

О.В. Копач, І.А.Кругликов, П.Г.Костюк, Н.В. Войтенко, Н.В. Федірко

Властивості інозитолтрифосфатчутливого депо Ca^{2+} в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів

В ацинарних клітках підчелюстной слинної железы активация холинорецепторов приводит к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР), что опосредуется в основном инозитол (1, 4, 5)-трифосфатчувствительными рецепторами (InsP_3R). В данной работе мы использовали металлохромный краситель арсеназо III для измерения в клетках общего содержания кальция и низкоаффинный флуоресцентный краситель tag-fura-2/AM – концентрации Ca^{2+} в ЭР ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ЭР}}$). Показано, что приложение InsP_3 к пермебилизированным ацинарным клеткам вызывало дозозависимое транзентное уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ЭР}}$ ($\text{EC}_{50} = 1,3$ мкмоль/л $\pm 0,21$ мкмоль/л). Установлено также, что InsP_3 -индуцированное высвобождение Ca^{2+} из ЭР ацинарных клеток потенцируется Ca^{2+} при физиологических его концентрациях (100–400 нмоль/л), модулируется кофеином и АТФ. В частности, АТФ в низких концентрациях (<1 ммоль/л) потенцирует InsP_3 -индуцированное уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ЭР}}$, а в высоких – существенно подавляет. В то же время кофеин (2 ммоль/л) угнетает InsP_3 -чувствительное высвобождение Ca^{2+} в кальцийсодержащем растворе и не вызывает изменений в бескальциевой среде. Ингибирующий эффект кофеина полностью нивелируется высокими концентрациями InsP_3 (20 мкмоль/л) или АТФ (1 ммоль/л), что свидетельствует о способности кофеина функционально конкурировать за связывание с доменами InsP_3R . Мы предполагаем, что АТФ-зависимая регуляция InsP_3 -индуцированного высвобождения Ca^{2+} может играть важную физиологическую роль в осциляциях внутриклеточного Ca^{2+} , а также в поддержании выживания ацинарных клеток в периоды дефицита энергии.

ВСТУП

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) регулює перебіг численних внутрішньоклітинних процесів, включаючи транскрипцію генів [14], синтез білків та екзоцитоз [5, 6]. В ацинарних клітинах основний внесок в амплітуду викликаних стимуляцією $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзентів відіграє вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного кальцієвого депо через інозитол (1,4,5)-трифосфатчутливий рецептор (InsP_3R) [5, 7]. Активація секреції рідинного компонента слини опосередковується в основному підвищенням внутрішньоклітинної концентрації InsP_3 внаслідок активації мускаринових (М3) чи β_1 -адренорецепторів

плазматичної мембрани (ПМ) ацинарних клітин слинних залоз [5, 29].

Нині існує багато відомостей про молекулярну природу InsP_3R , зокрема ідентифіковано три його ізоформи: $\text{InsP}_3\text{R}1$, $\text{InsP}_3\text{R}2$, $\text{InsP}_3\text{R}3$ [19]. Показано, що білкова молекула рецептора – це тетрамер, кожен мономер якого експресує ділянку зв'язування InsP_3 (у межах N-терміналі) та порутворювальну ділянку в межах C-терміналі. Між ділянкою зв'язування InsP_3 та порою розташований “регуляторний домен”, який, очевидно, забезпечує інтарегуляцію роботи рецептора внутрішніми факторами [33]. Припускають, що найбільш імовірними регуляторними факторами є

© О.В. Копач, І.А.Кругликов, П.Г.Костюк, Н.В. Войтенко, Н.В. Федірко

InsP₃ та Ca²⁺ [10]. З використанням специфічних антитіл виявлено, що в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози експресуються всі три ізоформи InsP₃R, локалізовані в люменальній і латеральній зонах мембрани ендоплазматичного ретикулула (ЕР) безпосередньо під ПМ [25].

Для ацинарних клітин підщелепної слинної залози показано функціонування тапсигаргінчутливого та нечутливого депо кальцію, які є InsP₃-залежними [2], та регуляцію InsP₃R за допомогою цАМФ-кінази [12]. Однак не до кінця з'ясованими залишаються властивості та фізіологічні механізми регулювання InsP₃R у клітинах цього типу, що і зумовило мету роботи.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на ізольованих ацинарних клітинах підщелепної слинної залози самців щурів лінії Вістар віком 1–1,5 міс. Клітини ізолювали із тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині, який містив колагеназу (тип I, 320 мод./мг) за методикою, описаною раніше [37]. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10, глюкоза – 10; рН 7,4.

Пермеабілізацію ацинарних клітин проводили за описаною методикою [1]. Для цього використовували неіонний детергент β-есцин (40 мкг/мл), оскільки він забезпечує проникнення ПМ з одночасним збереженням функціональної активності мембранно-зв'язаних білків і внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [4]. Детергент вносили до розчину, за складом наближеного до внутрішньоклітинного (НДВ), який містив (ммоль/л): KCl – 120, NaCl – 20, MgSO₄ – 2, HEPES – 10, АТФ – 3, EGTA – 1, CaCl₂ – 0,75; рН 7,2. Концентрація вільного іонізованого кальцію, розрахована за допомогою програми “WinMAXC v2.10”, (Chris Patton, Stanford University), у базовому розчині НДВ становила близько 250

нмоль/л. У робочих розчинах НДВ (до яких додавали агоністи без АТФ) іони кальцію зв'язували за допомогою EGTA відповідно до того, як зазначено у тексті.

Ацинарні клітини фарбували у зовнішньоклітинному розчині Тіроде з використанням мембранно-проникної форми барвника mag-fura (mag-fura-2/AM, 6 мкмоль/л) за наявності детергента pluronic F-127 (0,02 %) протягом 45 хв при 37°C. Такі умови забезпечують компартменталізацію барвника у внутрішньоклітинних органелах [21]. Після цього клітини промивали, інкубували у зовнішньоклітинному розчині до повної деацетилювання барвника та переносили на покривні скельця. Візуалізацію внутрішньоретикулярної концентрації кальцію ([Ca²⁺]_{ЕР}) здійснювали згідно з описаним методом [1].

Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакету Microsoft Excel. Аналіз змін співвідношення інтенсивності флуоресценції (F) з довжиною хвилі 360 нм / 390 нм проводили за допомогою програми Microcal Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміни сумарного вмісту кальцію у пермеабілізованих клітинах при активації InsP₃R. Ацетилхолін (АХ) є основним медіатором у регуляції внутрішньоклітинних сигнальних процесів і секреції клітинами підщелепної слинної залози. Нами раніше показано [2] підвищення [Ca²⁺]_i в інтактних ацинарних клітинах підщелепної слинної залози внаслідок активації АХ мускаринових рецепторів ПМ, яке відбувається через вивільнення Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо (як з депо, чутливого до дії блокатора Ca²⁺-АТФази ЕР тапсигаргину, так і з тапсигаргіннечутливого). Обидва виявленні нами типи внутрішньоклітинних депо кальцію є, очевидно, InsP₃-чутливими. З метою перевірити це припущення та вивчити особливості вивільнення кальцію з InsP₃-

чутливого депо в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози ми досліджували зміни сумарного вмісту кальцію та реєстрували $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$. Експерименти проводили на пермеабілізованих β -есцином ацинарних клітинах, які є адекватною моделлю для дослідження процесів кальцієвої сигналізації всередині EP [4].

У першу чергу ми встановили, що внаслідок 10-хвилинного інкубування пермеабілізованих ацинарних клітин у кальційвмісному розчині НДВ ($[\text{Ca}^{2+}]_i \approx 100$ нмоль/л) з АХ (5 мкмоль/л) відбувається достовірне зменшення в них сумарного вмісту кальцію в середньому на $47\% \pm 7\%$ ($P < 0,001$, $n=10$) порівняно з контролем (рис. 1,а). Інкубування ацинарних клітин з АХ за наявності у середовищі селективного інгібітора InsP_3 -чутливого вивільнення Ca^{2+} гепарину (300 мкг/мл) не призводило до достовірних змін у них сумарного вмісту кальцію ($n=9$). На основі цього ми припустили, що викликане АХ зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ опосередковується активацією тільки InsP_3R . Враховуючи, що сумарний вміст кальцію є комплексним показником, який відображає зміни іонізованого, мембранозв'язаного та зв'язаного з білками кальцію, для коректної інтерпретації одержаних результатів ми провели пряму реєстрацію

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ з використанням низькоафінного Ca^{2+} -чутливого барвника mag-fura-2/AM.

Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ в ацинарних клітинах при активації InsP_3R . Для перевірки припущення, що АХ викликає вивільнення кальцію тільки з InsP_3 -чутливого депо, ми реєстрували зміни $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ у пермеабілізованих ацинарних клітинах підщелепної слинної залози при активації InsP_3R : 1) стимуляцією мускаринових рецепторів ПМ за допомогою АХ, оскільки пермеабілізація β -есцином не призводить до порушення фосфоліпаза С – InsP_3 -сигнального шляху [21], 2) прямою активацією InsP_3R за допомогою екзогенного InsP_3 .

Після пермеабілізації ПМ і вимивання цитозольної частки барвника відношення інтенсивності флуоресценції mag-fura-2/AM 360 нм / 390 нм (відношення F_{360}/F_{390}) становило в середньому $0,65 \pm 0,02$ ($n=23$), що близьке до визначеного для зафарбованих mag-fura 2/AM пермеабілізованих панкреатитів [26], слинних залоз комах [38] і лінійних епітеліальних клітин слинних залоз людини [36]. Аплікація до пермеабілізованих ацинарних клітин АХ (5 мкмоль/л, 1 хв) у розчині НДВ супроводжувалася зменшенням співвідношення F_{360}/F_{390} в середньому на $0,1 \pm 0,02$ ($n=23$, $P < 0,001$; див. рис. 1,б). Розрахований нами час

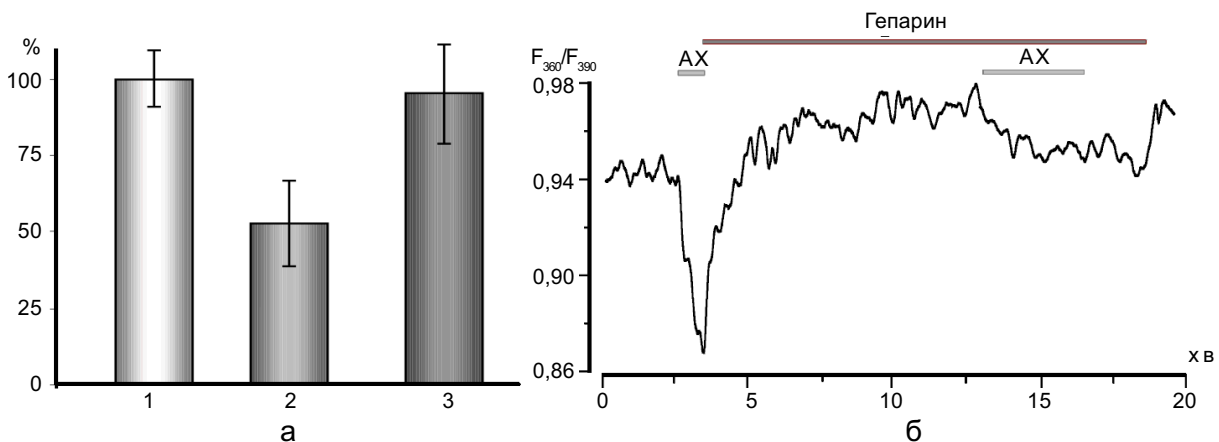


Рис. 1. Зміни сумарного вмісту кальцію (а) та оригінальний запис зміни концентрації Ca^{2+} всередині ендоплазматичного ретикулума (б) у пермеабілізованих ацинарних клітинах підщелепної слинної залози внаслідок інкубування клітин з ацетилхоліном (АХ) та ацетилхоліном з гепарином: 1 – контроль, 2 – інкубування з ацетилхоліном, 3 – інкубування з ацетилхоліном і гепарином

напівспаду АХ-індукованої $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповіді був $28 \text{ с} \pm 2 \text{ с}$ ($n=23$). АХ-індуковане зниження відношення F_{360}/F_{390} , що відображає зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$, характеризувалося швидким відновленням $[Ca^{2+}]_{EP}$ до вихідного рівня після відмивання АХ базовим розчином НДВ. Одержане нами зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$ у відповідь на дію АХ кількісно є близьким до виявленого Ломаксом і співавт. [26] на пермеабілізованих ацинарних клітинах підшлункової залози. Водночас аплікація АХ на фоні гепарину (300 мкг/мл) не викликала достовірних змін відношення F_{360}/F_{390} ($n=3$; див. рис. 1,б).

