

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

Пермеабілізовані клітини слинних залоз як модель для вивчення кальційтранспортних систем мембрани ендоплазматичного ретикулума

*Разработана методика получения химически пермеабиллизированных ацинарных клеток подчелюстной слюнной железы крыс. Установлено, что эффекты использованного для пермеабиллизации дигитонина на содержание общего кальция в пермеабиллизированных клетках и белка в инкубационной среде находятся в прямой зависимости от концентрации детергента и времени его действия. Показано, что пермеабиллизированные дигитонином ацинарные клетки осуществляют кальцийзависимую секрецию общего белка, уровень которой зависит от времени инкубации клеток. Биохимическими методами, а также с помощью мониторинга концентрации Ca^{2+} во внутриклеточных структурах с использованием красителя *tag-figa 2* показано способность пермеабиллизированных клеток к тапсигаргинингибируемому АТФ-зависимому накоплению Ca^{2+} во внутриклеточных депо. Кроме того, установлено наличие в пермеабиллизированных клетках слюнных желез тапсигаргининчувствительных депо Ca^{2+} . Таким образом, пермеабиллизированные дигитонином секреторные клетки слюнных желез крыс являются адекватной моделью для изучения механизмов кальцийзависимой регуляции экзоцитоза и кальцийтранспортных систем мембран внутриклеточных депо кальция.*

ВСТУП

Регулювання основної функції екзокринних секреторних клітин – екзоцитозу травних ферментів – забезпечується змінами концентрації іонізованого кальцію у цитоплазмі. Відомо [18], що дія гормонів чи медіаторів на мембрану секреторних клітин, у першу чергу, призводить до активації вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, зокрема з ендоплазматичного ретикулума (ЕПР). Показано, що за фізіологічних умов інтралюменальна концентрація Ca^{2+} в ЕПР ($[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$) секреторних клітин складає сотні мікромоль на 1 л (зокрема у клітинах підшлункової залози близько 150 мкмоль/л [19], гепатоцитах – 630 мкмоль/л [3], гонадотрофах – 60 – 200 мкмоль/л [29]), тоді як у цитоп-

лазмі концентрація вільного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) є на три порядки нижчою (наприклад у клітинах підщелепної слинної залози близько 100 нмоль/л [5]). Підтримання відносно високої $[Ca^{2+}]_{\text{ЕПР}}$ є необхідною умовою для перебігу внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, здійснення фізіологічних функцій і залежить від функціонування енергозалежної кальцієвої помпи ЕПР (SERCA). Після кожного підвищення $[Ca^{2+}]_i$, іони кальцію з цитозолу або викачуються назовні, або знову повертаються у ЕПР, перенаповнюючи його через роботу SERCA. Порушення внутрішньоретикулярного кальцієвого гомеостазу призводить до “ЕПР-стресу” та змін функціонування цілої клітини [17]. За умов стресу порушується формування четвер-

тинної структури новосинтезованих білкових молекул, що призводить до накопичення “неповноцінних” білків у цистернах ЕПР і загибелі клітин [17].

Механізми підтримання $[Ca^{2+}]_{EPR}$ і регуляції екзоцитозу в клітинах слинних залоз вивчено недостатньо, оскільки доступ більшості речовин до внутрішньоклітинних органел і секреторного апарату ізольованих клітин затруднений. Для забезпечення доступу до внутрішньоклітинних структур використовують різні методичні підходи. Метод фіксації потенціалу на ділянці мембрани “patch clamp” дозволяє вивчати мембранні кальційтранспортні системи та процеси екзоцитозу за допомогою реєстрації змін ємності мембрани, проте його застосування обмежується однією клітиною і загалом не дає змоги змінювати склад внутрішньоклітинного середовища. Одержання ж клітинних гомогенатів спряжене з порушенням структурної інтеграції внутрішньоклітинних функціональних блоків і руйнуванням органел, необхідних для здійснення фізіологічних функцій.

Проводити вивчення процесів всередині клітин дає змогу їх пермеабілізація, яка забезпечує доступ до внутрішньоклітинних органел. Найчастіше з цією метою використовують електропермеабілізацію, пермеабілізацію з використанням таких неіонних детергентів, як сапонін чи дигітонін, або порофомувальні токсини (α -токсин чи стрептолізин О). Електропермеабілізація чи α -токсин формують у мембрані пори невеликих розмірів (у середньому одиниці нанометрів [13]), тоді як дигітонін, сапонін і стрептолізин О деструктуризують плазматичну мембрану, утворюючи в ній отвори, проникні для молекул великих розмірів, наприклад ферментів чи імуноглобулінів [23].

Дигітонін селективно пермеабілізує мембранні структури з високим вмістом холестеролу [16], що дає змогу викорис-

товувати його для селективного порушення цілісності плазматичної мембрани багатьох типів клітин. При цьому він за відповідних умов не змінює структуру та функції кальційсеквеструвальних органел, зокрема ЕПР і мітохондрії, мембрана яких характеризується відносно низьким вмістом холестеролу. Завдяки цим його властивостям обробку клітин дигітоніном використовують для вивчення кальцієвого гомеостазу у внутрішньоклітинних органелах і кальційзалежного екзоцитозу. Так, кальційрегульований екзоцитоз вивчають на пермеабілізованих хромафінних клітинах [21], клітинах молочних залоз [11] та гіпофіза [15].

Для дослідження функціонування внутрішньоклітинних кальцієвих депо у пермеабілізованих клітинах використовують метод флуоресцентної мікроскопії, застосовуючи низькоафінні кальцієві індикатори: mag-fura 2, fura 2FF, BTC, Rhod 2, Rhodamine 123 тощо [12]. Такі дослідження проведено на пермеабілізованих нейронах периферичної нервової системи [25], гепатоцитах [27], панкреацитах [30], клітинах кришталика ока [4], епітеліальних клітинах шлунка [10], клітинах легень [33]. Однак слід зазначити, що відомостей стосовно методичного підходу для дослідження внутрішньоклітинних кальційзалежних механізмів регулювання екзоцитозу та розподілу Ca^{2+} в клітинах слинних залоз ссавців немає, що і зумовило мету цієї роботи.

МЕТОДИКА

Ізолювання ацинусів підщелепної слинної залози щурів. Експерименти проводили на ізольованих 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, який містив колагеназу (тип I, 320 mU/mg),

протягом 30 хв при 35°C [32]. Базовий зовнішньоклітинний розчин складався (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, гідроксietилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота (HEPES) – 10, глюкоза – 10; рН 7,4.

Хімічна пермеабілізація ацинарних клітин. Для порушення цілісності плазматичної мембрани та одержання скінованих (пермеабілізованих) секреторних клітин підщелепної слинної залози щурів використовували неіонний детергент дигітонін. Останній 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 в даному розчині, розрахована за допомогою програми “WinMAXC v2.10, Chris Patton, Stanford University”, становила близько 300 нмоль/л. Інкубація з дигітоніном тривала 2,5 хв у всіх експериментах за винятком окремо згадуваних. Після завершення інкубації з дигітоніном клітини швидко осаджували центрифугуванням (5 с, 150 g) та промивали від детергента за допомогою розчину НДВ. Пермеабілізацію клітин ізольованих ацинусів контролювали візуально з використанням трипанового синього (0,4 %) під біокулярним світловим мікроскопом МР–3 [27].

Вимірювання вмісту внутрішньоклітинного Ca²⁺ та секретії. По закінченні інкубації ацинарних клітин вміст пробірок відцентрифугували (5 хв, 1500 g). Осад гомогенізували після додавання до нього бідистильованої води та одержаний гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 1500 g. Вміст Ca²⁺ у тканині ізольованих ацинарних клітин визначали спектрофотометрично з використанням металохромного барвника арсеназо ІІІ. Інтенсивність поглинання комплексу кальцій-арсеназо вимірювали при довжині хвилі 650 нм. Секретію загального білка вира-

жали у відсотках від сумарного вмісту білка у гомогенаті та інкубаті ацинусів після віднімання значення такого самого показника без інкубації. Вміст білка визначали за методом Лоурі.

Вимірювання концентрації внутрішньоклітинного іонізованого кальцію ([Ca²⁺]_i). Ацинарні клітини забарвлювали з використанням мембранно-проникної форми барвника 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 “Axio-lab”, (“Zeiss”, Німеччина). За клітинами спостерігали за допомогою довгофокусного, водоімерсійного об’єктива (63x, Ч.А. 0,9). Для збудження флуоресценції, зафарбовані fura 2/AM ацинарні клітини почергово опромінювали світлом довжиною хвиль 360±5 та 390 нм ± 5 нм. Флуоресцентний сигнал реєструвався на довжині хвилі 510 нм ± 10 нм. Сигнали, які відповідають двом довжинам хвиль збудження, реєстрували за допомогою ІВМ-сумісного комп’ютера з програмно-апаратним комплексом Tida (“Batelle”, Німеччина). Вміст вільного цитоплазматичного кальцію в ацинарних секреторних клітинах розраховували за формулою Грінкевича [8].

Моніторинг концентрації кальцію в ЕПР пермеабілізованих секреторних клітин ([Ca²⁺]_{ЕПР}). Ацинарні клітини забарвлювали у зовнішньоклітинному розчині Тіроде з використанням мембранно-проникної форми барвника mag-fura 2/AM (6 мкмоль/л) за наявності детергента pluronic F-127 (0,02 %) протягом 60 хв при 37°C. Такі умови забезпечують компартименталізацію барвника у внутрішньоклітинних органелах [9]. Після цього клітини двічі промивали, 20 хв інкубували у зовнішньоклітинному розчині для повної деетерифікації барвника та переносили на покривні скельця, які поміща-

ли в перфузовану експериментальну камеру. Візуалізацію внутрішньоретикулярної концентрації кальцію здійснювали за аналогічних умов та обладнання, які застосовували для барвника fura 2. Пермеабілізацію клітин здійснювали у НДВ розчині, який містив дигітонін (20 мкг/мл) та не містив АТФ. Всі експерименти проводили щонайменше тричі, проте у більшості випадків їх кількість була більше п'яти.

Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакету Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій групі експериментів ми досліджували залежність вмісту білка у середовищі інкубування клітин (як інтегрального показника секреції) від концентрації детергента дигітоніну та часу інкубації ацинарних клітин з ним (рис. 1, 2).

Як видно з рис.1, за умов інкубування ацинарних клітин у середовищі, яке містило дигітонін, спостерігалися концентраційнозалежні зміни вмісту загального білка у середовищі інкубації. Зокрема, вже при дії дигітоніну у концентрації 20 мкг/мл вміст білка у середовищі інкубації незначно, проте статистично достовірно, перевищував контрольне значення в середньому на $10,2 \% \pm 1,3 \%$ ($n = 7$; $P < 0,05$) і при концентрації детергента 50 і 80 мкг/мл надалі не збільшувався. Наступний етап підвищення вмісту білка в середовищі спостерігався при концентрації дигітоніну 100 мкг/мл (до $17,1 \% \pm 2,1 \%$, $n = 7$; $P < 0,01$) і відсоток збільшення надалі достовірно не змінювався за наявності 150 та 200 мкг/мл детергента.

Нами також показано, що без наявності АТФ у розчині НДВ залежність вмісту загального білка у середовищі від концентрації дигітоніну достовірно не зміню-

валася порівняно з його ефектами у АТФ-вмісному розчині (див. рис. 1). Водночас, після преінкубації інтактних ацинарних клітин з тапсигаргіном (1 мкмоль/л), дигітонін у малих (20 – 80 мкг/мл) концентраціях не викликав достовірного підвищення вмісту білка у середовищі інкубації, тоді як у високих (100 – 200 мкг/мл) викликані ним зміни були ідентичними до його ефектів у розчині НДВ (див.рис. 1).

Таким чином, підвищений порівняно з контролем вміст білка в середовищі внаслідок інкубування клітин з дигітоніном у низьких концентраціях викликаний, на нашу думку, порушенням цілісності плазматичної мембрани та вивільненням вмісту секреторних гранул і/або білків цитозолу у зовнішньоклітинний простір. На користь того, що пермеабілізація секреторних клітин викликає вивільнення вмісту секреторних гранул, а не білків цитозолу, стали результати, одержані з використанням тапсигаргіну. Відомо, що його дія на секреторні клітини призводить до вивільнення Ca^{2+} з депо ЕПР у цитоплазму [1, 14] та активації внаслідок цього секреції [2]. Враховуючи це, відсутність підвищення секреції після преінкубації інтактних клітин з тапсигаргіном зумовлена, найбільш вірогідно, спустошенням при цьому запасу секреторних везикул. Підвищення рівня секреції пролактину та протеоглікану внаслідок дії дигітоніну показано для клітин гіпофіза [15]. Аналогічні дані були одержані при дослідженні секреції норадреналіну дигітонін-пермеабілізованими PC12 клітинами [22]. Підтвердження того, що вивільнення секреторних продуктів пермеабілізованими клітинами відбувається за допомогою екзоцитозу, були одержані на електронно-мікроскопічному рівні з використанням антигенів до мембрани хромафінних гранул, які вводили в плазматичну мембрану після стимуляції клітин [22]. Тому, на думку авторів [22], пермеабілізація клітин

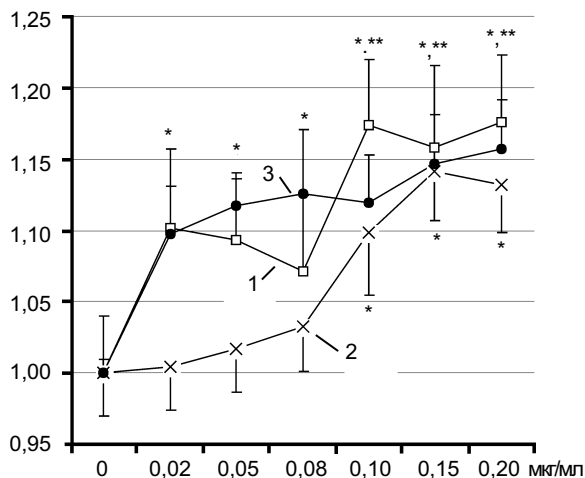


Рис. 1. Зміни вмісту загального білка у середовищі інкубування (як інтегрального показника секреції) ацинарних клітин підшлелепної слинної залози щурів внаслідок дії дигітоніну у різних концентраціях. За віссю ординат - нормалізований до контролю вміст білка у пермеабілізованих клітинах слинних залоз; за віссю абсцис - концентрація дигітоніну: 1 – інкубування клітин у розчині, наближеному до внутрішньоклітинного, що містив 3 ммоль/л АТФ; 2 – преінкубація протягом 20 хв з 1 мкмоль/л тапсигаргіну; 3 – інкубування клітин у розчині, який не містив АТФ.* P < 0,05 порівняно з контролем, ** P < 0,05 порівняно з ефектами 20 мкг/мл дигітоніну

дигітоніном є адекватною моделлю для *in vitro* досліджень кальційзалежного екзоцитозу, а також забезпечує збереження ультраструктури та функції внутрішньоклітинних органел.

Наступне збільшення вмісту білка у середовищі інкубування ацинарних клітин виникає при подальшому підвищенні концентрації дигітоніну до 100 – 200 мкг/мл і зумовлене, вірогідно, порушенням цілісності мембрани внутрішньоклітинних органел і вивільненням розташованих у них білкових молекул. Підтвердженням є той факт, що в цьому діапазоні концентрацій дигітонін викликає підвищення вмісту білка у середовищі інкубації навіть після спустошення цитоплазматичного пулу тапсигаргіном.

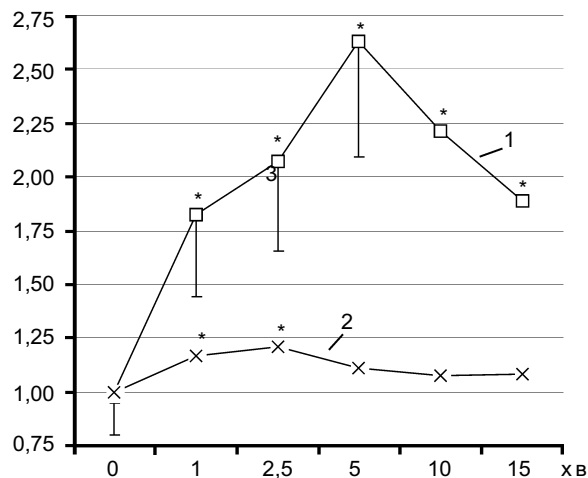


Рис. 2. Залежність сумарного вмісту кальцію у секреторних клітинах слинних залоз і вмісту білка у середовищі їх інкубування від тривалості дії дигітоніну. За віссю ординат - нормалізований до початкового моменту часу вміст кальцію (1) та вміст білка у середовищі (2), за віссю абсцис – тривалість інкубування ацинарних клітин з дигітоніном. * P < 0,05 порівняно з початком вимірювання

Таким чином, нами встановлено, що найменш інвазивною для ацинарних клітин слинної залози, проте здатною пермеабілізувати їх та викликати достовірне посилення секреції білка, є концентрація дигітоніну 20 мкг/мл. Враховуючи це, ми провели дослідження залежності ефектів дигітоніну такої концентрації від часу (їх динаміки) на вміст загального білка у середовищі інкубування ацинарних клітин. Зокрема показано (див. рис. 2), що залежність вмісту білка у середовищі інкубування секреторних клітин від часу інкубування з детергентом мала “bell-shaped” форму, сягаючи максимального значення на 2,5 хв (21 % ± 0,21 %; n = 6; P < 0,001).

Згідно з даними літератури, таке сповільнення секреції при тривалій (більше ніж 5 хв) інкубації може бути викликане частковою втратою секреторними клітинами необхідних для кальційрегульованої

секреції цитоплазматичних білків. Зокрема, на пермеабілізованих дигітоніном клітинах лінії PC12 показано пригнічення кальційактивованого вивільнення катехоламінів при збільшенні часу інкубування, зумовлене втратою необхідного для екзоцитозу цитозольного фактора [20] і його відновлення при додаванні до середовища недіалізованого матеріалу [21]. Однак плазматична мембрана пермеабілізованих дигітоніном клітин містить пори, які не пропускають молекули масою понад 200 – 350 кДа, що сповільнює втрату ними цитозольного секреторного фактора [15]. Крім того, останній, найбільш імовірно, знаходиться у зв'язаному з внутрішньоклітинними ділянками стані та не вимивається з клітин при їх пермеабілізації [21].

Враховуючи кальцієву залежність процесу екзоцитозу, важливим є вивчення гомеостазу Ca^{2+} у внутрішньоклітинних структурах пермеабілізованих ацинарних клітин слинних залоз. На графіку залежності вмісту кальцію в секреторних клітинах від часу інкубації з детергентом простежуються висхідна та низхідна частини (див. рис. 2). Максимального значення вміст кальцію у пермеабілізованих ацинарних клітинах сягав після 5 хв їх інкубування з детергентом і становив $(0,23 \pm 0,4)$ мкмоль Ca^{2+} /мкг білка, що в середньому на $163\% \pm 29\%$ вище від контрольних значень ($n = 8$; $P < 0,05$). Внаслідок збільшення часу інкубації до 10 – 15 хв підвищення вмісту кальцію у клітинах стало менш вираженим. Висхідна гілка одержаної нами експериментальної кривої зумовлена, найбільш імовірно, індукованим дигітоніном порушенням бар'єрної функції плазматичної мембрани та накопиченням кальцію всередині ЕПР ацинарних клітин внаслідок роботи Ca^{2+} -АТФази. Зменшення вмісту кальцію у клітинах при більш тривалій інкубації з детергентом, як і у випадку із секрецією білка, може бути спричинене порушенням цілісності мем-

брани внутрішньоклітинних органел і втратою ними Ca^{2+} .

Встановлено, що залежність сумарного вмісту кальцію у пермеабілізованих ацинарних клітинах від концентрації дигітоніну також має "bell-shaped" форму. Зокрема, вміст кальцію в ацинарних клітинах після їх інкубування протягом 2,5 хв у середовищі без дигітоніну становив у середньому $(0,11 \pm 0,02)$ мкмоль Ca^{2+} /мкг білка ($n = 6$), а його максимальне збільшення було $124,3\% \pm 17,2\%$ ($n = 6$; $P < 0,01$; рис. 3) при концентрації дигітоніну 50 мг/мл. Інкубування пермеабілізованих клітин у середовищі, яке не містило АТФ, не супроводжувалося достовірними змінами в них вмісту Ca^{2+} при підвищенні концентрації дигітоніну (див. рис. 2). Крім того, після преінкубації клітин з тапсигаргіном (1 мкмоль/л) дія дигітоніну не призводила до збільшення вмі-

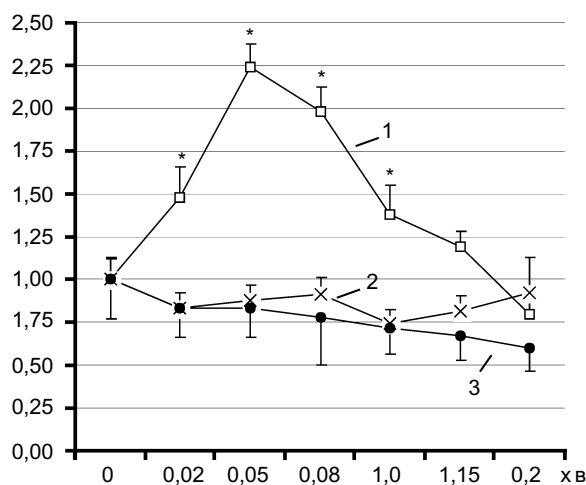


Рис. 3. Викликані дигітоніном зміни сумарного вмісту кальцію у ацинарних секреторних клітинах підщелепної слинної залози щурів. За віссю ординат - нормалізований до контролю вміст кальцію у клітинах слинних залоз, за віссю абсцис – концентрація дигітоніну: 1 – інкубування клітин протягом 2,5 хв у розчині, наближеному до внутрішньоклітинного, що містив 3 ммоль/л АТФ; 2 – преінкубація протягом 20 хв з 1 мкмоль/л тапсигаргіну; 3 – інкубування клітин у розчині, який не містив АТФ. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

ту кальцію. Одержані результати підтверджують висловлене нами припущення про роль Ca^{2+} -АТФази мембрани ЕПР у збільшенні вмісту кальцію в пермеабілізованих ацинарних клітинах і вказують на функціональну цілісність мембрани ЕПР у хімічно скінованих клітинах слинних залоз. Подібну концентраційну залежність ефектів дигітоніну було виявлено у дослідженнях, проведених на клітинах гладеньких м'язів міометрія [24].

Таким чином, нами встановлено, що короткочасна інкубація ацинарних секреторних клітин підщелепної слинної залози за наявності неіонного детергента дигітоніну призводить до достовірних змін вивільнення ними загального білка, які тісно корелюють зі змінами у них вмісту кальцію. У результаті проведених нами біохімічних експериментів було доведено, що найбільш оптимальними умовами для пермеабілізації ацинарних клітин слинних залоз є їх обробка дигітоніном у концентрації 20 мкг/мл протягом 2,5 хв. На нашу думку, за таких умов зберігається цілісність мембрани внутрішньоклітинних органел в ацинарних клітинах і водночас забезпечується доступ до внутрішнього середовища клітин. Слід зазначити, що згідно з даними літератури, для хімічної пермеабілізації клітин використовують подібні концентрації та час дії детергента: для гепатоцитів – 20 – 40 мкг/мл протягом 6 хв [27], для клітин кришталика ока – 10 – 15 мкг/мл протягом 9 хв [4], для РС12 клітини – 10 мкг/мл [22].

Проте, використовуючи біохімічні методи, можна виявити зміни тільки сумарного кальцію у клітинах (іонізованого цитоплазматичного та депонованого, а також зв'язаного із білками), тоді як у запуску секреції вирішальну роль відіграє іонізований кальцій. Тому наступним кроком наших досліджень було перевірити надійність розробленої методики пермеабілізації та провести пряму реєстрацію

змін концентрації цитозольного та депонованого кальцію у пермеабілізованих секреторних клітинах. З цією метою ми використовували високоафінний та низькоафінний кальцієві індикатори fura 2/AM та mag-fura 2/AM відповідно.

Згідно з температурою та часом зафарбовування ацинарних клітин високоафінним кальцієвим індикатором fura 2/AM, він локалізується в основному в їх цитоплазмі. Тому за умов пермеабілізації зафарбованих клітин слід очікувати зменшення інтенсивності флуоресцентного сигналу внаслідок вимивання барвника з цитоплазми. Для зафарбовування клітин барвником mag-fura 2/AM використовують вищу температуру та більш тривалий час інкубації, що забезпечує його проникнення до внутрішньоклітинних органел. Відповідно, після пермеабілізації клітин, зафарбованих mag-fura 2/AM, слід очікувати лише часткове зменшення інтенсивності флуоресценції, яке пов'язане з вимиванням цитоплазматичної частки барвника. Слід підкреслити, що в експериментах з використанням mag-fura 2/AM зміни концентрації кальцію виражали не як її абсолютні значення, а як співвідношення інтенсивності флуоресценції барвника на довжині хвилі збудження 360 нм до такої на 390 нм. