационного раствора. Ионофор X-537A растворяли в этаноле, а затем вносили в раствор Кребса. Окончательная концентрация этанола составляла не более 0,025 %, причем контрольная проба содержала такое же количество спирта. В качестве стимулятора секреции во всех сериях опытов использовали карбахоллин (КХ) в концентрации 10^{-6} моль/л. Показателем экстррузии служило выделение в инкубационную среду общего белка, амилазы, а в некоторых сериях опытов — и липазы. Экстррузию ферментов рассчитывали как процентное отношение между приростом ферментативной активности инкубата за время инкубации в нем изолированных ацинусов и суммарной ферментативной активностью инкубата и клеточного лизата [22]. Аналогично оценивали экстррузию белка. Активность амилазы определяли по методу Смита и Рое в модификации Уголева [5], активность липазы — по методу Бонди в модификации Рожковой [4], содержание белка в инкубате и клеточном лизате — по методу Лоури [17]. Цифровые результаты исследований обрабатывали статистически с определением коэффициента Стьюдента.

Результаты

Зависимость экстррузии от внеклеточной концентрации ионов кальция. В первой серии опытов изучали проявление стимулирующего действия КХ на экстррузию белка, амилазы и липазы в зависимости от концентрации экстрацеллюлярного кальция. За исходную принимали концентрацию CaCl_2 1,28 ммоль/л, поскольку при ней клетки ацинусов нормально функционируют и проявляют меньшую тенденцию к слипанию [27]. Каждая следующая концентрация была вдвое меньше предыдущей. Концентрация, обозначенная на графике (рис. 1) как «0», означает, что в инкубационный раствор CaCl_2 не вносили, а для полного устранения Ca^{2+} во внеклеточной среде применяли хелатирующий агент ЭГТА (10^{-4} моль/л). Показано, что зависимость стимулированной экстррузии белка, амилазы и липазы клетками диспергированных ацинусов от концентрации внеклеточного Ca^{2+} описывается S-образной кривой (см. рис. 1). При увеличении содержания экстрацеллюлярного кальция

от следовых количеств до 0,64 моль/л наблюдалось повышение выделения белка в 2,5 раза, амилазы — в 2 раза и липазы — в 1,9 раз. Дальнейшее увеличение содержания ионов кальция в инкубационной среде в меньшей мере влияло на экструдию, и концентрация Ca^{2+} в среде, близкая к миллимолярной, очевидно, достаточна для полной реализации действия КХ.

Исследование экструдии амилазы в динамике в кальцийсодержащей и бескальциевой (с ЭГТА) средах показало, что при наличии во внекле-

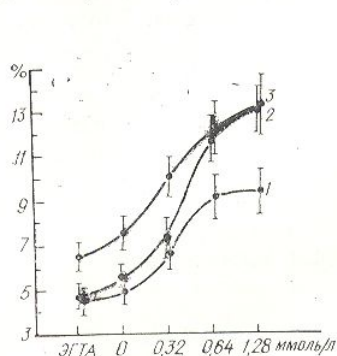


Рис. 1. Зависимость стимулированной карбахолом экструдии (%) амилазы (1), белка (2) и липазы (3) от внеклеточной концентрации Ca^{2+} (ммоль/л).

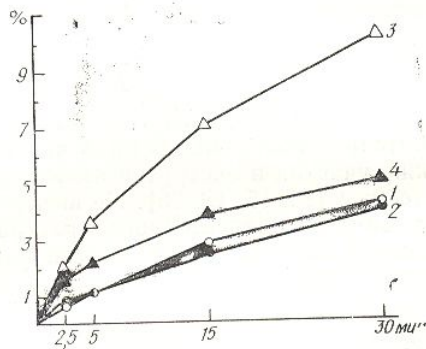


Рис. 2. Динамика спонтанной (1, 2) и стимулированной карбахолом (3, 4) экструдии (%) амилазы в кальцийсодержащем (1, 3) и бескальциевом с ЭГТА (2, 4) растворах.

