

Дослідження впливу катіонів перехідних металів на екструзію пепсиногену диспергованими залозами шлунка

Установлено, что катионы переходных металлов (Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+}) вызывают существенное нарушение экструзии пепсиногена изолированными железами желудка морских свинок. В низких концентрациях (10^{-5} — 10^{-4} моль/л) они уменьшают спонтанную и стимулированную экструзию пепсиногена, угнетая вход Ca^{2+} в секреторные клетки. При высоких концентрациях (10^{-3} — 10^{-2} моль/л) катионы металлов в зависимости от их вида стимулируют (Mn^{2+} , Co^{2+}) или угнетают (La^{3+} , Cd^{2+}) экструзию пепсиногена. Это их влияние не связано с нарушением транспорта кальция в клетки.

Вступ

Серед хімічних факторів при забрудненні оточуючого середовища одне з перших місць займають солі перехідних металів (d-елементів), які характеризуються широким спектром патогенного впливу на організм людини та тварин. Встановлено, що, взаємодіючи з різними функціональними групами макромолекул (карбоксильними, фосфатними, сульфгідрильними, амінними тощо), вони істотно впливають на активність деяких ферментів [6, 7, 10] і стан клітинних мембран [12, 18]. Завдяки здатності до комплексоутворення, ряд катіонів d-елементів виступають антагоністами кальцію в клітині, блокують кальцієві канали плазматичних мембран [4, 8], взаємодіють з кальційзв'язуючими білками, в тому числі з регуляторними, зокрема з кальмодуліном [9, 15]. Проте в більшості випадків ці багатфакторні зміни під впливом катіонів металів відбиваються на функціональній активності різних видів клітин. Особливий інтерес становлять секреторні клітини, в регуляції яких центральне місце займають іони Ca^{2+} [1, 3, 13, 18]. У нашій роботі приведені результати досліджень впливу катіонів перехідних металів на екструзію пепсиногену диспергованими залозами шлунка.

Методика

Дослідження провадили на диспергованих шлункових залозах морських свинок. Видалення залоз та оцінку їх життєздатності здійснювали як описано раніше [2, 3]. Отримані залози диспергували в базовому середовищі інкубації, яке містило (ммоль/л): NaCl — 132,4; KCl — 5,9; Na_2HPO_4 — 5,0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 1,0; $MgSO_4$ — 1,2; $CaCl_2$ — 1,0; триоксиметиламінометан (*trp*) — 5; альбумін — 2 мг/мл; глюкоза — 2 мг/мл; pH 7,5. При інкубації залоз із катіонами перехідних металів фосфати та сульфати в середовищі заміняли на еквімолярну кількість NaCl і $MgCl_2$, а концентрацію *trp* збільшували до 10 ммоль/л. Вивчення екструзії пепсиногену здійснювали протягом 30 хв при 37 °C за умов легкого струшування та

аерації. Інтенсивність екструзії пепсиногену оцінювали за приростом протеолітичної активності середовища за 30 хв інкубації, який виражали у відсотках від сумарної протеолітичної активності тритонового лізату суспензії залоз шлунка. Інтенсивність виділення лактатдегідрогенази диспергованими залозами оцінювали аналогічно. Протеолітичну активність визначали як описано раніше [3], активність лактатдегідрогенази визначали спектрофотометрично [17], загальний білок гомогенату слизової оболонки — за методом Лоурі [14]. Результати обробляли статистично.

