

О.В. Копач, І.А. Кругликов, Н.В. Войтенко, Н.В. Федірко

Тапсигаргінчутливе та нечутливе внутрішньоклітинне кальцієве депо в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів

Ацинарные клетки подчелюстной слюнной железы характеризуются гетерогенностью внутриклеточных кальциевых депо. В данной работе мы использовали металлохромный краситель арсеназо III для измерения в клетках общего содержания кальция и флуоресцентный краситель fura 2/AM – концентрации цитоплазматического Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). В экспериментах на интактных и на пермеабиллизированных клетках нами показано, что количество Ca^{2+} , высвобождаемое при ингибировании Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (ЭР) тапсигаргином, составляет приблизительно 30 % от общего содержания в нем кальция. Установлено также, что как ингибирование Ca^{2+} -АТФазы тапсигаргином, так и опустошение ЭР при действии ацетилхолина (АХ) приводило к активации депоуправляемого входа Ca^{2+} (общее содержание кальция в ацинарных клетках увеличивалось приблизительно на 14 %). В пермеабиллизированных клетках аппликация АХ после их преинкубации с тапсигаргином вызывала уменьшение общего содержания кальция в клетках приблизительно на 38 %. В то же время в интактных клетках последнее сопровождалось генерацией кальциевых транзиентов градуально уменьшающейся амплитуды. Таким образом, можно предположить, что АХ вызывает дополнительное высвобождение Ca^{2+} с тапсигаргинчувствительных внутриклеточных депо. Такое дополнительное высвобождение является IP_3 -чувствительным, поскольку полностью блокируется гепарином. Мы считаем, что в ацинарных клетках подчелюстной слюнной железы крыс вероятно функционирует тапсигаргинчувствительное и нечувствительное депо кальция.

ВСТУП

Кальцій як універсальний внутрішньоклітинний посередник відіграє вирішальну роль у регуляції функціонування практично всіх типів клітин. У незбудливих клітинах одним із основних елементів внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації є активація мембранних рецепторів, спряжених із G-білками, фосфоліпази C та інозитол 1,4,5-трифосфат (IP_3)-чутливого кальцієвого депо [2, 16, 20]. Вивільнення Ca^{2+} із IP_3 -чутливого депо призводить до активації депокерованого входу Ca^{2+} із зовнішньоклітинного середовища, що розглядається як основний шлях його надходження в клітини

слинних залоз, і перезаповнення депо ендоплазматичного ретикулума (ЕР) [5].

Мускаринові рецептори, природним активатором яких є нейромедіатор ацетилхолін (АХ), відіграють важливу роль у регуляції секреції води, електролітів і ферментів ацинарними клітинами слинних залоз [2, 16, 20, 35]. Активація цих рецепторів (M_1 та M_3) [22] призводить до підвищення концентрації IP_3 , що є значно важливим для збільшення $[Ca^{2+}]_i$, оскільки IP_3 зв'язується й активує катіонселективний іонний канал, спряжений із IP_3 -рецептором мембрани ЕР [4, 30]. Показано, що ЕР є основним внутрішньоклітинним кальцієвим депо, яке забезпечує IP_3 -індуковане

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

вивільнення Ca^{2+} . Проте залишається остаточно нез'ясованим чи інші внутрішньоклітинні органи відіграють роль депо кальцію у кальцієвій сигналізації [20].

IP_3 -чутливе кальцієве депо ER називають також швидкообмінним. Основним шляхом його перезаповнення кальцієм після завершення дії стимулу вважають транспортування Ca^{2+} всередину цистерн Ca^{2+} -АТФази, локалізованою в мембрані ER. Вважається, що блокування тапсигаргіном Ca^{2+} -АТФази призводить до повного спустошення кальцієвого депо ER [29, 16]. Властивості швидкообмінного кальцієвого депо досліджено у клітинах культури підщелепної та привушної слинних залоз [13, 16, 18], у клітинах привушної [23–32], підщелепної залоз [39] і проток підщелепної слинної залози [11, 17].

Проте нині є багато даних, що свідчать про наявність більше ніж одного типу внутрішньоклітинних кальцієвих депо в ацинарних клітинах. В ацинарних клітинах слинних залоз було ідентифіковано декілька типів внутрішньоклітинних кальцієвих депо. У цих клітинах крім тапсигаргінчутливого депо, виявлено мітохондріальне тапсигаргінчутливе та немітохондріальне тапсигаргіннечутливе іономіцинчутливе кальцієве депо [7, 19]. Роль останнього, вірогідно, відіграють секреторні гранули, які характеризуються високим вмістом Ca^{2+} [21]. Дійсно, Мартінезом та співавт. [19] було показано наявність у секреторних гранулах тапсигаргіннечутливого кальцієвого депо, однак дещо пізніше виявилось, що кальцієве депо секреторних гранул є нечутливим до IP_3 [36] і в їх мембрані, на відміну від ER, не експресуються IP_3 -чутливі рецептори [37]. На думку авторів [36, 37], це виключає будь-яке фізіологічне значення кальцію, розташованого всередині везикул, у генерації агоністіндукованих кальцієвих сигналів, оскільки при стимуляції ацинарних клітин основна кількість Ca^{2+} вивільняється із IP_3 -чутливого кальцієвого депо [20]. З іншого боку, деякі органи

також мають здатність депонувати та вивільняти Ca^{2+} . Крім згаданих мітохондрій і секреторних гранул, IP_3 -чутливим депо кальцію є ядро [8, 9] та апарат Гольджі [24]. Таким чином, для багатьох типів клітин показано гетерогенність внутрішньоклітинних кальцієвих депо, проте відомості про їх взаємозв'язок при генерації агоністіндукованих кальцієвих сигналів у клітинах підщелепної слинної залози щурів відсутні, що і зумовило мету нашої роботи.