Для підтвердження того, що АХ-індуковане зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$, викликане активацією фосфоліпази С, ми провели короткочасну (15 с) аплікацію до пермеабілізованих ацинарних клітин екзогенного $InsP_3$. З'ясувалося, що ця аплікація також супроводжувалася зменшенням співвідношення

F_{360}/F_{390} , амплітуда якого залежала від концентрації агоніста (рис. 2,а). Зокрема, $InsP_3$ у концентраціях 1, 3 і 5 мкмоль/л викликав зменшення співвідношення F_{360}/F_{390} в середньому на $0,027 \pm 0,005$ ($n=14$), $0,034 \pm 0,006$ ($n=21$) та $0,068 \pm 0,017$ ($n=8$) відповідно. Ефект $InsP_3$ був більш швидким, порівняно з ефектом АХ, і зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$ проявлялося вже протягом 30–40 с після аплікації агоніста. Час напівспаду $[Ca^{2+}]_{EP}$ -сигналу, викликаного дією $InsP_3$ у зазначених концентраціях, становив 21 ± 4 ($n=10$), 28 ± 4 ($n=19$) та $36 \text{ с} \pm 7 \text{ с}$ ($n=9$) відповідно. Ефективна концентрація $InsP_3$, здатна викликати півмаксимальну відповідь (EC_{50}), була $1,3 \text{ мкмоль/л} \pm 0,21 \text{ мкмоль/л}$ (див. рис. 2,б). Крім того, ми показали, що аплікація $InsP_3$ на фоні гепарину (300 мкг/мл) не супроводжувалася достовірними змінами $[Ca^{2+}]_{EP}$ ($n=3$; див. рис. 2,в).

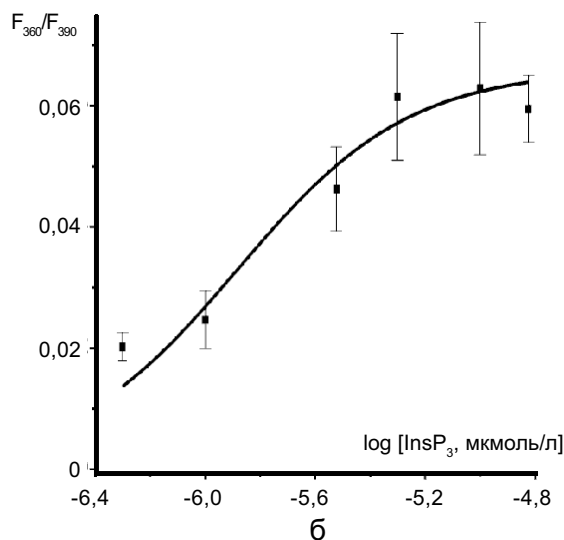
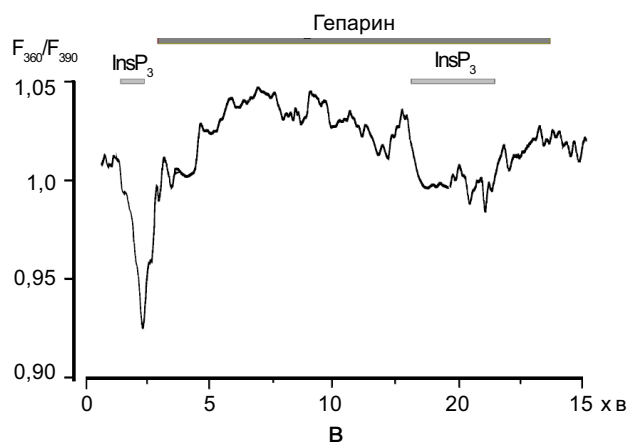
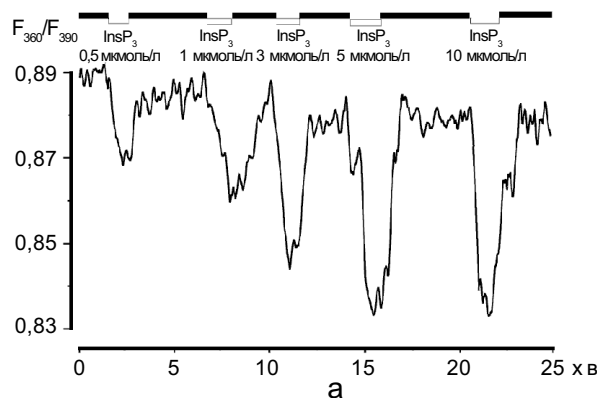


Рис. 2. Зміни концентрації Ca^{2+} всередині ендоплазматичного ретикулула ($[Ca^{2+}]_{EP}$), викликані прикладанням до пермеабілізованих клітин різних концентрацій інозиталтрифосфату ($InsP_3$) (а), $InsP_3$ на фоні гепарину (б), та апроксимація залежності амплітуди $InsP_3$ -індукованого зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$ від концентрації $InsP_3$ функцією Больцмана (в). Біла лінія – аплікація агоністів у внутрішньоклітинному розчині без АТФ, чорна лінія – клітини відмивали цим розчином з АТФ

Отже, при парасимпатичній стимуляції ацинарних клітин зв'язування АХ з мускариновими рецепторами ПМ призводить до активації вивільнення Ca^{2+} з ЕР, яке опосередковане виключно InsP_3R . На користь цього свідчить відсутність АХ- чи InsP_3 -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді за наявності гепарину, а також виявлене нами раніше практично повне блокування гепарином АХ-індукованого $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзєнта [16]. На нашу думку, InsP_3 -залежне вивільнення Ca^{2+} з ЕР є основним механізмом запуску секреції рідинного компонента слини, оскільки, як нами було показано в експериментах *in vivo*, блокування цих рецепторів атропіном повністю усуває стимулювальний ефект холіноміметиків на швидкість слиновиділення та підвищення концентрації Ca^{2+} у слині [3].