Результати та їх обговорення

Для оцінки можливого впливу досліджуваних катіонів металів на активність пепсину, що могло б вносити похибку в розрахунок інтенсивності екструзії, гомогенат слизової оболонки шлунка, який містив пепсиноген, інкубували з цими катіонами за таких же умов, в яких проходила інкубація диспергованих залоз. У цих дослідях встановлено, що 30-хвилинна інкубація гомогенатів слизової оболонки з катіонами перехідних металів, зокрема з Mn^{2+} і La^{3+} , істотно не впливала на протеолітичну активність у діапазоні концентрацій іонів 10^{-5} — 10^{-2} моль/л (табл. 1). Часткове зниження протеолітичної активності гомогенатів (до 10 %) спостерігалось лише при високих концентраціях в середовищі інкубації La^{3+} (10^{-2} моль/л). Отримані результати свідчать про мінімальні зміни протеолітичної активності слизової оболонки шлунка під впливом досліджуваних катіонів металів. Це стало підставою для використання змін протеолітичної активності середовища інкубації диспергованих залоз у розрахунок інтенсивності екструзії пепсиногену в наступних дослідженнях.

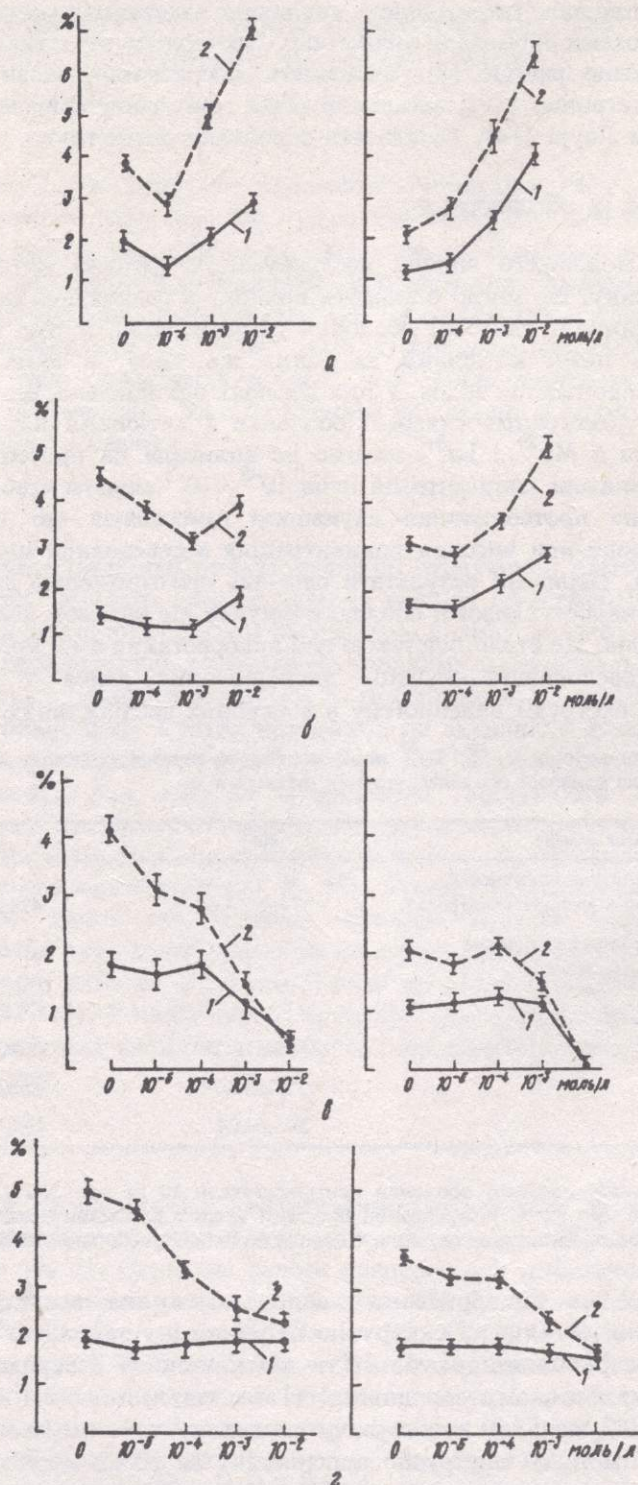
Таблиця 1. Вплив катіонів Mn^{2+} і La^{3+} на протеолітичну активність (нмоль тирозину/хв мг білка) гомогенатів слизової оболонки шлунка ($M \pm m$, $n = 4$).