МЕТОДИКА

Ізолювання ацинусів підщелепної слинної залози щурів. Експерименти проводили на ізолюваних ацинусах підщелепної слинної залози самців щурів лінії Вістар віком 1,5 міс. Ацинуси ізолювали з тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині з колагеназою (тип I, 320 мод./мг) за методикою, описаною раніше [1]. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl_2 – 1,3, MgCl_2 – 1,0, HEPES – 10, глюкоза – 10, pH 7,4.

Вимірювання вмісту внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Після закінчення інкубації ацинарні клітини осаджували центрифугуванням (5 хв, 1000 г). Осад гомогенізували та одержаний гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 1500 г. Вміст сумарного кальцію у тканині ацинарних клітин визначали спектрофотометрично з використанням металохромного барвника арсеназо III за описаною методикою [33]. Принцип даного методу полягає в тому, що іони кальцію утворюють з арсеназо III комплекс синього кольору, інтенсивність забарвлення якого еквівалентна концентрації Ca^{2+} у пробі. Вміст кальцію виражали у наномолях у перерахунку на 1 мкг білка, який визначали за методом Лоурі.

Хімічна пермеабілізація ацинарних клітин. Пермеабілізацію проводили за описаною методикою [1]. Для пермеабілізації мембрани ми використовували неіонний

детергент β -есцин (40 мкг/мл), застосування якого забезпечує вільний доступ до цитоплазми іонів та молекул невеликого розміру з одночасним збереженням функціональної активності мембранно-зв'язаних білків і внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [14]. 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 НДВ-розчині становила близько 100 нмоль/л.

Вимірювання концентрації цитозольного іонізованого кальцію. Ацинарні клітини забарвлювали з використанням мембранно-проникної форми барвника fura-2 (fura 2/AM, 10 мкмоль/л) за наявності детергента, pluronic F-127 (0,02 %) протягом 35 хв при 33°C. Вимірювання [Ca²⁺]_i проводили в експериментальній камері, змонтованій на мікроскопі Axiolab (“Zeiss”, Німеччина). За клітинами спостерігали за допомогою довгофокусного, водоімерсійного об'єктива $\times 63$. Для збудження флуоресценції зафарбовані fura 2/AM ацинарні клітини по чергово опромінювали світлом довжиною хвиль 360 \pm 5 і 390 нм \pm 5 нм. Флуоресцентний сигнал реєстрували на довжині хвилі 510 нм \pm 10 нм. Сигнали, які відповідають двом довжинам хвиль збудження, зберігали за допомогою IBM-сумісного комп'ютера з програмно-апаратним комплексом Tida (“Batelle”, Німеччина). Вміст вільного цитоплазматичного кальцію в ацинарних секреторних клітинах розраховували за формулою Грінкевича [10].

Статистичний аналіз. Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за критерієм t Ст'юдента з використанням програмного пакету Microsoft Excel, аналіз змін співвідношення інтенсивності флуоресценції 360/390 нм проводили за допомогою програми Microcal Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій групі експериментів ми вивчали часову залежність ефектів специфічного блокатора Ca²⁺-АТФази EP – тапсигаргину (0,1 мкмоль/л) на сумарний вміст кальцію у інтактних і пермеабілізованих ацинарних клітинах слинних залоз.

Нами показано, що інкубація інтактних секреторних клітин у кальційвмісному зовнішньоклітинному середовищі, до якого додавали тапсигаргін (0,1 мкмоль/л), супроводжувалася достовірним підвищенням у клітинах сумарного вмісту кальцію. Зокрема, після 10, 20 та 30 хв інкубації клітин за наявності тапсигаргину цей показник статистично достовірно збільшувався на 11 \pm 2, 14 \pm 2 та 13 % \pm 2 % відповідно (P < 0,05; n = 8) порівняно з контролем (рис. 1,а). На відміну від цього, інкубація інтактних секреторних клітин у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі за наявності тапсигаргину призводила до зменшення в них сумарного вмісту кальцію, який внаслідок 10, 20 та 30 хв інкубації клітин статистично достовірно зменшувався на 18 \pm 3, 19 \pm 4 та 27 % \pm 3 % відповідно (P < 0,05; n = 8, рис. 1,а).