Регуляція InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ іонізованим кальцієм. Характерною особливістю InsP_3R є залежність його функціонування від концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} [10], тому ми вивчали залежність InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ у пермеабілізованих ацинарних клітинах від концентрації Ca^{2+} у розчині НДВ. Концентрацію вільного іонізованого кальцію у розчині НДВ фіксували на рівні

30, 100, 400 і 2000 нмоль/л за допомогою $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ -буфера.

Нами встановлено, що крива залежності амплітуди InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ від $[\text{Ca}^{2+}]_i$ має дзвоноподібний вигляд, сягаючи максимального значення при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 400 нмоль/л у разі дії всіх досліджуваних нами концентрацій InsP_3 (рис. 3). Зокрема, аплікація до пермеабілізованих ацинарних клітин 1, 3 та 5 мкмоль/л InsP_3 супроводжувалася зменшенням співвідношення F_{360}/F_{390} в середньому на $0,036 \pm 0,005$ ($n=12$), $0,043 \pm 0,006$ ($n=11$) та $0,064 \pm 0,013$ ($n=6$) відповідно, а розрахований нами час напівспаду $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді становив 26 ± 3 ($n=10$), 31 ± 5 ($n=9$) та $35 \text{ с} \pm 4 \text{ с}$ ($n=5$) відповідно. Причому амплітуда та час напівспаду InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 100 нмоль/л (тобто при такій, що була визначена за фізіологічних умов в ацинарних клітинах [16, 34]) достовірно не відрізнялася від викликаних InsP_3 при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 400 нмоль/л. Проте при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 30 нмоль/л InsP_3 спричиняв зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ з амплітудою достовірно меншою, ніж при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 400 нмоль/л, зокрема, на 47 ± 6 ($n=10$, $P<0,01$), 42 ± 5 та $54 \% \pm 11 \%$ ($n=6$, $P<0,05$) при дії 1, 3 і 5 мкмоль/л InsP_3 відповідно. Крім

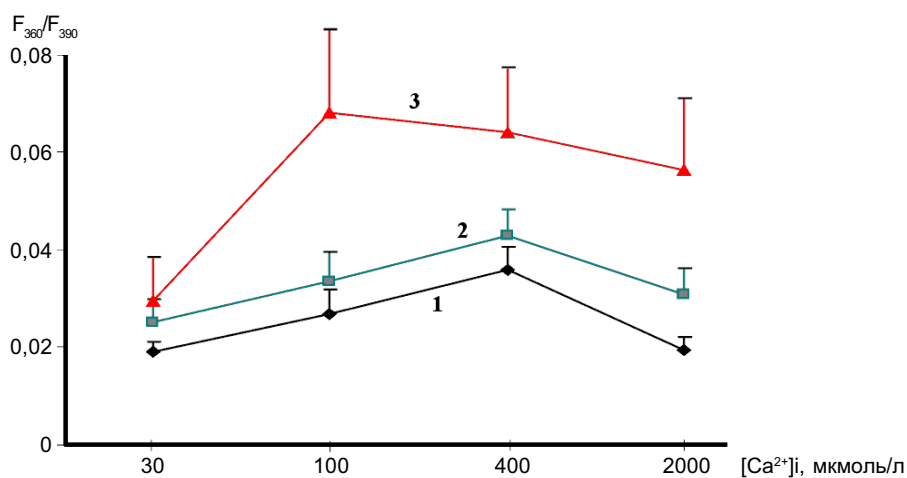


Рис. 3. Залежність амплітуди інозитолтрифосфат (InsP_3)-індукованого зменшення концентрації Ca^{2+} всередині ендоплазматичного ретикулума ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$) від концентрації Ca^{2+} у внутрішньоклітинному розчині: 1 – 1 мкмоль/л InsP_3 , 2 – 3 мкмоль/л InsP_3 , 3 – 5 мкмоль/л InsP_3

того, за цих умов нами було виявлено зменшення часу напівспаду $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповіді, викликаної $InsP_3$ у зазначених концентраціях на 12 ± 1 , $47\% \pm 7\%$ ($n=7$, $P<0,05$) та $52\% \pm 9\%$ ($n=5$, $P<0,01$) відповідно.

З іншого боку, підвищення $[Ca^{2+}]_i$ до 2000 нмоль/л також супроводжувалося зменшенням амплітуди $InsP_3$ -індукованого вивільнення Ca^{2+} порівняно з його ефектом при $[Ca^{2+}]_i$ 400 нмоль/л, однак таке зменшення було менше вираженим, ніж при $[Ca^{2+}]_i$ 30 нмоль/л. Зокрема, при $[Ca^{2+}]_i$ 2000 нмоль/л аплікація 1 мкмоль/л $InsP_3$ призводила до зменшення амплітуди $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповіді на $46\% \pm 6\%$ ($n=10$, $P<0,01$) порівняно з ефектом такої ж концентрації агоніста при $[Ca^{2+}]_i$ 400 нмоль/л. Водночас за умов прикладання 3 і 5 мкмоль/л $InsP_3$ при $[Ca^{2+}]_i$ 2000 нмоль/л виникала $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповідь, амплітуда та час напівспаду якої достовірно не відрізнялися від таких при $[Ca^{2+}]_i$ 400 нмоль/л. Таким чином, при наявності субмаксимальної концентрації $InsP_3$ підвищення Ca^{2+} у цитозолі до 100–400 нмоль/л супроводжується потенціацією ефекту $InsP_3$, що може пояснюватися зростанням імовірності перебування каналів у відкритому стані, тоді як подальше підвищення $[Ca^{2+}]_i$ зменшує цю імовірність та інгібує $InsP_3$ -чутливе вивільнення кальцію [22, 24].