Умова досліджу	Mn^{2+}	La^{2+}
Інкубація гомогенату у відсутності катіонів перехідних металів (контроль)	474,8 $\pm$ 14,6	474,8 $\pm$ 14,6
Інкубація гомогенату з катіонами перехідних металів, моль/л		
10^{-5}	...	471,9 $\pm$ 13,9*
10^{-4}	489,4 $\pm$ 20,2*	506,9 $\pm$ 7,4*
10^{-3}	477,7 $\pm$ 11,7*	483,5 $\pm$ 5,8*
10^{-2}	503,8 $\pm$ 5,6	434,0 $\pm$ 5,6**

Примітка. Гомогенат слизової оболонки центрифугували 10 хв при 150 g, центрифугат інкубували 30 хв при 37 °C у середовищі інкубації залоз з катіонами металів, після чого визначали його протеолітичну активність. * $P > 0,05$, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем.

У дослідках на диспергованих залозах шлунка встановлено, що вплив катіонів металів на екструзію пепсиногену залежить від їх концентрації в середовищі інкубації та від наявності в середовищі іонів Са. Так, у кальцієвому середовищі (1 ммоль/л) іони Mn малої концентрації (10^{-4} моль/л) зменшували спонтанну та стимульовану карбохоліном (10^{-4} моль/л) екструзію пепсиногену за 30 хв інкубації на 20—30 %. При високих концентраціях (10^{-3} — 10^{-2} моль/л) ці катіони викликали протилежний ефект, збільшуючи виділення пепсиногену диспергованими залозами за такий же проміжок часу на 50—90 %. У безкальцієвому

середовищі інкубації ефект малих концентрацій Mn^{2+} на екструзію пепсиногену був відсутній. Разом з тим ефект високих концентрацій цих катіонів не тільки зберігався, але був більш вираженим (рисунк,а). Подібні, але



Відносна активність (% від сумарної) спонтанної (1) та стимульованої карбохоліном (2) екструзії пепсиногену диспергованими залозами шлунка в середовищі, яке містило кальцій (I) і безкальцієвому середовищі (II): а — за умов впливу Mn^{2+} , б — Co^{2+} , в — La^{3+} , г — Cd^{2+} .

менш виражені зміни екструзії пепсиногену спостерігалися після внесення Co^{2+} в кальцієве і безкальцієве середовище інкубації залоз (див. рисунок, б). Слід зазначити, що катіони Mn^{2+} у діапазоні концентрацій (10^{-4} — 10^{-2} моль/л) істотно не впливали на виділення лактатдегідрогенази диспергованими залозами шлунка (табл. 2). Це свідчить, що стимуляція екструзії пепсиногену високими концентраціями досліджуваних катіонів металів не пов'язана з порушенням цілісності плазматичних мембран секреторних клітин шлункових залоз.

Таблиця 2. Вплив катіонів Mn^{2+} на виділення лактатдегідрогенази (%) диспергованими залозами шлунка ($M \pm m$, $n = 4$).

Умова досліджу	Виділення лактатдегідрогенази за 30 хв інкубації
Інкубація залоз у відсутності катіонів Mn^{2+} (контроль)	1,31 $\pm$ 0,13
Інкубація залоз з катіонами Mn^{2+} , моль/л.	
10^{-4}	1,24 $\pm$ 0,11*
10^{-3}	1,25 $\pm$ 0,16*
10^{-2}	1,23 $\pm$ 0,06*

* $P > 0,05$ порівняно з контролем.