Виявлені зміни сумарного вмісту кальцію в інтактних ацинарних клітинах під впливом тапсигаргину зумовлені блокуванням ним Ca²⁺-АТФази мембрани EP, внаслідок чого припиняється процес перезаповнення кальцієвого депо EP, і вміст Ca²⁺ у цій органелі поступово зменшується внаслідок стаціонарного витоку Ca²⁺ у цитоплазму [15, 12]. Слід зазначити, що, вимірюючи сумарний вміст кальцію, ми визначаємо вміст як іонізованого цитозольного, так депонованого і зв'язаного кальцію, тому збільшення, яке ми спостерігали в кальційвмісному середовищі, очевидно, зумовлене входом Ca²⁺ ззовні. Єдиним відомим механізмом такого входу є депокерований вхід Ca²⁺, наявність якого була показана в клітинах слинних залоз [26]. Зменшення концентрації Ca²⁺ у EP призводить до акти-

вації депокерованого надходження Ca^{2+} , що пояснює виявлене нами незначне підвищення сумарного вмісту кальцію при тривалій інкубації клітин з тапсигаргіном.

Навпаки, викликане тапсигаргіном зменшення сумарного вмісту кальцію у інтактних ізольованих клітинах слинних залоз внаслідок їх інкубування у безкальцієвому середовищі відбувається

внаслідок витоку Ca^{2+} із ЕР у цитоплазму після блокування Ca^{2+} -АТФази і його подальшого виведення у зовнішньоклітинний простір Ca^{2+} -АТФазою плазматичної мембрани. Ми не беремо до уваги можливий внесок $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, оскільки, згідно з даними літератури, він не відіграє істотної ролі у регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в екзокринних клітинах [2, 28]. Тому, протилежний характер ефектів тапсигаргіну на зміни сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах у безкальцієвому та кальційвмісному середовищах зумовлений, імовірно, активацією депокерованого входу Ca^{2+} у клітини досліджуваних залоз.

Для підтвердження висловленої нами гіпотези наступну серію експериментів ми проводили на пермеабілізованих клітинах підщелепної слинної залози. З'ясувалося, що інкубування пермеабілізованих ацинарних клітин у кальційвмісному НДВ-розчині, який містив тапсигаргін (0,1 мкмоль/л), призводило до достовірного зменшення у них сумарного вмісту кальцію, який через 5, 10, 20 та 30 хв зменшувався в середньому на $9\% \pm 1\%$ ($P < 0,05$; $n = 8$), 18 ± 2 , 29 ± 4 та $30\% \pm 4\%$ ($P < 0,01$; $n = 7$) відповідно (рис. 1, б).

Аналогічні зміни спостерігались і внаслідок інкубації пермеабілізованих клітин у безкальцієвому НДВ-розчині, який також містив тапсигаргін (0,1 мкмоль/л). При цьому сумарний вміст кальцію в пермеабілізованих секретор-

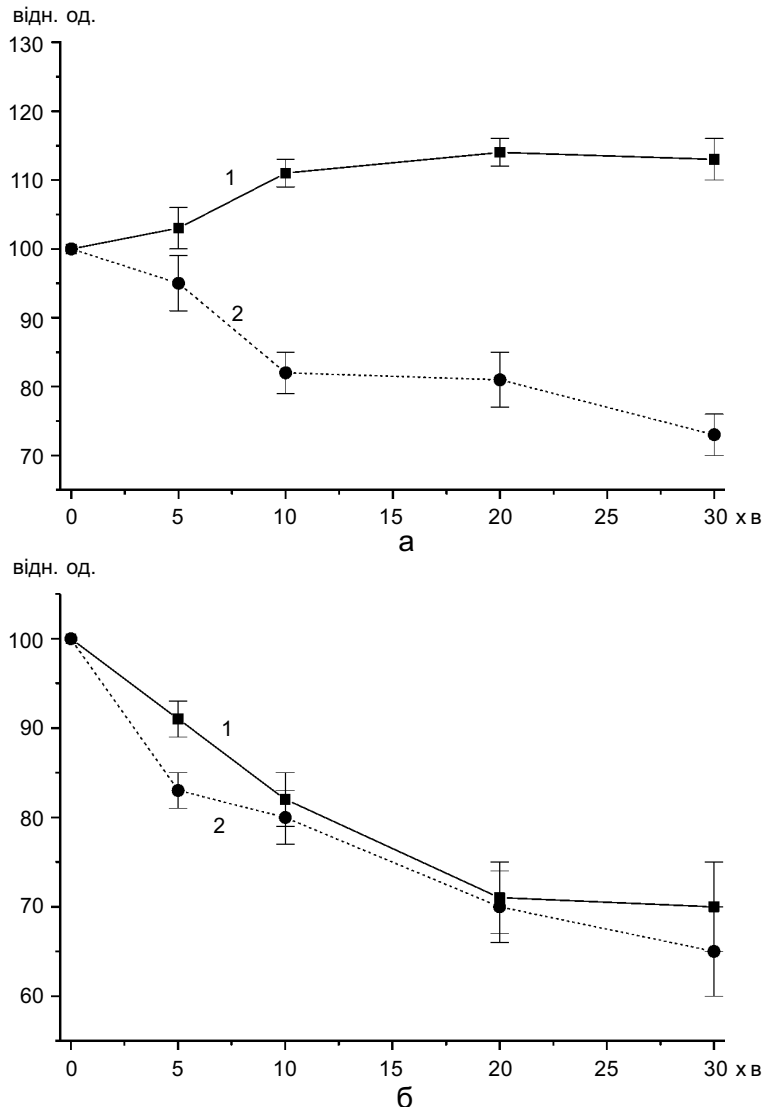


Рис. 1. Залежність сумарного вмісту кальцію у інтактних (а) та пермеабілізованих (б) ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів від тривалості їх інкубування з тапсигаргіном: 1 – кальційвмісний розчин, 2 – безкальцієвий розчин, що містив 0,2 ммоль/л ЕГТА. За вісью ординат – нормалізований до моменту початку вимірювання вміст кальцію; за вісью абсцис – тривалість інкубування клітин з тапсигаргіном

них клітинах достовірно зменшувався в середньому на 17 ± 1 ($P < 0,05$; $n = 8$), 20 ± 2 , 30 ± 3 та $35 \% \pm 5 \%$ ($P < 0,01$; $n = 8$) внаслідок 5, 10, 20 та 30 хв інкубування клітин.

Таким чином, важливим фізіологічним висновком із одержаних нами результатів є те, що вміст кальцію, який вивільняється при блокуванні Ca^{2+} -АТФази EP, становить близько 30 % від загального вмісту кальцію у депо. Це підтверджується як результатами експериментів, проведених на інтактних клітинах за умов безкальцієвого середовища, так і на пермеабілізованих клітинах. Причому викликане тапсигаргіном максимальне зменшення сумарного вмісту кальцію спостерігається після 20 хв інкубування, тобто динаміка ефектів тапсигаргіну не відрізняється в ізольованих інтактних і пермеабілізованих клітинах.

Функціонування підщелепної слинної залози знаходиться в основному під парасимпатичним нервовим контролем, який реалізується за допомогою природного медіатора – АХ. Останній активує мускаринові рецептори M_1 і M_3 , які є єдиними АХ-чутливими рецепторами, виявленими у

мембрані клітин підщелепної слинної залози [34]. Активація цих рецепторів призводить до підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ через утворення IP_3 і наступного вивільнення Ca^{2+} за допомогою активації IP_3 -рецепторів EP, які чутливі також до тапсигаргіну [19]. Таким чином, метою наступної серії експериментів було з'ясувати, чи є одне й те саме внутрішньоклітинне депо кальцію мішенню дії тапсигаргіну і АХ. Для цього ми досліджували зміни сумарного вмісту кальцію у інтактних і пермеабілізованих ацинарних клітинах за умов їх стимуляції АХ за наявності тапсигаргіну та без нього.

При дослідженні часової динаміки ефектів АХ з'ясувалося, що інкубація інтактних ацинарних клітин у кальційвмісному зовнішньоклітинному середовищі, яке містило АХ (5 мкмоль/л), супроводжувалася достовірним підвищенням у них сумарного вмісту кальцію. Зокрема, після 1, 5, 10, 20 та 30 хв інкубації клітин за наявності АХ сумарний вміст кальцію збільшувався на 19 ± 7 , 41 ± 9 , 42 ± 8 , 27 ± 8 та $25 \% \pm 5 \%$ відповідно ($P < 0,05$; $n = 6$) порівняно з контролем (рис. 2,а). Навпаки,

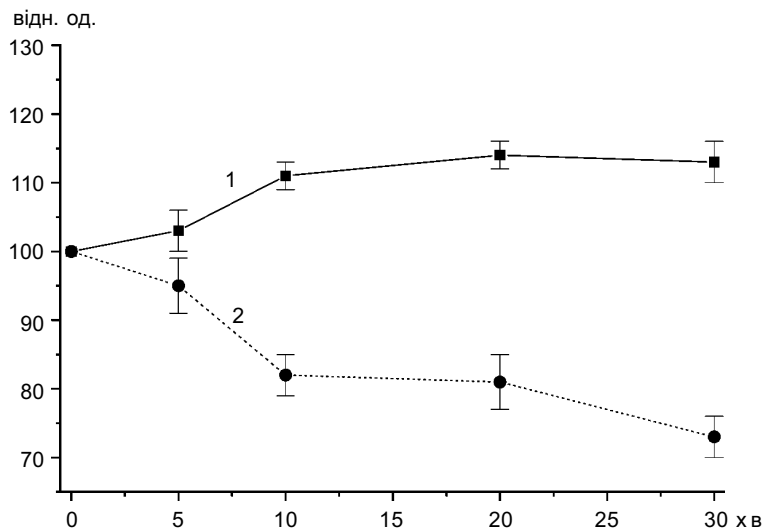


Рис. 2. Залежність сумарного вмісту кальцію у інтактних ацинарних клітинах слинних залоз від тривалості їх інкубування з ацетилхоліном: 1 – кальційвмісний розчин, 2 – безкальцієвий розчин, що містив 0,2 ммоль/л ЕГТА. За віссю ординат – нормалізований до моменту початку вимірювання вміст кальцію, за віссю абсцис – тривалість інкубування клітин з тапсигаргіном

інкубація інтактних ацинарних клітин з АХ у безкальцієвому зовнішньоклітинному середовищі призводила до зменшення в них сумарного вмісту кальцію. Так, після 1, 5, 10, 20 та 30 хв інкубації клітин з АХ цей показник зменшувався на 12 ± 4 , 17 ± 4 , 36 ± 8 , 30 ± 6 та $34 \% \pm 7 \%$ відповідно ($P < 0,05$; $n = 6$, див.рис. 2,а). Таким чином, нами показано, що максимальний ефект АХ на сумарний вміст кальцію в ацинарних клітинах досягається вже на 10-й хвилині інкубації, тому для вивчення механізму його дії в наступних серіях експериментів ми використовували саме таку інкубацію клітин.

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про те, що АХ і тапсигаргін викликають подібні зміни сумарного вмісту кальцію у клітинах, а саме: збільшення значення показника за умов інкубації клітин у кальційвмісному та зменшення – у безкальцієвому середовищах інкубації.

Додавання АХ після преінкубації пермеабілізованих клітин з тапсигаргіном і подальше інкубування їх з агоністом протягом 10 хв призводило до подальшого зменшення сумарного вмісту кальцію ще на $38 \% \pm 7 \%$ ($P < 0,01$; $n = 9$). Таким чином, нами виявлено адитивний ефект цих речовин на вивільнення Ca^{2+} із депо ER , який в сумі був на $78 \% \pm 9 \%$ нижчим від контролю ($P < 0,001$, $n = 9$, див. рис. 2,б). Крім того, при додаванні гепарину (300 мкг/мл), специфічного блокатора IP_3 -чутливих каналів мембрани ER , до НДВ-розчину повністю елімінувався адитивний ефект АХ на сумарний вміст кальцію у пермеабілізованих клітинах ($n = 9$; рис. 3). На основі цих результатів ми припускаємо, що тапсигаргін не повністю спустошує IP_3 -чутливе внутрішньоклітинне депо Ca^{2+} ER у досліджуваних клітинах.

У наступній серії експериментів з використанням високоафінного кальцієвого індикатора fura 2/AM нами показано, що у інтактних ацинарних клітинах додавання

тапсигаргіну до кальційвмісного розчину призводило до поступового збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яке сягало максимального рівня на 20-й хвилині дії блокатора (що узгоджується з динамікою дії тапсигаргіну, виявленою нами при вимірюванні сумарного вмісту кальцію). Зокрема, після 5, 10 та 20 хв дії тапсигаргіну збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ становило в середньому 89 ± 16 , 110 ± 13 та 112 нмоль/л ± 11 нмоль/л ($n = 8$) відповідно (рис.4,а). Додавання АХ на фоні тапсигаргіну призводило до подальшого транзйентного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, причому перша аплікація АХ супроводжувалася вираженим підвищенням цього показника, друга – значно меншим (див. рис. 4,а), а третя – не викликала подальших його змін (результати не представлено). Амплітуда першого, викликаного АХ, кальцієвого транзйента становила в середньому 78 нмоль/л ± 8 нмоль/л, другого – 30 нмоль/л ± 5 нмоль/л ($n = 8$). В безкальцієвому середовищі (як і в експериментах з визначення сумарного вмісту кальцію) нами було виявлено зовсім інший характер

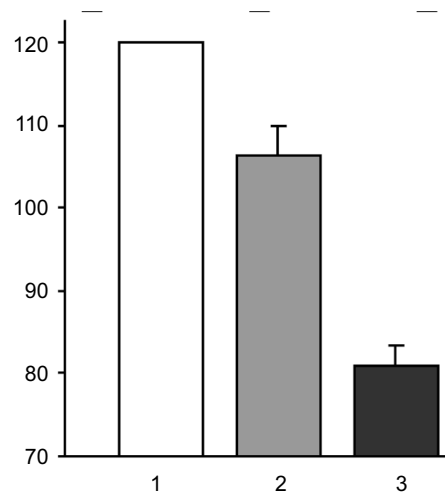


Рис. 3. Зміни сумарного вмісту кальцію у пермеабілізованих ацинарних клітинах за умов їх інкубації у безкальцієвому розчині, наближеному до внутрішньоклітинного: 1 – контроль, 2 – 20-хвилинне преінкубування з 0,1 мкмоль/л тапсигаргіну, 3 – інкубування з наступним додаванням 5 мкмоль/л ацетилхоліну

змін $[Ca^{2+}]_i$ при дії тапсигаргіну. Так, тапсигаргін за умов безкальцієвого середовища викликав підвищення $[Ca^{2+}]_i$ значно меншої амплітуди, яке мало транзйентний характер (див. рис. 4,б). За даних умов амплітуда викликаного тапсигаргіном кальцієвого транзйента становила в середньому 51 нмоль/л ± 14 нмоль/л ($n = 6$; див. рис. 4,в). Додавання АХ на фоні тапсигаргіну у безкальцієвому середовищі призводило лише до незначного транзйентного підвищення $[Ca^{2+}]_i$, амплітуда якого становила в середньому 16 нмоль/л ± 3 нмоль/л

($n = 6$, див. рис. 4,б). Більша амплітуда та інший характер часової залежності ефектів тапсигаргіну у кальційвмісному середовищі свідчить про активацію за даних умов депокерованого входу Ca^{2+} у клітини, що підтверджує одержані нами результати при дослідженні зміни сумарного вмісту кальцію. Наявність підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на дію АХ після додавання тапсигаргіну підтверджує висловлену нами гіпотезу про неповне спустошення ним IP_3 -залежного кальцієвого депо ЕР. А виражене зменшення амплітуди кальцієвого тран-

