

Л. О. Дубицький

Вплив двовалентних катіонів на екструзію пепсиногену пермеабілізованими ізольованими шлунковими залозами

На модели проницаемых изолированных желудочных желез, полученных путем их инкубации с дигитонином (15 мкг/мл), установлено, что стимулирующее влияние Ca^{2+} на экструзию пепсиногена полностью или частично воспроизводится катионами переходных металлов. Стимулирующий эффект катионов металлов ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на экструзию пепсиногена проницаемыми железами снижается в таком порядке: $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > La^{3+}$. Вместе с тем Co^{2+} и La^{3+} у тех же концентрациях угнетают Ca^{2+} -стимулируемую экструзию пепсиногена проницаемыми железами. Стимулирующий эффект Cd^{2+} и La^{3+} на экструзию пепсиногена железами с интактными плазматическими мембранами не воспроизводится. Кроме того, они угнетают карбахоллин-стимулируемую экструзию пепсиногена такими железами. Сделано заключение, что влияние ионов металлов на секреторную функцию желез желудка в значительной степени определяется их способностью проникать в железистые клетки а также взаимодействовать с их плазматическими мембранами.

Вступ

Встановлено [13, 14, 16], що катіони перехідних металів, зокрема Mn^{2+} і La^{3+} , пригнічують агоністстимульовану екструзію амілази переживаючими тканинними фрагментами підшлункової і привушної залоз миші і щура. Також показано [16], що катіони Mn^{2+} здатні безпосередньо стимулювати екструзію амілази тканинними фрагментами привушної залози миші. Хронічна пероральна інтоксикація хлоридом марганцю протягом 40–70 діб супроводжувалась підвищеною секреторною активністю епітеліоцитів слизової оболонки тонкої кишки білих щурів, особливо бокалоподібних клітин і клітин Панета [10]. Попередніми нашими дослідженнями встановлено [3], що характер порушень екструзії пепсиногену ізольованими шлунковими залозами морських свинок під впливом катіонів перехідних металів залежить від їх виду і концентрації у позаклітинному середовищі. У низьких концентраціях (10^{-5} – 10^{-4} моль/л) катіони цих металів знижують секреторну реакцію шлункових залоз на дію активаторів секреції (карбахолін), пригнічуючи вхід іонів кальцію в залозисті клітини. У високих концентраціях (10^{-3} – 10^{-2} моль/л) катіони металів залежно від їх виду стимулюють (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) або пригнічують (La^{3+} , Cd^{2+}) екструзію пепсиногена. Ефекти високих концентрацій катіонів металів відтворюються у безкальцієвих середовищах інкубації залоз. Очевидно, нагромаджуючись у секреторних клітинах, вони здатні порушувати внутрішньоклітинні механізми екзоцитозу, що може спостерігатись

© Л. О. Дубицький

при хронічних інтоксикаціях металами. Одним з методичних підходів для з'ясування цих порушень є використання пермеабілізованих шлункових залоз [15]. Такий підхід дозволяє знизити бар'єрні властивості плазматичних мембран і безпосередньо моделювати іонний склад цитоплазми секреторних клітин шлунка. Мета нашої роботи — дослідження впливу катіонів перехідних металів на екструзію пепсиногену пермеабілізованими ізольованими шлунковими залозами.