Інший характер мали зміни екструзії пепсиногену диспергованими залозами під впливом La^{3+} і Cd^{2+} . У кальцієвому середовищі іони La у незначній концентрації (10^{-4} моль/л) пригнічували стимульовану карбохоліном (10^{-4} моль/л) екструзію пепсиногену за 30 хв інкубації залоз на 30 %. Спонтанна екструзія проферменту за цих умов істотно не змінювалася. Збільшення концентрації La^{3+} у середовищі інкубації залоз до 10^{-2} моль/л пригнічувало спонтанну та стимульовану карбохоліном екструзію ферменту за 30 хв інкубації на 70—90 %. У безкальцієвому середовищі інкубації залоз, як і в дослідках з Mn^{2+} і Co^{2+} , зберігався лише ефект високих концентрацій La^{3+} . Вплив незначних концентрацій La^{3+} на екструзію пепсиногену за цих умов був несуттєвим (див. рисунок, в). Cd^{2+} викликали подібні зміни стимульованої карбохоліном екструзії пепсиногену в кальцієвому та безкальцієвому середовищах. Разом із тим вплив Cd^{2+} на спонтанну екструзію пепсиногену був мало вираженим (див. рисунок, г).

Пригнічення екструзії пепсиногену малими концентраціями катіонів металів (10^{-5} — 10^{-4} моль/л) у кальцієвому середовищі та відсутність такого ефекту в безкальцієвому середовищі свідчить про його залежність від пулу зовнішньоклітинного кальцію. Попередніми нашими дослідженнями [3] доказана безпосередня участь зовнішньоклітинного кальцію в активації екструзії пепсиногену головними клітинами шлунка. Відомо [4], що катіони перехідних металів належать до конкурентних блокаторів кальцієвих каналів. Це дозволяє зробити висновок, що пригнічення екструзії пепсиногену незначними концентраціями катіонів металів (10^{-5} — 10^{-4} моль/л) зумовлене блокадою кальцієвих каналів плазматичних мембран секреторних клітин. Зміни екструзії ферменту після внесення в середовище інкубації залоз катіонів металів при більш значних концентраціях (10^{-3} — 10^{-2} моль/л) спостерігалися в кальцієвому і безкальцієвому середовищах. Це свідчить про їх незалежність від зовнішньоклітинного пулу кальцію. Разом з тим направленість цих змін

при збільшених концентраціях катіонів металів залежить від виду катіона. Іони більш легких металів (Mn^{2+} , Co^{2+}) викликали дозозалежне збільшення спонтанної та стимульованої екструзії пепсиногену. Подібний ефект був отриманий при дослідженні впливу катіонів Mn^{2+} на екструзію амілази привушними залозами [16]. Катіони La^{3+} і Cd^{2+} підвищеної концентрації, навпаки, пригнічували екструзію пепсиногену. Механізми таких змін під впливом різних видів катіонів перехідних металів залишаються нез'ясованими. Взаємодіючи з кальмодуліном [9, 15] та іншими кальційзалежними регуляторами екзцитозу, вони можуть його безпосередньо ініціювати або пригнічувати. Вплив цих катіонів, певною мірою, може опосередковуватись їх здатністю пригнічувати роботу систем підтримання кальцієвого гомеостазу в клітині, зокрема, систем Mg^{2+} , АТФ-залежного транспорту Ca^{2+} [2], вихід кальцію з кальцієвих депо, як це показано на везикулах саркоплазматичного ретикулуму м'язів [10], а також транспорт кальцію в мітохондрії [11].

Таким чином, катіони перехідних металів викликають істотні порушення екструзії ферментів секреторними клітинами шлункових залоз. Характер цих порушень залежить від виду катіонів металів та їх концентрації. Найбільш чутливою ланкою їх дії на екструзію є транспорт катіонів кальцію в клітину. Вже при незначних концентраціях (10^{-5} — 10^{-4} моль/л) вони пригнічують вхід кальцію в клітину і завдяки цьому зменшують реактивність залоз до стимуляторів секреції. За умов значної концентрації (10^{-3} — 10^{-2} моль/л) катіони перехідних металів залежно від їх виду стимулюють (Mn^{2+} , Co^{2+}) або пригнічують (La^{3+} , Cd^{2+}) екструзію пепсиногену. Цей їх вплив не пов'язаний з порушенням транспорту кальцію в клітину.