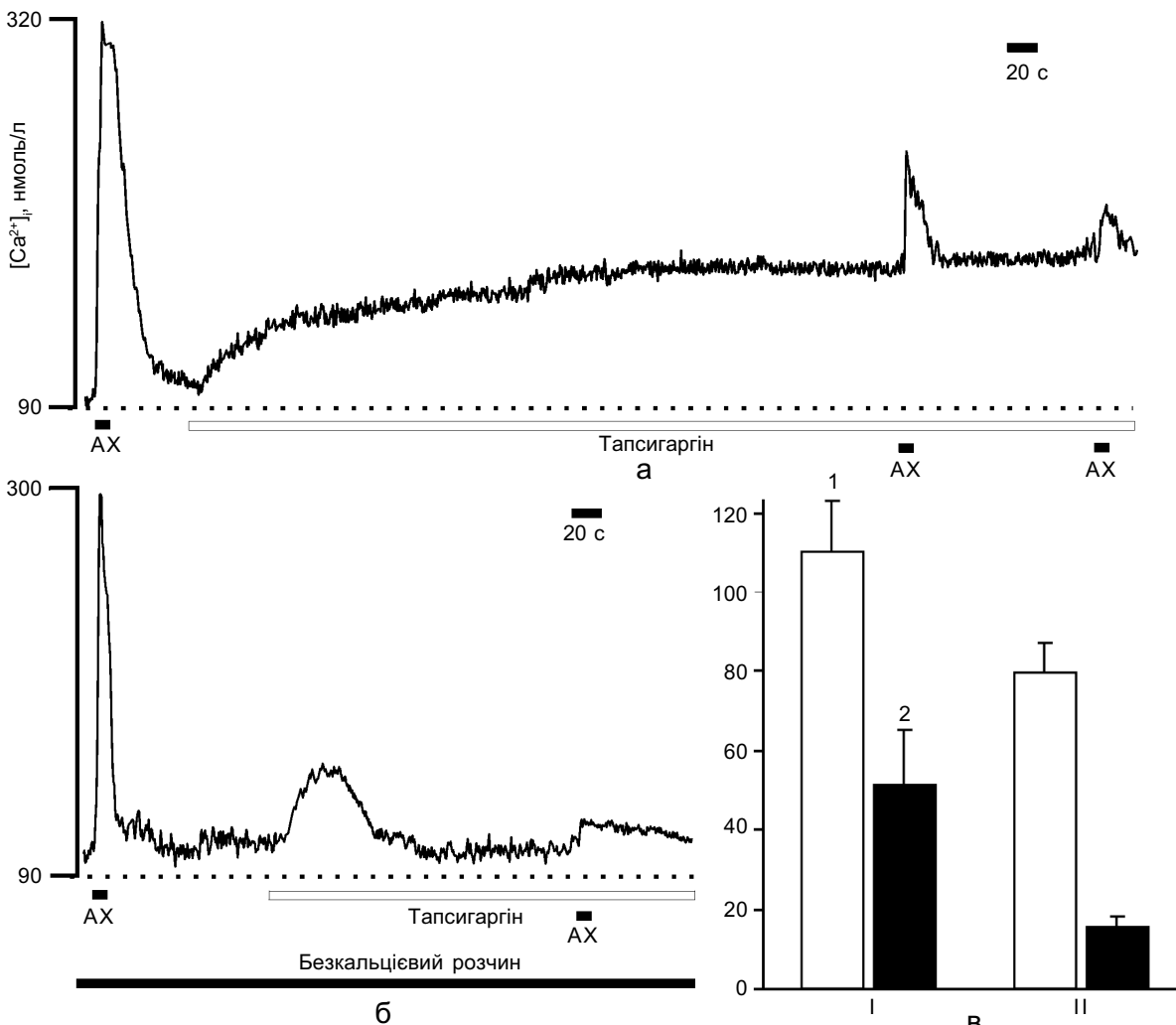


Рис. 4. Ефект тапсигаргіну на ацетилхолініндуковані кальцієві транзйенти в кальційвмісному (а) та безкальцієвому (б) зовнішньоклітинному розчині; в – середні значення амплітуди змін $[Ca^{2+}]_i$, викликані тапсигаргіном (I) та ацетилхоліном (II) у кальційвмісному (1) і безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині (2)

зиента у разі повторної аплікації АХ за наявності тапсигаргіну в кальційвмісному середовищі зумовлене відсутністю перезавповнення Ca^{2+} -депо ЕР внаслідок блокування Ca^{2+} -АТФази ЕР. Слід зазначити, що третя аплікація АХ на фоні дії тапсигаргіну не викликала підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Таким чином, з одержаних нами результатів можна зробити висновок про те, що в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів вміст кальцію, який вивільняється при блокуванні Ca^{2+} -АТФази ЕР, становить близько 30 % від загального вмісту кальцію у депо ЕР. Ми показали, що блокування Ca^{2+} -АТФази ЕР тапсигаргіном, а також спустошення депо Ca^{2+} при дії АХ призводило до активації депокерованого входу Ca^{2+} ззовні, що супроводжувалося підвищенням сумарного вмісту кальцію у клітинах приблизно на 14 %. Крім того, в пермеабілізованих клітинах після їх преінкубації з тапсигаргіном АХ призводив до подальшого зменшення в них цього показника приблизно на 38 %. Водночас в інтактних клітинах останнє супроводжувалося генерацією кальцієвих транзєнтів, амплітуда яких ступенево зменшувалась. Отже, АХ здатний викликати додаткове вивільнення Ca^{2+} із тапсигаргїннечутливого внутрішньоклітинного депо, яке є IP_3 -чутливим, оскільки повністю блокувалося гепарином. Існує два можливих пояснення цього явища: або тапсигаргїн не повністю спустошує IP_3 -чутливе внутрішньоклітинне кальцієве депо ЕР, або у досліджуваних клітинах IP_3 -чутливе кальцієве депо розташоване і в інших тапсигаргїннечутливих депо.

Функціонування додаткових, крім ЕР, кальцієвих депо в ацинарних клітинах виглядає фізіологічно доцільним, оскільки Ca^{2+} , локалізований в апараті Гольджі чи інших субклітинних компонентах секреторного шляху (як секреторні гранули), так само, як і люменальний Ca^{2+} ЕР, є необхідним для повноцінного перебігу процесів трансляції, транслокації та процесінгу

секреторних білків [6]. Показано, що роль тапсигаргїннечутливих депо Ca^{2+} виконує апарат Гольджі [24, 25] та секреторні гранули [19]. Проте кальцієве депо, розташоване всередині везикул, не є IP_3 -чутливим і, найбільш ймовірно, не відіграє фізіологічної ролі у генерації агонїстїндукованих кальцієвих сигналів у клітинах слинних залоз [36, 37]. З іншого боку, в мембрані апарату Гольджі локалізовані IP_3 -рецептори [24, 31] та експресується специфічна тапсигаргїннечутлива Ca^{2+} -АТФаза [3]. Більш того, функціонування апарату Гольджі як агонїстчутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо доведено в клітинах HeLa [24] та LLC-PK1 лінії епітелїальних ниркових клітин [38].

Таким чином, хоча відомостей про роль апарату Гольджі в агонїстїндукованих змінах внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози немає, проте ми припускаємо, що джерелом тапсигаргїннечутливого додаткового вивільнення Ca^{2+} при дії АХ може бути саме ця органела. Отже, в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози щурів функціонують тапсигаргїнчутлива та тапсигаргїннечутлива частини IP_3 -залежного внутрішньоклітинного кальцієвого депо.

Робота виконана за підтримки Західноукраїнського фонду біомедичних досліджень та гранту JDRF grant № 1-2004-30.

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

THAPSIGARGIN-SENSITIVE AND INSENSITIVE INTRACELLULAR Ca^{2+} STORES IN RAT SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND ACINAR CELLS

Acinar cells of rat submandibular salivary gland are characterized by heterogeneity of intracellular Ca^{2+} stores. In the present work we have studied this heterogeneity using Arsenazo III dye to measure a cellular total calcium content and Fura-2/AM, to determine free cytosolic calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). We have found that the amount of Ca^{2+} released by inhibition of Ca^{2+} ATPase of the ER with

thapsigargin comprises ~ 30% of total ER calcium. This result was obtained in experiments on both intact and permeabilized acinar cells. We have also shown that both Ca²⁺ ATPase inhibition with thapsigargin and emptying the stores with acetylcholine (ACh) led to activation of store-operated Ca²⁺ influx (an increase in total calcium content of ~ 14%). In permeabilized cells application of ACh after preincubation with thapsigargin led to a further decrease in total cellular calcium content (~ 38%). At the same time in intact cells it resulted in generation of [Ca²⁺]_i transients with gradually decreasing amplitudes. Thus, ACh is capable of producing an additional release of Ca²⁺ from thapsigargin-insensitive stores. This additional release is IP₃-dependent since it was completely blocked by heparin. We conclude that in acinar cells of rat submandibular gland thapsigargin-sensitive and thapsigargin-insensitive Ca²⁺ stores could exist.

Ivan Franko National University of Lviv

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Копач О.В., Кругликов І.А., Войтенко Н.В. та ін. Пермеабілізовані клітини слинних залоз, як модель для вивчення кальційтранспортних систем мембрани ендоплазматичного ретикулума // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 5. – P. 31–42.
2. Ambudkar I.S. Regulation of calcium in salivary gland secretion // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* – 2000. – **11**, № 1. – P. 4–25.
3. Antebi A., Fink G.R. The yeast Ca⁽²⁺⁾-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution // *Mol. Biol. Cell.* – 1992. – **3**, № 6. – P. 633–654.
4. Berridge M. Second messenger dualism in neuro-modulation and memory // *Nature.* – 1986. – **323**. – P. 294–295.
5. Bird G.S., Putney J.W.J. Effect of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate on inositol trisphosphate-activated Ca²⁺ signaling in mouse lacrimal acinar cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, № 12. – P. 6766–6770.
6. Corbett E.F., Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? // *Trends. Biochem. Sci.* – 2000. – **25**, № 7. – P. 307–311.
7. Fedirko N., Kopach O., Kruglikov I. et al. Imaging of intracellular calcium concentration in permeabilized cells // *Neurophysiology.* – 2003. – **35**, № 3/4. – P. 345–346.
8. Gerasimenko J.V., Maruyama Y., Yano K. et al. NAADP mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors // *J. Cell Biol.* – 2003. – **163**, № 2. – P. 271–282.
9. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V. et al. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope // *Cell.* – 1995. – **80**, № 3. – P. 439–444.
10. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, № 6. – P. 3440–3450.
11. He X.J., Wu X.Z., Wellner R.B. et al. Muscarinic receptor regulation of Ca²⁺ mobilization in a human salivary cell line // *Pflug. Arch.* – 1989. – **413**, № 5. – P. 505–510.
12. Hofer A.M., Curci S., Machen T.E. et al. ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores // *FASEB J.* – 1996. – **10**, № 2. – P. 302–308.
13. Hurley T.W., Brinck R.W. Differential regulation of agonist-stimulated Ca²⁺ influx in acini of rat pancreas and submandibular gland // *Arch. Oral Biol.* – 1992. – **37**. – P. 763–769.
14. Kobayashi S., Kitazawa T., Somlyo A.V. et al. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, № 30. – P. 17997–18004.
15. Kraus-Friedmann N. Calcium sequestration in the liver // *Cell Calcium.* – 1990. – **11**, № 10. – P. 625–640.
16. Liu X.B., Sun X., Mork A.C. et al. Characterization of the calcium signaling system in the submandibular cell line SMG-C6 // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 2000. – **225**, № 3. – P. 211–220.
17. Marmary Y., He X.J., Hand A.R. et al. Beta-adrenergic responsiveness in a human submandibular tumor cell line (A253) // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1989. – **25**. – P. 951–958.
18. Martinez J.R., Camden J., Barker S. Effects of acetylcholine and monensin on 22Na uptake and cytosolic Ca²⁺ in rat submandibular salivary cells // *Arch. Oral Biol.* – 1990. – **35**, № 5. – P. 359–364.
19. Martinez J.R., Willis S., Puente S. et al. Evidence for a Ca²⁺ pool associated with secretory granules in rat submandibular acinar cells // *Biochem. J.* – 1996. – **320**, № 2. – P. 627–634.
20. 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.
21. Nakagaki I., Sasaki S., Shiguma M. et al. Distribution of elements in the pancreatic exocrine cells determined by electron probe X-ray microanalysis // *Pflugers Arch.* – 1984. – **401**, № 4. – P. 340–345.
22. Nakamura T., Matsui M., Uchida K. et al. M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice // *J. Physiol.* – 2004. – **558**, № 2. – P. 561–575.
23. Nezu A., Tanimura A., Morita T. et al. Evidence that zymogen granules do not function as an intracellular Ca²⁺ store for the generation of the Ca²⁺ signal in rat parotid acinar cells // *Biochem. J.* – 2002. – **363**, № 1. – P. 59–66.

24. Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum // *EMBO J.* – 1998. – **17**, № 18. – P. 5298–5308.
25. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P. et al. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // *Physiol. Rev.* – 1994. – **74**, № 3. – P. 595–636.
26. Putney J.W.J. A model for receptor-regulated calcium entry // *Cell Calcium.* – 1986. – **7**, № 1. – P. 1–12.
27. Seagrave J.C., Barker S., Martinez A.M. et al. Muscarinic signaling pathway in submandibular cells of adult and early postnatal rats // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1993. – **203**, № 4. – P. 490–500.
28. Shuttleworth T.J. Receptor-activated calcium entry channels - who does what, and when? // *Sci. STKE.* – 2004, № 243. – P. 40.
29. 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.
30. Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J. et al. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate // *Nature.* – 1983. – **306**. – P. 67–69.
31. Surroca A., Wolff D. Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles // *J. Membr. Biol.* – 2000. – **177**, № 3. – P. 243–249.
32. Tanimura A., Nezu A., Tojyo Y. et al. Isoproterenol potentiates alpha-adrenergic and muscarinic receptor-mediated Ca^{2+} response in rat parotid cells // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **276**, № 6. – P. 1282–1287.
33. 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.
34. Yamamoto H., Sims N.E., Macauley S.P. et al. Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1996. – **78**, № 3. – P. 245–255.
35. Yu J.H. The influence of varying the electrical frequency of sympathetic nerve stimulation on fluid and calcium secretion of the rat parotid salivary gland. // *Arch. Oral Biol.* – 1990. – **35**, № 8. – P. 639–643.
36. Yule D.I., Ernst S.A., Ohnishi H. et al. Evidence that zymogen granules are not a physiologically relevant calcium pool. Defining the distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pancreatic acinar cells // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, № 14. – P. 9093 – 9098.
37. Lee M.G., Xu X., Zeng W., Diaz J., Wojcikiewicz R.J.H., Kuo T.H., Wuytack F., Raeymaekers L. and Muallem S. Polarized expression of Ca^{2+} channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waves // *Ibid.* – № 25. – P. 15765–15770.
38. Zha X., Chandra S., Ridsdale A.J. et al. Golgi apparatus is involved in intracellular Ca^{2+} regulation in epithelial LLC-PK1 cells // *Amer. J. Physiol.* – 1995. – **268**, № 5. – P. 1133–1140.
39. Zhang G.H., Martinez J.R. Effects of forskolin, dibutyryl cAMP and H89 on Ca^{2+} mobilization in submandibular salivary cells of newborn rats // *Arch. Oral Biol.* – 1999. – **44**, № 9. – P. 735–744.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 07.11.2004*