точном растворе нормальной концентрации Ca^{2+} на протяжении 30 мин клетки диспергированных ацинусов спонтанно выделяли 4,2 % их общего запаса амилазы (рис. 2). Удаление из инкубационной среды кальция практически не изменяло базальную секрецию, но значительно уменьшало секреторный ответ на действие КХ. В то время, как в кальцийсодержащем растворе за 30 мин инкубации с КХ экструдия амилазы ацинусными клетками достигала 10,2 %, в бескальциевой среде она не превышала 5 % общего запаса фермента. Необходимо отметить, что в первые минуты после внесения КХ резкое увеличение экструдии амилазы наблюдалось не только в кальцийсодержащей, но и в бескальциевой среде, что свидетельствует о проявлении действия КХ в этих условиях. Аналогичный характер носит динамика выделения белка и липазы.

Участие кальция внутриклеточных депо в запуске экструдии панкреатических ферментов. Результаты предыдущей серии опытов показали, что на начальном этапе действие стимулятора проявляется даже при отсутствии внеклеточных ионов кальция. Очевидно, при этом используются депонированные в клетках его запасы. Для проверки этого предположения мы действовали на клетки изолированных ацинусов кофеином, который, как известно, высвобождает Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула [26]. Инкубация диспергированных ацинусов с кофеином (10^{-3} моль/л) в течение 5 мин вызывала значительную стимуляцию экструдии амилазы и белка. В сравнении с базальным уровнем, составляющим для амилазы ($1,0 \pm 0,1$ %), а для белка — ($0,9 \pm 0,1$ %), под влиянием кофеина выделялось ($2,7 \pm 0,4$ %) амилазы и ($3,1 \pm 0,4$ %) белка. Интересно отметить, что эти значения близки к значению стимулированной КХ экструдии в бескальциевой среде за такое же время.

Пути трансмембранного входа ионов кальция в ацинарные клетки. Выраженная зависимость стимулированной экструдии от концентрации внеклеточного Ca^{2+} вызывает необходимость изучения путей, по которым возможен вход внеклеточного кальция в клетки. С этой целью мы использовали Mn^{2+} и верапамил, блокирующие преимущественно потенциалозависимые кальциевые каналы, а также изучали влияние на экструдию калиевой деполяризации мембраны. Mn^{2+} (10^{-4} моль/л) в резуль-

тате 5-минутного действия снижал стимулированную $\pm 0,3$ % и ($4,7 \pm 0,1$ %) до Верапамил (10^{-6} моль/л) амилазы в 1,4 раза, белка — приготовленный добавлен значительно (в 1,3 раза), амилазы. Действие его по

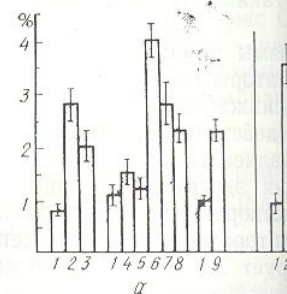


Рис. 3. Влияние верапамила и (%) амилазы (а) и белка (б). 1 — спонтанная экструдия, 2 — при 1, 4 — в гиперкалиевом растворе с нормальном фоне верапамила, 6 — при добавлении со сниженной концентрацией Na^{+} (9 — в гипонатриевом (26,3 ммоль/л) р

Рис. 4. Влияние трифторперазина и белка (б) диспергированными 1 — спонтанная экструдия, 2 — при д добавлении X-537A, 5 — при добавлен

калиевой деполяризации выделение ферментов. В меной 100 ммоль/л NaCl усиление выделения амила этих условиях снижал экстр и Na^{+} во внеклеточной стимулировало выделение, уменьшал лишь экструдию и не влиял на экструдию, среды большей части Na^{+} .