L.O.Dubitsky

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TRANSIENT METAL CATIONS ON PEPSINOGEN EXTRUSION BY DYSPERSED GASTRIC GLANDS

It has been found that transient metal cations (Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+}) cause substantial disturbance of pepsinogen extrusion by isolated gastric glands of guinea pigs. In low concentrations (10^{-5} — 10^{-4} mol/l) they are found to decrease spontaneous and stimulated pepsinogen extrusion by inhibition of Ca^{2+} influx into the secretory cells. In high concentrations (10^{-3} — 10^{-2} mol/l) metal cations are able either to stimulate (Mn^{2+} , Co^{2+}) or to inhibit (La^{3+} , Cd^{2+}) pepsinogen extrusion depending on their type. Their effect is not connected with the disturbance of calcium transport into the cells.

I.Franko Lviv University,
Ministry of Education of Ukraine, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гриньків М.Я. Роль кальція в механізмі екструзії пищеварительных ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Львов, 1989. — 16 с.
2. Дубицький Л.А. Исследование экструзии пепсиногена диспергованными железами желудка морских свинок // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторных процессов: Вестн. Львовского ун-та. Серия биол. — Львов. — 1989. — С. 18—23.
3. Дубицький Л.О., Шостаковська І.В. Дослідження ролі зовнішньо- і внутрішньоклітинного кальцію в екструзії пепсиногену ізольованими залозами шлунка // Фізіол. журн. — 1992. — 38, № 1. — С. 46—51.
4. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. — М.: Наука, 1986. — 256 с.
5. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. — К.: Наук. думка, 1990. — 216 с.
6. Левина Э.Н. Общая токсикология металлов. — Л.: Медицина, 1972. — 183 с.
7. Левина Э.Н. Значение накопления металлов в клетке // Актуальные проблемы гигиенической токсикологии. — М.: Медицина, 1980. — С. 53—66.

8. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. — К.: Наук. думка, 1981. — 280 с.
9. Орлов С.П., Лабас Ю.А. Концентрация свободного кальция в цитоплазме: Методы регистрации, достижения и артефакты // Биол. мембраны. — 1989. — 6, № 9. — С. 901—938.
10. Рибальченко В.К., Курский М.Д. Молекулярная организация и ферментативная активность биологических мембран. — К.: Наук. думка, 1977. — 212 с.
11. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. — М.: Наука, 1972. — 189 с.
12. Уильямс Р.Д. Связывание ионов металлов с мембранами и его последствия // Биол. мембраны. — М.: Атомиздат, 1978. — С. 118—136.
13. Dormer R., Rown G., Doughney C. Intracellular Ca in pancreatic acinar cells: regulation and role in stimulation of enzyme secretion // Biosci. Repts. — 1987. — 7, № 4. — P. 333—344.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.Z., Rondoll R.Y. Protein measurement with the folin phenol reagent // J.Biol.Chem. — 1951. — 27, № 1. — P. 265—275.
15. Mork A., Geisler A. Calmodulin-dependent adenylate cyclase activity in rat cerebral cortex: Effects of divalent cations, forskolin and isoprenaline // Arch. int. physiol. et biochim. — 1989. — 97, № 3. — С. 259—271.
16. Petersen O.H., Ueda N., Hall R.A., Gray T.A. The role of calcium in parotid amylase secretion evoked by excitation of cholinergic, α - and β -adrenergic receptors // Pflugers Arch. — 1977. — 372, № 3. — P. 231—237.
17. Schwert G., Winer A. Lactate Dehydrogenase // The Enzymes: Acad. Press. — 1963. — 7, № 4. — P. 127—139.
18. Venugopal B., Luckey T.D. Metal toxicity in mammals. — New York: Plenum press, 1978. — 2. — 409 p.
19. Willams J., Burnhem D. Calcium and stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells // Calcium Biol. Sust. Proc.: 67 th Annu Mech. Fed. Amer. Soc. Environ. Biol. — Chicago, Ill, (10—15 Apr., 1983.) — New York, London, 1985. — P. 83—91.

Львів. ун-т ім. І.Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 18.10.94