Методика

Досліди проводили на ізольованих залозах шлунка морських свинок. Виділення залоз та оцінку їх життєздатності здійснювали за як описаною раніше методикою [7]. Аліквоти суспензії залоз вносили в колби з висококалієвим середовищем інкубації, що містило досліджувані речовини, і інкубували 30 хв на водяній бані (37 °С) при постійному струшуванні з повітрям як газовою фазою. Висококалієве середовище інкубації містило (ммоль/л): NaCl — 20,0; KCl — 100,0; Na₂ATP — 5,0; MgCl₂ — 6,2; N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота (HEPES) — 25,0; рН 7,4. Для збільшення проникливості плазматичних мембран секреторних клітин в суспензію залоз на початку інкубації вносили неіонний детергент — дигітонін (5–30 мкг/мл). Середовище інкубації для залоз з інтактними плазматичними мембранами містило (ммоль/л): NaCl — 138,4; KCl — 5,9; MgCl₂ — 1,2; триоксиметиламінометан (трис) — 10; глюкоза — 2 мг/мл; рН 7,5. Катіони Ca²⁺ та інших металів вносили у середовище інкубації залоз у вигляді хлоридів. Інтенсивність екструзії пепсиногену шлунковими залозами оцінювали за приростом протеолітичної активності середовища інкубації і виражали у відсотках від сумарної протеолітичної активності тритонового лізату суспензії залоз шлунка. Виділення клітинами залоз лактатдегідрогенази оцінювали аналогічно. Тритоновий лізат залоз отримували 30-хвилинною їх інкубацією з тритоном X-100 (0,25 %) з наступним центрифугуванням для відокремлення залишків клітин. Протеолітичну активність і активність лактатдегідрогенази визначали як описано раніше [3, 7]. Результати обробляли статистично.

Результати досліджень

Встановлено, що дигітонін у концентраціях 5–30 мкг/мл викликає дозозалежне збільшення виділення лактатдегідрогенази секреторними клітинами ізольованих шлункових залоз. Так, за 30 хв інкубації залоз при наявності 30 мкг/мл дигітоніну вихід лактатдегідрогенази в середовище становив 70–80 % від рівня сумарної лактатдегідрогеназної активності суспензії залоз (див. рис. 1, а). Отримані результати свідчать про збільшення проникливості плазматичних мембран секреторних клітин шлункових залоз під впливом дигітоніну.

Додавання до середовища інкубації пермеабілізованих залоз Ca²⁺ ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), які належать до внутрішньоклітинних стимуляторів екзоцитозу, супроводжувалось збільшенням екструзії пепсиногену в діапазоні концентрацій дигітоніну 5–30 мкг/мл на 90–160 %, порівняно з її рівнем у безкальцієвому середовищі, яке містило кальцієвий хелатор-етиленглікольдіамінотетраацетат (EGTA, 0,1 ммоль/л, рис. 1, б). Таким чином,