Роль кальмодулина в ти в Са-зависимых внут зывающих белков следующ ствия ингибитора КМ триф Внесение в среду инкубац подавляло ответ ацинарны ление ими фермента до ур фор X-537A (10^{-6} моль/л), тическую мембрану незав несколько увеличивал экст клеточный раствор одного шала базальный уровень п

Обсуждение результатов

Как свидетельствуют полу пищеварительных фермент лезы крыс важную роль ттверждается снижением ст концентрации внеклеточно

тате 5-минутного действия на клетки диспергированных ацинусов снижал стимулированную КХ экстрюзию амилазы и белка от $(3,3 \pm 0,3) \%$ и $(4,7 \pm 0,1) \%$ до $(2,5 \pm 0,4) \%$ и $(3,0 \pm 0,2) \%$ соответственно. Верапамил (10^{-6} моль/л) уменьшал стимулированное КХ выделение амилазы в 1,4 раза, белка — в 1,5 раза (рис. 3). Гиперкалиевый раствор, приготовленный добавлением 100 ммоль/л KCl к раствору Кребса, незначительно (в 1,3 раза), но достоверно повышал экстрюзию белка и амилазы. Действие его полностью устранялось верапамилом. На фоне

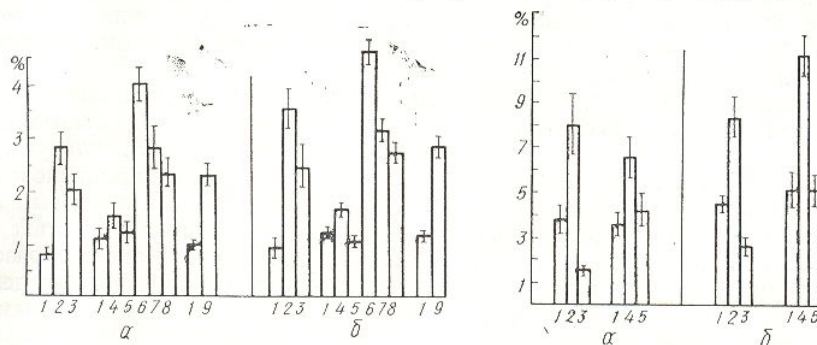


Рис. 3. Влияние верапамила и гиперкалиевой деполаризации мембраны на экстрюзию (%) амилазы (а) и белка (б) изолированными ацинусами поджелудочной железы: 1 — спонтанная экстрюзия, 2 — при добавлении КХ, 3 — при добавлении КХ на фоне верапамила, 4 — в гиперкалиевом растворе с нормальным содержанием Na^+ , 5 — в гиперкалиевом растворе на фоне верапамила, 6 — при добавлении КХ в гиперкалиевый раствор, 7 — в гиперкалиевом растворе со сниженной концентрацией Na^+ (до 26,3 ммоль/л), 8 — в том же растворе на фоне верапамила, 9 — в гипонатриевом (26,3 ммоль/л) растворе.

Рис. 4. Влияние трифторперазина и ионофора X-537A на экстрюзию (%) амилазы (а) и белка (б) диспергированными ацинусами поджелудочной железы: 1 — спонтанная экстрюзия, 2 — при добавлении КХ, 3 — при добавлении КХ на фоне ТФП, 4 — при добавлении X-537A, 5 — при добавлении X-537A на фоне ТФП.

калиевой деполаризации мембраны КХ дополнительно стимулировал выделение ферментов. В гиперкалиевом растворе, приготовленном заменой 100 ммоль/л NaCl таким же количеством KCl, наблюдалось усиление выделения амилазы и белка более чем в 2 раза. Верапамил в этих условиях снижал экстрюзию лишь частично. Уменьшение концентрации Na^+ во внеклеточной среде до 26,3 ммоль/л само по себе также стимулировало выделение ферментов ацинарными клетками. Верапамил уменьшал лишь экстрюзию, вызванную K^+ -деполаризацией мембраны, и не влиял на экстрюзию, обусловленную удалением из инкубационной среды большей части Na^+ .

Роль кальмодулина в экстрюзии. В связи с предполагаемым участием в Са-зависимых внутриклеточных процессах регуляторных Са-связывающих белков следующие опыты были посвящены изучению действия ингибитора КМ трифторперазина (ТФП) на экстрюзию ферментов. Внесение в среду инкубации ТФП (20 мкмоль/л) не только полностью подавляло ответ ацинарных клеток на действие КХ, но и снижало выделение ими фермента до уровня меньшего чем базальный (рис. 4). Ионофор X-537A (10^{-6} моль/л), осуществляющий перенос Ca^{2+} через плазматическую мембрану независимо от кальциевых каналов, на фоне ТФП несколько увеличивал экстрюзию ферментов. При внесении же во внеклеточный раствор одного ионофора экстрюзия белка и амилазы превышала базальный уровень почти в 2 раза.

Обсуждение результатов

Как свидетельствуют полученные нами результаты, во время экстрюзии пищеварительных ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы крыс важную роль играет внеклеточный Ca^{2+} . Такой вывод подтверждается снижением стимулирующего эффекта КХ при уменьшении концентрации внеклеточного кальция и на фоне блокирования кальцие-

вых каналов верапамилом и Mn^{2+} . Стимуляция экстрюзии Са-ионофором X-537A указывает на то, что и холиномиметики запускают экстрюзию благодаря повышению концентрации в цитозоле ионизированного кальция, проникающего из внеклеточного пространства. Это заключение согласуется с точкой зрения других исследователей [10, 16]. Существует, однако, мнение, согласно которому внеклеточные катионы Са²⁺ не играют существенной роли в экстрюзии [9, 25]. Стимулирующий эффект КХ реализуется полностью при концентрации кальция в среде, близкой к 1 ммоль/л. Существующий в этих условиях трансмембранный кальциевый градиент обеспечивает, таким образом, достаточное для экстрюзии поступление в клетки Са²⁺.

Возникает вопрос, каковы пути и механизмы проникновения Са²⁺ в клетки во время экстрюзии. Поскольку блокаторы потенциалозависимых кальциевых каналов верапамил и Mn^{2+} снижают стимулирующий эффект КХ, можно предположить, что при его действии проникновение Са²⁺ в клетки осуществляется по электроуправляемым кальциевым каналам. Об этом свидетельствует и стимуляция экстрюзии в ответ на деполяризацию мембраны гиперкалиевым раствором. Таким образом, деполяризацию мембраны, взаимодействуя с холинорецепторами, вызывает деполяризацию мембраны, которая затем активирует электроуправляемые кальциевые каналы. Данные электрофизиологических исследований указывают на то, что ацетилхолин действительно вызывает деполяризацию мембраны ацинарных клеток поджелудочной железы [20]. Прямым подтверждением проникновения Са²⁺ в клетки по потенциалозависимым каналам могло бы служить обнаружение кальциевого тока в ответ на деполяризацию мембраны. Электроуправляемые кальциевые каналы служат, очевидно, не единственным путем для проникновения кальция в клетки. Поскольку на фоне секреции, стимулируемой гиперкалиевой деполяризацией мембраны, КХ дополнительно стимулировал экстрюзию, можно предполагать проникновение Са²⁺ в клетки и по хемоправляемым каналам.

Выявленную нами стимуляцию экстрюзии в ответ на действие гипонатриевого раствора можно объяснить снижением в этих условиях оттока из клеток Са²⁺ посредством Na-Са-обмена [7], который в нормальных условиях играет, по-видимому, важную роль в выведении кальция из ацинарных клеток. Значительная стимуляция экстрюзии панкреатических ферментов гиперкалиевым раствором со сниженной концентрацией натрия вызвана, очевидно, двойным механизмом повышения содержания в цитозоле ионов кальция: активацией потенциалозависимых кальциевых каналов и угнетением Na-Са-обмена.

Проявление стимулирующего эффекта КХ в начале его действия в среде без Са²⁺ и стимуляция экстрюзии кофеином свидетельствуют об участии в экстрюзии депонированных в клетках запасов кальция. Этим ацинарные клетки отличаются от других секреторных клеток, у которых экстрюзия находится в абсолютной зависимости от внеклеточного кальция [12]. Хорошо выраженный в ацинарных клетках поджелудочной железы эндоплазматический ретикулум служит, по-видимому, основным источником депонированного кальция [8], поскольку кофеин, освобождая Са²⁺ из саркоплазматического ретикулума, способен стимулировать экстрюзию. Каким же способом взаимодействие холиномиметика с холинорецепторами могло бы осуществить освобождение Са²⁺ из депо? Известно, что способностью к освобождению кальция из ретикулума обладает цГМФ [23]. Кофеин способен угнетать фосфодиэстеразу [24], что приводит к увеличению содержания в клетке циклических нуклеотидов, в том числе и цГМФ, и, таким образом, стимулирует экстрюзию. Имеются сведения, что под влиянием холиномиметика повышается активность гуанилатциклазы [19], а это также увеличивает концентрацию цГМФ в цитозоле. Поэтому вполне возможно, что и холиномиметики стимулируют выход Са²⁺ из эндоплазматического ретикулума при участии цГМФ.

Как уже сообщалось нами [6], ингибитор кальмодулина ТФП уг-

нетает спонтанную и стимулирует о роли КМ в секреторном процессе, на какой стадии участвует КМ. Поскольку эффект Са-ионофора, модулируя экстрюзию, играет роль внутриклеточного Са²⁺, стимулирующего эффект одного ТФП в сочетании с ионофором X-537A кальмодулинподобной группой эффектов КМ связывают с тем, что комплекс Са²⁺-кальмодулин вызывает сборку — разделение филаментов [14], которые прикреплены к апикальной мембране.

SIGNIFICANCE OF CALCIUM IN THE SECRETION BY THE PANCREATIC ACINAR CELLS

M. Ya. Grinkiv, M. Yu. Klevets, I. L. Franko

It is stated that a decrease of the basal release but it considerably increases the stimulated release on the S-like curve. Caffeine gives a secretory effect, respectively. Mn^{2+} and Potassium membrane depolarization eliminated by verapamil. Trifluoromethyl carbachol and decreases basal secretion but slightly the enzyme secretion. The data obtained allow conclude that Ca^{2+} take part in secretion. It is realized by chemosensitive potential, that is induced by a decrease of Na-Ca exchange under these conditions.

I. Franko University, Ministry of Health and Secondary Special Education

1. Гокина Н. И., Гурковская А. В. Физиология тонического сокращения. — 1983. — 29, № 6. — С. 6.
2. Клевец М. Ю., Гриньков М. Я. Гормональная регуляция клеток. Изд-во Львов. ун-та. — 1985. — 100 с.
3. Костюк П. Г. Кальций и клетка. — Ташкент: Изд-во ком. н. — 1985. — 100 с.
4. Рожкова М. С. Поджелудочная железа. — Ташкент: Изд-во ком. н. — 1985. — 100 с.
5. Уголев А. М. Определение активности кальциевого аппарата у человека. — Ташкент: Изд-во ком. н. — 1985. — 100 с.
6. Шостаковская И. В., Клевец М. Ю. Экстрюзия амилазы изолированных ацинарных клеток. УкрНИИТИ 29 сент. 1986 г. — 100 с.
7. Baker P. F. Regulation of intracellular calcium. — 1976. — 35, N 14. — P. 2589—2595.
8. Barnard T., Robomans G. M. Calcium in basal cytoplasm of rat exocrine cells. — 1976. — N 1. — P. 70—71.
9. Chandler D. E. Control of pancreatic secretion. — 1978. — 23, N 1. — P. 1—10.
10. Dormer R. L., Poulsen J. H. Pancreatic acini: effect of secretagogues. — 1978. — P. G38—G45.
11. Dormer R. L. Direct demonstration of pancreatic enzyme secretion. — 1978. — P. G38—G45.
12. Douglas W. W. Stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar and other cells // Brit. J. Pharmacol. — 1978. — 53, N 2. — P. 385—395.

Физиол. журн. 1988, т. 34, № 4

нотает спонтанную и стимулированную экструдию амилазы, что свидетельствует о роли КМ в секреторном процессе. Оставался невыясненным вопрос, на какой стадии в последовательной цепи запуска экструдии участвует КМ. Поскольку ТФП значительно снижает стимулирующий эффект Са-ионофора, можно предполагать, что на каком-то этапе экструдии играет роль внутриклеточный КМ. В то же время, угнетающий экструдию эффект одного ТФП более выражен, чем при совместном действии его с ионофором X-537A, что может быть обусловлено наличием кальмодулинподобной группировки и в Са-каналах [3]. Большинство эффектов КМ связывают с активацией ферментативных процессов. Установлено, что комплекс Ca^{2+} с КМ активирует специфические киназы, вызывающие сборку — разборку микротрубочек и сокращение микрофиламентов [14], которые участвуют в перемещении секреторных гранул к апикальной мембране [2, 21].

SIGNIFICANCE OF CALCIUM IN RELEASE OF DIGESTIVE ENZYMES BY THE PANCREATIC ACINAR CELLS

M. Ya. Grinkiv, M. Yu. Klevets, I. V. Shostakovskaya

It is stated that a decrease of the extracellular Ca^{2+} concentration has no influence on the basal release but it considerably decreases carbachol-stimulated one. The dependence of the stimulated release on the concentration of extracellular calcium is described by the S-like curve. Caffeine gives a 3.4- and 2.7-fold increase of the protein and amylase secretion, respectively. Mn^{2+} and verapamil decrease the carbachol-stimulated release. Potassium membrane depolarization causes a 1.3-fold increase of amylase. Its action is eliminated by verapamil. Trifluoperazine (TFP) completely inhibits the stimulating effect of carbachol and decreases basal secretion. Against the background of TFP Ca-ionophore increases but slightly the enzyme release while X-537A itself twice increases the secretion. The data obtained allow concluding that both intracellular, deposited and extracellular Ca^{2+} take part in secretion. Its entrance into acinar cells during stimulation is realized by chemosensitive potential-dependent channels. Hyposodium solution increases the secretion, that is induced by a decrease of Ca^{2+} outflow from the cells by means of Na-Ca exchange under these conditions. Ca^{2+} action is realized through calmodulin.

I. Franko University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Lvov

1. Гокина Н. И., Гурковская А. В., Шуба М. Ф. Исследование механизмов активации фазного и тонического сокращения гладких мышц мозговых артерий // Физиол. журн.—1983.—29, № 6.—С. 684—690.
2. Клевев М. Ю., Гринькив М. Я. Влияние колхицина на экструдию амилазы // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса.—Львов: Изд-во Львов. ун-та.—1985.—С. 79—82.
3. Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость.—М.: Наука.—1986.—255 с.
4. Рожкова М. С. Поджелудочная железа при заболеваниях печени и желчных путей.—Ташкент: Изд-во ком. наук УзССР.—1937.—С. 50.
5. Уголев А. М. Определение амилазной активности // Исследования пищеварительного аппарата у человека.—Л.: Наука.—1969.—С. 187—192.
6. Шостаковская И. В., Клевев М. Ю., Гринькив М. Я. Влияние трифторперазина на экструдию амилазы изолированными ацинусами поджелудочной железы // Деп. в УкрНИИТИ 29 сент. 1986 г. № 2359 — Ук 86.
7. Baker P. F. Regulation of intracellular Ca and Mg in squid axons // Fed. Proc.—1976.—35, N 14.—P. 2589—2595.
8. Barnard T., Roomens G. M. X-ray microanalytical evidence for labile calcium pool in basal cytoplasm of rat exocrine tissues // J. Physiol. (Gr. Brit.)—1982.—329, N 1.—P. 70—71.
9. Chandler D. E. Control of pancreatic enzyme secretion: A critique of the role of calcium // Life Sci.—1978.—23, N 4.—P. 323—334.
10. Dormer R. L., Poulsen J. H., Licko V., Williams J. A. Calcium fluxes in isolated pancreatic acini: effect of secretagogues // Amer. J. Physiol.—1981.—240, N 1.—P. G38—G45.
11. Dormer R. L. Direct demonstration of increase in cytosolic free Ca^{2+} during stimulation of pancreatic enzyme secretion // Biosci. Repts.—1983.—3, N 3.—P. 233—240.
12. Douglas W. W. Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffin and other cells // Brit. J. Pharmacol.—1968.—34, N 4.—P. 451—474.