Слід зазначити, що раніше в ацинарних клітинах слинних залоз було виявлено модуляцію активності $InsP_3R$ іонізованим кальцієм, розташованим всередині цистерн EP, і показано взаємозв'язок $[Ca^{2+}]_{EP}$, активності $InsP_3R$ і просторово-часових характеристик $[Ca^{2+}]_i$ -осциляцій [29]. На основі цих даних ми припустили, що регулювання функцій $InsP_3R$ і показників його активації/інактивації здійснюється за допомогою зв'язування Ca^{2+} з регуляторним доменом молекули рецептора, орієнтованим всередину EP [29]. Нами ж показано наявність чіткої залежності між викликаним $InsP_3$ зменшенням $[Ca^{2+}]_{EP}$ і концентрацією

Ca^{2+} в омиваючому EP розчині – з одного боку, та модулюючого ефекту субмаксимальних концентрацій $InsP_3$ на цей процес – з іншого. Зокрема, при низьких $[Ca^{2+}]_i$ у цитоплазмі (30 нмоль/л) вивільнення Ca^{2+} з EP є мінімальним, незалежно від діючої концентрації $InsP_3$. Цікаво, що при цьому нами відмічено збільшення часу напівспаду $InsP_3$ -індукованого зменшення $[Ca^{2+}]_{EP}$. Останнє, на нашу думку, може відображати сповільнення роботи Ca^{2+} -АТФази EP, яке спостерігається при локальному зменшенні $[Ca^{2+}]_i$ біля цитоплазматичних центрів зв'язування кальцію ферментом [13]. Водночас при $[Ca^{2+}]_i$ 2000 нмоль/л підвищення концентрації $InsP_3$ призводить до зростання амплітуди $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповіді та швидкості її розвитку.

Регуляція $InsP_3$ -індукованої $[Ca^{2+}]_{EP}$ -відповіді АТФ. Доведено, що $InsP_3R$ алостерично активується АТФ [9, 17, 28]. Виявлено наявність у складі молекули $InsP_3R$ специфічного АТФ-зв'язувального центру, поріг чутливості якого становить 17 пмоль/л АТФ [27]. У досліджуваних нами клітинах $InsP_3$ -індуковане вивільнення Ca^{2+} є основним шляхом підвищення $[Ca^{2+}]_i$, а його модуляція може мати істотне фізіологічне значення у процесах внутрішньоклітинної $[Ca^{2+}]_i$ -сигналізації загалом, проте дотепер немає даних про наявність і механізм модулюючої дії АТФ на $InsP_3R$ в ацинарних клітинах слинних залоз. З метою дослідити можливий вплив АТФ на функціонування $InsP_3R$ в ацинарних клітинах ми реєстрували амплітуду $InsP_3$ -індукованого вивільнення кальцію з EP за наявності та без АТФ у розчині НДВ. В експериментах використовували $MgATP$, однак нами встановлено, що $NaATP$ має здатність викликати зміни аналогічного характеру. Таким чином, обидві форми АТФ характеризуються здатністю модулювати вивільнення Ca^{2+} через $InsP_3R$, що було показано й іншими авторами [10, 17]. Крім того, нами виявлено, що модулюючий ефект АТФ на

зміну $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ спостерігався виключно за наявності InsP_3 , а АТФ *per se* не викликав вивільнення Ca^{2+} з депо ЕР.

З'ясувалося, що ефект АТФ на InsP_3 -чутливе вивільнення Ca^{2+} з ЕР залежить від його концентрації, а саме є позитивно кооперативним при низьких концентраціях і негативно кооперативним – при високих (рис. 4). Зокрема, аплікація InsP_3 (2 мкмоль/л) до пермеабілізованих ацинарних клітин у розчині НДВ, який містив 3 ммоль/л АТФ, супроводжувалася швидким зменшенням відношення F_{360}/F_{390} з амплітудою в середньому $0,047 \pm 0,006$ ($n=7$). Прикладання до ацинарних клітин InsP_3 (2 мкмоль/л) за наявності у розчині НДВ 0,5, 1 та 2 ммоль/л АТФ призводило до збільшення амплітуди InsP_3 -індукованого $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -транзієнта в середньому на 14 ± 1 ($n=4$), $27 \pm 4,6$ ($n=9$) та $28 \% \pm 6 \%$ ($n=6$) відповідно порівняно з таким при 3 ммоль/л АТФ, тобто становило $0,054 \pm 0,004$ ($n=4$), $0,06 \pm 0,01$ ($n=9$) та $0,061 \pm 0,013$ ($n=6$) відповідно (див. рис. 4). Здатність АТФ у низькій концентрації потенціювати InsP_3 -індуковане вивільнення Ca^{2+} також показано для пермеабілізованих гладеньком'язових клітин і везикул ЕР [15,

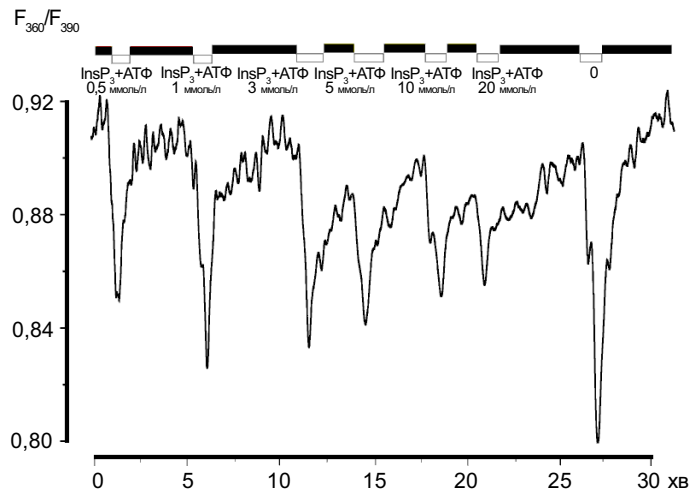


Рис. 4. Зменшення концентрації Ca^{2+} всередині ендоплазматичного ретикула, викликані прикладанням до пермеабілізованих клітин інозиталтрифосфатом (InsP_3 ; 2 мкмоль/л) на фоні різної концентрації АТФ. Біла лінія – аплікація InsP_3 у розчині НДВ з АТФ. Чорна лінія – клітини відмивали внутрішньоклітинним розчином без АТФ

23, 27]. Ми виявили зміни протилежного характеру при аплікації до ацинарних клітин InsP_3 (2 мкмоль/л) з АТФ у вищій концентрації (10 та 20 ммоль/л). За даних умов спостерігалось достовірне зменшення InsP_3 -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді на $5 \pm 0,3$ ($n=5$, $P<0,05$) та $15 \% \pm 2,6 \%$ ($n=6$, $P<0,01$) за наявності у середовищі 10 та 20 ммоль/л АТФ відповідно (див. рис. 4).

Таким чином, нами встановлено, що у невисокій концентрації АТФ потенціює InsP_3 -індуковане вивільнення Ca^{2+} з ЕР, у вищій за 2 ммоль/л – пригнічує. Ймовірною причиною виявленого нами стимулювального ефекту АТФ може бути підвищення частоти відкривання каналу InsP_3R , оскільки це явище описане для солубілізованого InsP_3R [9]. З іншого боку, пригнічення активності InsP_3R при високих концентраціях АТФ, можливо, викликане неспецифічним конкуруванням з InsP_3 -зв'язувальним центром рецептора [9, 31], що підтверджується даними, одержаними на пермеабілізованих гладеньком'язових клітинах [23]. Ми також припускаємо, що алостерична модуляція АТФ InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР ацинарних клітин може мати значення у $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -сигналізації та підтриманні життєздатності клітин за умови дефіциту енергетичних запасів.

Модуляція InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ кофеїном. Кофеїн – активатор Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} – відомий своєю здатністю блокувати InsP_3 -індуковане вивільнення Ca^{2+} з ЕР, що показано, зокрема на ооцитах [32] і мітосомах мозочка [8, 31]. З метою встановити, чи існує модулюючий ефект кофеїну на функціонування InsP_3R у досліджуваних нами клітинах, ми реєстрували InsP_3 -індуковані зміни $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ при одночасному прикладанні до клітин InsP_3 та кофеїну. Виявилось, що

аплікація до пермеабілізованих клітин InsP_3 у концентрації 2 мкмоль/л за наявності кофеїну (4 ммоль/л) і без нього супроводжувалося зменшенням $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ у середньому на $0,047 \pm 0,010$ (n=9) та $0,042 \pm 0,005$ відповідно (n=9; рис. 5,а). Тобто за наявності кофеїну нами було відмічено зменшення амплітуди InsP_3 -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді в середньому на 11 % \pm 3 % (P<0,05). Водночас прикладання до ацинарних клітин InsP_3 у концентрації 20 мкмоль/л без кофеїну та на фоні кофеїну викликало зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$, амплітуди яких достовірно не відрізнялись і становили в середньому $0,048 \pm 0,009$ та $0,052 \pm 0,005$ відповідно (n=7; див. рис. 5,а).

Таким чином, нами виявлено зменшення InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з EP за наявності у середовищі кофеїну, яке не спостерігалось при прикладанні InsP_3 у субмаксимальній концентрації. Такі самі зміни були і при аплікації до ацинарних клітин InsP_3 та кофеїну на фоні блокування ріанодинових рецепторів за допомогою 100 мкмоль/л ріанодину. Цікаво, що у безкальцієвому розчині НДВ ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 30$ нмоль/л) не спостерігалось такого пригнічення кофеїном InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з EP. Зокрема, InsP_3 у концентрації 2 мкмоль/л викликав зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ в

середньому на $0,047 \pm 0,010$ (n=9) та $0,044 \pm 0,005$ (n=9) без та за наявності кофеїну відповідно.

Враховуючи істотний модулюючий вплив АТФ на функціонування InsP_3R у досліджуваних клітинах, ми проводили прикладання до ацинарних клітин InsP_3 та кофеїну за наявності 1 ммоль/л АТФ (концентрації, в якій АТФ потенціює InsP_3 -індуковану $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповідь). Виявилось, що за наявності АТФ не спостерігається пригнічувального впливу кофеїну, навпаки, відбувається виражене потенціювання InsP_3 -індукованого зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ порівняно з таким без АТФ (див. рис. 5,б).

На основі цих результатів ми припустили, що пригнічувальний вплив кофеїну найбільш імовірно пов'язаний з його прямим модулюючим впливом на функціонування InsP_3R . Оскільки кофеїн не викликає змін InsP_3 -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді у безкальцієвому середовищі, то можливо, що його вплив пов'язаний, у першу чергу, з інгібуванням кальційзалежної потенціалізації InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з EP (див. рис. 4). Виявлена нами залежність опосередкованого кофеїном блокування InsP_3 -індукованої $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EP}}$ -відповіді від цитозольного Ca^{2+} повністю узгоджується з даними, одержаними на

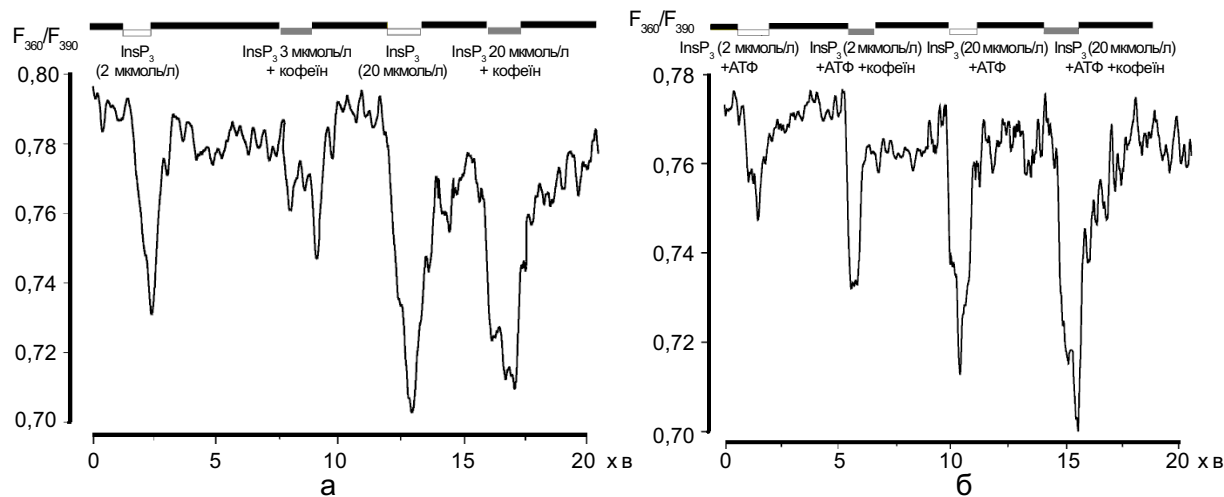


Рис. 5. Зменшення концентрації Ca^{2+} всередині ендоплазматичного ретикула, викликані прикладанням інозитолтрифосфату (InsP_3) за наявності кофеїну у внутрішньоклітинному розчині без АТФ (а) та 1 ммоль/л АТФ (б)

пермеабілізованих клітинах мозочка [8].

Згідно з літературними відомостями [32] за наявності порогових концентрацій InsP_3 активація InsP_3R призводить до запуску потужного кальційзалежного позитивнозворотного зв'язку на процес вивільнення Ca^{2+} з ЕР. З іншого боку, кофеїн зменшує крутість наростання кривої залежності між концентрацією InsP_3 і вивільненням Ca^{2+} з ЕР [32]. Виходячи з цього, логічно припустити, що підвищення кофеїном порогу активації InsP_3R кальцієм пов'язано з пригніченням за цих умов кальційзалежної потенціації InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР. Молекулярні механізми такої дії кофеїну на InsP_3 -індуковане вивільнення Ca^{2+} залишаються остаточно не з'ясованими. Можна припустити, що кофеїн, будучи потужним інгібітором фосфодієстерази, посилює фосфорилування InsP_3R , а це, як показано [35], призводить до припинення вивільнення Ca^{2+} з ЕР в ацинарних клітинах. Однак виявлені нами явища не можуть бути опосередковані фосфорилуванням InsP_3R , оскільки пригнічувальний вплив кофеїну спостерігався лише без наявності у середовищі АТФ. Таким чином, можна зробити висновок, що пригнічення InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} з ЕР, імовірно, зумовлено прямою інгібіторною дією кофеїну на InsP_3R . Таке припущення узгоджується з даними Хіросе та співавт. [20], згідно з міркуваннями яких кофеїн прямо інгібує саме InsP_3R або взаємодіє з близько розташованими білками. Крім того, враховуючи, що такий інгібіторний ефект кофеїну зникає при стимуляції клітин InsP_3 у субмаксимальних концентраціях і за наявності АТФ, можна припустити, що кофеїн функціонально конкурує з InsP_3 - чи АТФ-зв'язувальним центром молекули рецептора. Незважаючи на те, що у мікросомах мозочка не було виявлено прямого інгібіторного впливу кофеїну на зв'язування InsP_3 з InsP_3R [11], можливість такого ефекту не слід виклю-

чати, враховуючи, що ці експерименти були проведені за відсутності у середовищі Ca^{2+} (тоді як за цих умов нами не виявлено ефекту кофеїну на InsP_3 -індуковане зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$). Тому ми припускаємо, що інгібіторний ефект кофеїну опосередкований, очевидно, його конкурентною взаємодією з АТФ-зв'язувальним центром InsP_3R , оскільки такий ефект кофеїну не спостерігається за наявності АТФ у розчині НДВ.

Отже, ми припускаємо, що Ca^{2+} , вивільнений внаслідок активації InsP_3R , викликає в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози подальше посилення процесу InsP_3 -індукованого вивільнення Ca^{2+} за допомогою кальційзалежного позитивно-зворотного зв'язку на кальцієві канали InsP_3R , причому цей процес пригнічується кофеїном.

Робота виконана за підтримки JDRF grant # 1-2004-30 та Західно-українського фонду біомедичних досліджень.

**O.V. Kopach, I.A. Kruglikov, P.G. Kostyuk,
N.V. Voitenko, N.V. Fedirko**

CHARACTERISTICS OF INOSITOLTRISPHOSPHATE-SENSITIVE Ca^{2+} STORES IN THE ACINAR CELLS OF RAT SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND

In the acinar cells of rat submandibular salivary gland activation of cholinergic receptors leads to the release of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum (ER). This Ca^{2+} release from ER is mainly mediated by InsP_3 -receptors. In the present work we used Arsenazo III dye and mag-fura 2/AM to measure total cellular calcium content and Ca^{2+} concentration in the ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$), respectively. We have found that application of InsP_3 to the permeabilized acinar cells evoked decrease $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ in dose-dependent manner with EC_{50} 1.3 ± 0.21 mM. This InsP_3 -induced Ca^{2+} release from the ER was potentiated by Ca^{2+} in the physiological ranges (100-400 nM), modulated by caffeine and ATP. Low concentrations of ATP in (<1 mM) enhanced the InsP_3 -induced decrease $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ while high concentrations of ATP markedly suppressed Ca^{2+} release. Caffeine (2 mM) decreased InsP_3 -induced Ca^{2+} release in the presence of Ca^{2+} however it has no inhibitory effect in the absence of Ca^{2+} . This inhibitory effect of caffeine on InsP_3 -induced Ca^{2+} release is overcome by high concentration of InsP_3 (20 mM) and ATP (1 mM) indicating that caffeine functionally competes with InsP_3

receptor domains. We suggested that the ATP regulation of InsP_3 -induced Ca^{2+} release might also play a role in oscillations of intracellular Ca^{2+} and the maintenance of the cell survival during energy attenuation periods.

Ivan Franko Lviv National University, Lviv

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Копач О.В., Кругликов І.А., Войтенко Н.В. та ін. Пермеабілізовані клітини слинних залоз як модель для вивчення кальційтранспортних систем мембрани ендоплазматичного ретикула // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 5. – С. 31–42.
- Копач О.В., Кругликов І.А., Войтенко Н.В., Федірко Н.В. Тапсигаргінчутливе та нечутливе внутрішньоклітинне депо Ca^{2+} в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози шурів // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**, № 1. – С. 62–71.
- Копач О., Федірко Н. Кальційзалежні зміни функціонування ацинарних клітин слинних залоз при дії агоністів холінергічної природи // *Вісн. Львів. унту. Серія біологічна.* – 2004. – **37**. – С. 205–212.
- Akagi K., Nagao T., Urushidani T. Responsiveness of beta-escin-permeabilized rabbit gastric gland model: effects of functional peptide fragments // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**, № 3. – P. 736–744.
- Ambudkar I.S. Regulation of calcium in salivary gland secretion // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* – 2000. – **11**, № 1. – P. 4–25.
- Augustine G.J. How does calcium trigger neurotransmitter release? // *Curr. Opin. Neurobiol.* – **11**, № 3. – P. 320–326.
- Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle // *Cell Calcium.* – 2002. – **32**, № 5–6. – P. 235–249.
- Bezprozvanny I., Bezprozvannaya S., Ehrlich B.E. Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-trisphosphate-gated calcium channels from cerebellum // *Mol. Biol. Cell.* – 1994. – **5**, № 1. – P. 97–103.
- Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites // *Neuron.* – 1993. – **10**, № 6. – P.1175–1184.
- Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum // *Nature (London).* – 1991. – **351**, № 6329. – P.751–754.
- Brown G.R., Sayers L.G., Kirk C.J. et al. The opening of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} channel in rat cerebellum is inhibited by caffeine // *Biochem. J.* – 1992. – **282**, № 2. – P. 309–312.
- Bruce J.I., Yule D.I., Shuttleworth T.J. Ca^{2+} -dependent protein kinase-a modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in parotid acinar cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 50. – P. 48172–48181.
- Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**, № 3. – P. 1115–1122.
- Dolmetsch R.E., Pajvani U., Fife K. et al. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway // *Science.* – 2001. – **294**, № 5541. – P. 333–339.
- Ehrlich B.E., Watras J. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum // *Nature.* – 1988. – **336**, № 6199. – P. 583–586.
- Fedirko N., Klevetz M., Kruglikov I., Voitenko N. Mechanisms supporting calcium homeostasis in rat submandibular salivary gland acinar cells // *Neurophysiology.* – 2001. – **33**, № 4. – P. 252–259.
- Ferris C.D., Cameron A.M., Bredt D.S. et al. Autophosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, № 10. – P.7036–7041.
- Theibert A.B., Supattapone S., Ferris C.D. et al. Solubilization and separation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate- and inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins and metabolizing enzymes in rat brain // *Biochem J.* – 1990. – **267**, № 2. – P. 441–445.
- Furuichi T., Yoshikawa S., Miyawaki A. et al. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400 // *Nature.* – 1989. – **342**. – P. 32–38.
- Hirose K., Iino M., Endo M. Caffeine inhibits Ca^{2+} -mediated potentiation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in permeabilized vascular smooth muscle cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **194**, № 2. – P. 726–732.
- Hofer A.M., Machen T.E. Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – **90**, № 7. – P. 2598–2602.
- Iino M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci // *J. Gen. Physiol.* – 1990. – **95**. – P. 1103–1122.
- Iino M. Effects of adenine nucleotides on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release in vascular smooth muscle cells // *J. Gen. Physiol.* – 1991. – **98**, № 4. – P. 681–698.
- Iino M., Endo M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release // *Nature.* – 1992. – **360**. – P. 76–78.
- Lee M., Xu X., Zeng W. et al. Polarized expression of Ca^{2+} channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wave // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, № 25. – P. 15765–15770.
- Lomax R.B., Camello C., Van Coppenolle F. et al. Basal

- and physiological Ca^{2+} leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons // *Ibid.* – 2002. – **277**, № 29. – P. 26479–26485.
27. Maeda N., Kawasaki T., Nakade S. et al. Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum // *Ibid.* – 1991. – **266**, № 2. – P. 1109–1116.
28. Maes K., Missiaen L., De Smet P. Differential modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 and type 3 by ATP // *Cell Calcium.* – 2000. – **27**, № 5. – P. 257–267.
29. Melvin J.E., Yule D., Shuttleworth T. et al. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – **67**. – P. 11.1–11.25.
30. Missiaen L., Parys J.B., De Smedt H. et al. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP // *Biochem J.* – 1994. – **300**, № 1. – P. 81–84.
31. Nunn D.L., Taylor C.W. Liver inositol 1,4,5-trisphosphate-binding sites are the Ca^{2+} -mobilizing receptors // *Biochem J.* – 1990. – **270**. – P. 227–232.
32. Parker I., Ivorra I. Caffeine inhibits inositol trisphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in Xenopus oocytes // *J. Physiol.* – 1991. – **433**. – P. 229–240.
33. Patel S., Joseph S.K., Thomas A.P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *Cell Calcium.* – 1999. – **25**, № 3. – P. 247–264.
34. Smith P.M., Reed H.E. Amplification of the thapsigargin-evoked increase in the cytosolic free Ca^{2+} concentration by acetylcholine in acutely isolated mouse submandibular acinar cells // *Biochem J.* – 1996. – **317**, № 3. – P. 779–783.
35. Straub S.V., Giovannucci D.R., Bruce J.I., Yule D.I. A role for phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in defining calcium signals induced by peptide agonists in pancreatic acinar cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 35. – P. 31949–31956.
36. Tanimura A., Turner R.J. Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent oscillations of luminal $[\text{Ca}^{2+}]$ in permeabilized HSY cells // *Ibid.* – 1996. – **271**, № 48. – P. 30904–30908.
37. Vats J.A., Fedirko N.V., Klevets M.Y. et al. Role of SH Groups in the Functioning of Ca^{2+} -Transporting ATPases Regulating Ca^{2+} Homeostasis and Exocytosis // *Neurophysiology.* – 2002. – **34**, № 1. – P. 5–12.
38. Zimmermann B., Walz B. The mechanism mediating regenerative intercellular Ca^{2+} waves in the blowfly salivary gland // *EMBO J.* – 1999. – **18**, № 12. – P. 3222–3231.

Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка;
 Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця, НАН України, Київ

Матеріал надійшов до
 редакції 30.10.2005