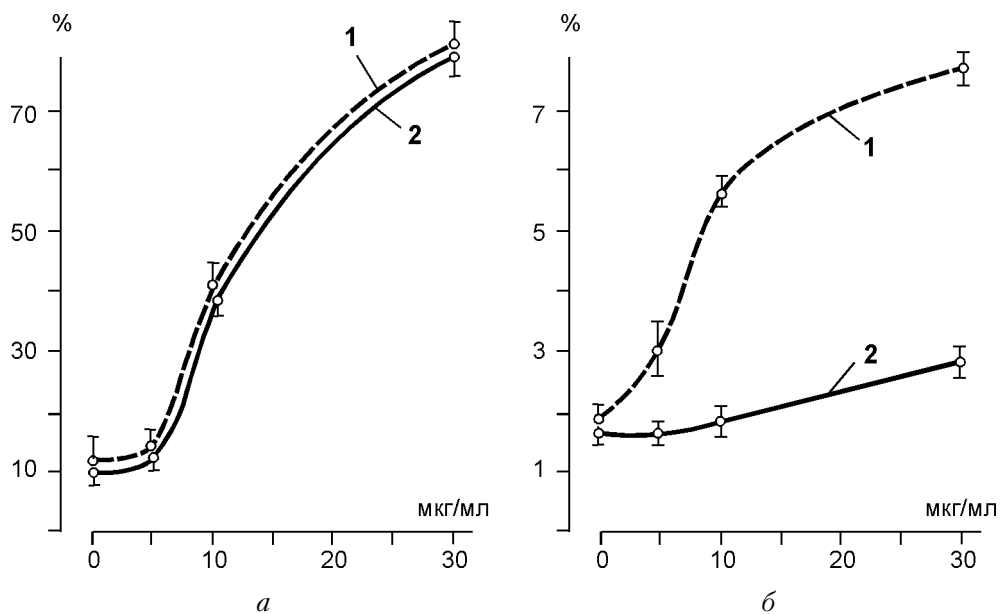
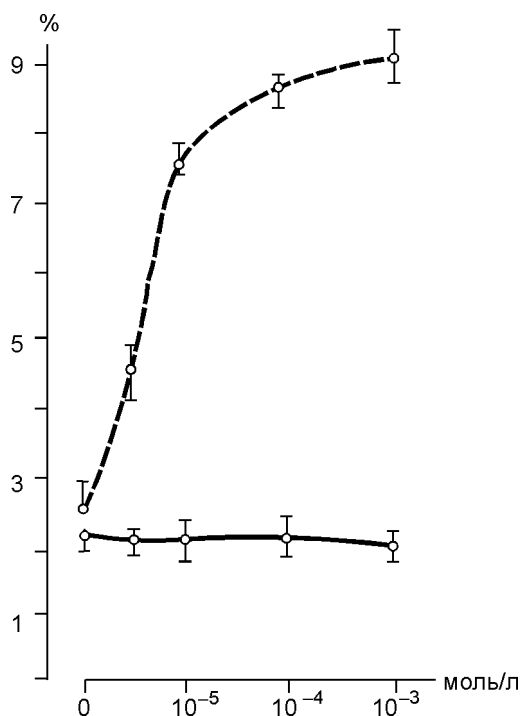


Рис. 1. Вплив дигітоніну (мкг/мл) на виділення лактатдегідрогенази (а) та екструзію пепсиногену (б) диспергованими шлунковими залозами: 1 — кальцієве середовище (Ca^{2+} , $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), 2 — безкальцієве середовище (EGTA, 0,1 моль/л).

пермеабілізовані шлункові залози, отримані при наявності дигітоніну (5–30 мкг/мл) зберігають функціональну активність, зокрема здатність до екзоцитозу.



В наступних дослідженнях на пермеабілізованих шлункових залозах, які отримували шляхом додавання до них на початку 30-хвилинної інкубації дигітоніну в кінцевій концентрації 15 мкг/мл, було показано, що залежність Ca^{2+} -стимульованої екструзії пепсиногену такими залозами від концентрації Ca^{2+} має гіперболічний характер. Максимальний рівень екструзії пепсиногену спостерігався при концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації 10^{-4} – 10^{-3} моль/л і перевищував рівень спонтанної екструзії на 310–405 % (рис. 2).

Рис. 2. Вплив Ca^{2+} (моль/л) на екструзію (%) пепсиногену шлунковими залозами: 1 — екструзія за наявності дигітоніну (15 мкг/мл), 2 — екструзія без дигітоніну.

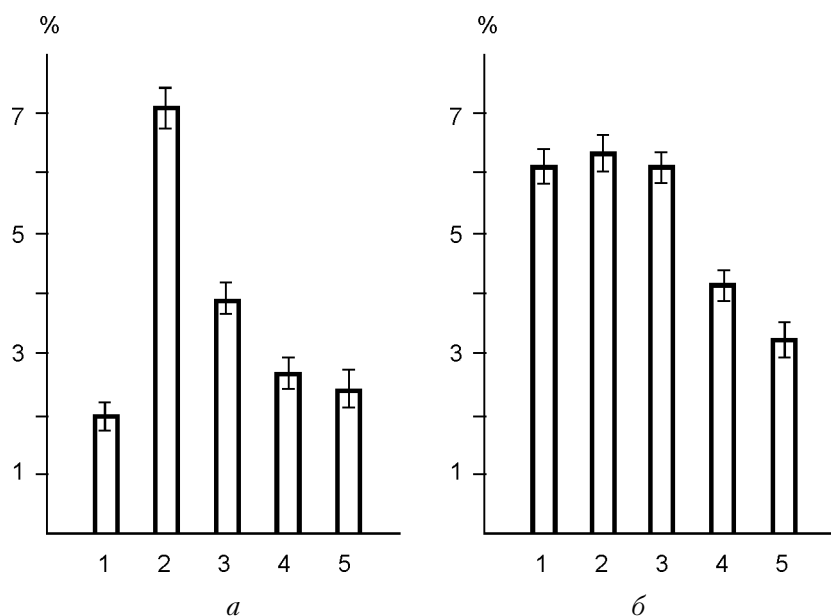


Рис. 3. Вплив катіонів перехідних металів на екструзію (%) пепсиногену шлунковими залозами у безкальцієвому (а) та кальцієвому середовищі: а: 1 — EGTA, 0,1 ммоль/л; 2 — Cd^{2+} ; 3 — Mn^{2+} ; 4 — Co^{2+} ; 5 — La^{3+} ; б — 1 — Ca^{2+} ; 2 — Ca^{2+} , Cd^{2+} ; 3 — Ca^{2+} , Mn^{2+} ; 4 — Ca^{2+} , Co^{2+} ; 5 — Ca^{2+} , La^{3+} . Концентрація Ca^{2+} і катіонів перехідних металів — $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Внесення в середовище інкубації пермеабілізованих шлункових залоз замість Ca^{2+} іонів перехідних металів ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) також супроводжувалось збільшенням екструзії пепсиногену. Стимулюючий ефект Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} становив відповідно 275, 104, 41, 22 % від рівня спонтанної екструзії пепсиногену (рис. 3, а). Стимуляція екструзії пепсиногену катіонами перехідних металів визначається, ймовірно, кількома факторами. Вони можуть безпосередньо ініціювати процеси екзоцитозу, заміщаючи Ca^{2+} завдяки їх високій здатності до комплексоутворення [12]. Вплив катіонів цих металів на екструзію пепсиногену пермеабілізованими залозами певною мірою може опосередковуватись також виходом Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо завдяки пригніченню активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази [5, 8, 9], $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обміну [6] та транспорту Ca^{2+} в мітохондрії [4, 11]. Залежність екструзії пепсиногену від виду катіонів металів визначається, очевидно, їх здатністю взаємодіяти, зокрема координуватись, з функціонально активними групами макромолекул секреторної клітини. Проте отриманий функціональний ряд іонів металів не відповідає закономірності Ірвінга — Уільямса [12], згідно з якою зменшення радіуса іона і збільшення ефективного заряду його атома призводить до підвищення стійкості комплексів. Це може проілюструвати такими даними [2]:

символ металу	Ca^{2+}	Cd^{2+}	Mn^{2+}	Co^{2+}	La^{3+}
радіус іона, нм (за Полінгом)	99	97	80	72	115
електронегативність атома (за Полінгом)	1,0	1,7	1,5	1,8	1,1

Очевидно, здатність іонів металів стимулювати екзоцитоз значною мірою визначається їх неоднаковою спорідненістю до різних функціональних груп (карбоксильні, амінні, сульфгідрильні тощо) макромолекул, що беруть участь у процесах екзоцитозу і кальцієвого гомеостазу клітин [2, 12].

Інший характер мали зміни Ca^{2+} -стимульованої екструзії пепсиногену пермеабілізованими шлунковими залозами під впливом різних видів катіонів перехідних металів (рис. 3, б). Так, Mn^{2+} і Cd^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) суттєво не впливали на екструзію пепсиногену пермеабілізованими залозами, стимульованими Ca^{2+} ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Разом з тим Co^{2+} і La^{3+} ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), здатність яких стимулювати екзоцитоз значно нижча порівняно з Ca^{2+} , пригнічували кальційстимульовану екструзію пепсиногену на 33–47 %, наближаючи її до рівня власного стимулюючого ефекту. В основі цього лежить, ймовірно, здатність цих катіонів металів конкурувати з іонами кальцію за місця зв'язування в секреторній клітині, що веде до порушення кальційзалежних механізмів екзоцитозу.

Слід, проте, зазначити, що на ізольованих залозах з інтактними плазматичними мембранами стимулюючий ефект Cd^{2+} і La^{3+} на екструзію пепсиногену на відміну від Mn^{2+} і Co^{2+} не відтворюється (див. таблицю). Більше того, Cd^{2+} і La^{3+} у концентрації 10^{-3} моль/л пригнічували екструзію пепсиногену інтактними ізольованими залозами, стимульованими карбахоліном (10^{-4} моль/л) у безкальцієвому середовищі. Це свідчить про те, що вплив цих катіонів металів на екструзію пепсиногену значною мірою визначається їх взаємодією з плазматичними мембранами секреторних клітин. Ймовірно, катіони металів з високою спорідненістю до білкових і фосфоліпідних компонентів біомембран, зокрема La^{3+} і Cd^{2+} [13], повільно проникають в клітини залоз і при короткочасних експозиціях діють переважно на рівні плазматичних мембран, пригнічуючи рецепторзалежні системи активації екзоцитозу, зокрема кальціймобілізуючу фосфоінозитидну систему. Так, відомо [1], що ключовий фермент цієї системи — фосфоліпаза С (фосфати-

Вплив катіонів перехідних металів (10^{-3} моль/л) на екструзію (%) пепсиногену диспергованими залозами шлунка з інтактними плазматичними мембранами ($M \pm m$, $n = 6$)

Катіон металу	Екструзія	
	без катіонів металу (контроль)	за наявності катіонів металу
Спонтанна екструзія		
Mn^{2+}	1,20 ± 0,06	2,40 ± 0,15*
Co^{2+}	1,70 ± 0,05	2,16 ± 0,13*
Cd^{2+}	1,78 ± 0,09	1,65 ± 0,07
La^{3+}	1,11 ± 0,08	1,13 ± 0,08
Карбахолін, 10^{-4} моль/л		
Mn^{2+}	2,13 ± 0,15	4,42 ± 0,67*
Co^{2+}	3,08 ± 0,06	3,60 ± 0,08*
Cd^{2+}	3,79 ± 0,13	2,28 ± 0,14*
La^{3+}	2,12 ± 0,23	1,54 ± 0,07*

* $P < 0,05$.

дилінозит-фосфодиестераза), активується Ca^{2+} та чутливий до SH-реагентів (пара-хлормеркурбензоат) і важких металів.

Таким чином, катіони перехідних металів, проникаючи в секреторні клітини шлункових залоз, здатні стимулювати процеси екзоцитозу з ефективністю, яка залежить від виду катіонів металів. Разом з тим катіони металів, які слабо активують екзоцитоз, зокрема Co^{2+} і La^{3+} , пригнічують кальційстимульовану екструзію пепсиногена залозами шлунка. Вплив катіонів металів на процеси екзоцитозу секреторних клітин шлункових залоз значною мірою визначається їх здатністю проникати в ці клітини та взаємодіяти з їх плазматичними мембранами.

L. O. Dubitsky

**THE INFLUENCE OF TRANSIENT METALS CATIONS
ON PEPSINOGEN EXTRUSION
BY PERMEABLE ISOLATED GASTRIC GLANDS**

The model of permeable gastric glands obtained by its incubation with digiton (15 mg/ml) had investigated. It was shown, that stimulated influence of Ca^{2+} ions on pepsinogen extrusion completely or partly reproduced by cations of transient metals. Stimulated effects of cations of metals ($5 \cdot 10^{-4}$ M) decrease in such order: $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{La}^{3+}$. Nevertheless, Co^{2+} and La^{3+} in the same concentrations inhibit Ca^{2+} stimulated extrusion of pepsinogen by permeable isolated glands. Stimulated effect of Cd^{2+} and La^{3+} on pepsinogen extrusion in native glands was not reproducable. Besides these cations inhibit carbacholine-stimulated extrusion in native glands. It's concluded, that influence of metal cations on secretory function of gastric glands to a great extent is determined by their property to penetrate into secretory cells and cooperate with their plasma membranes.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. — М.: Мир. — 1978. — 396 с.
2. Горюновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии. — Киев: Наук. думка. — 1987. — 829 с.
3. Дубицький Л.О. Дослідження впливу катіонів перехідних металів на екструзію пепсиногену диспергованими залозами шлунка // Фізіол. журн. — 1995. — **41**, № 5-6. — С. 12-17.
4. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Вплив катіонів перехідних металів на дихання та продукування H^+ мітохондріями печінки // Укр. біохім. журн. — 1996. — **68**, № 5. — С. 59-63.
5. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Сабадаш Г.І., Синюк З.В. Вплив катіонів перехідних металів на системи підтримання кальцієвого гомеостазу секреторних клітин шлунка // Експериментальна та клінічна фізіологія. — Львів: Вид-во Львів. мед. ун-ту. — 1995. — С. 148-149.
6. Дубицький Л.О., Сабадаш Г.І. Вплив гіпонатрієвих середовищ на екструзію пепсиногену диспергованими залозами шлунка // Фізіол. журн. — 1995. — **41**, № 3-4. — С. 45-48.

7. Дубицький Д.О., Шостаковська І.В. Дослідження ролі зовнішньо- і внутрішньоклітинного кальцію в екструзії пепсиногену ізольованими залозами шлунка // Там же. — 1992. — **38**, № 1. — С. 46-51.
8. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. — К.: Наук. думка, 1990. — 216 с.
9. Костерин С.А., Курский М.Д., Браткова Н.Ф. Влияние двухвалентных ионов металлов — стимуляторов сократительной активности матки, на Mg^{2+} , АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} во фракции сарколеммы миометрия // Вопросы мед. химии. — 1984. — № 2. — С. 97-102.
10. Луговский С.П. Морфологические изменения в слизистой оболочке тонкого кишечника крыс при хронической марганцевой интоксикации // Микроэлементозы человека. — М.: Медицина. — 1989. — С. 175-176.
11. Ташмухамедов В.А., Гагельганс А.И. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент: Фан. — 1973. — 223 с.
12. Яцимирский К.В., Крисс Е.Е., Гвяздовская В.Л. Константы устойчивости комплексов металлов с биолгандами. — Киев: Наук. думка. — 1979. — 225 с.
13. Chandler D.E., Williams J.A. Effects of La^{3+} on pancreatic amylase secretion and Ca^{+} fluxes // Fed.Proc. — 1974. — **33**, № 3, part. 1. — P. 409.
14. Kanno T., Niskimura O. Stimulus secretion coupling in pancreatic acinar cells: inhibitory effects of removal and manganese addition on pancreozymin induced amylase release // J.Physiol. (Gr. Brit.) — 1976. — **256**, № 2. — P. 309-324.
15. Norris S.H., Hersey S.J. Stimulation of pepsinogen secretion in permeable isolated gastric glands // Amer. J.Physiol. — 1985. — **249**, № 3. — P. G408-G415.
16. Petersen O.H., Ueda N., Hall R.A., Gray T.A. The role of calcium in parotid amylase secretion evolved by excitation of cholinergic, α - and β -adrenergic receptors // Pflugers Arch. — 1977. — **372**, № 3. — P. 231-237.
17. Venugopal B., Luckey T.D. Metal toxicity in mammals. — New York: Plenum press. — 1978. — **2**. — 409 p.

*Львів. ун-т
М-ва освіти України*

*Матеріал надійшов
до редакції 02.06.97*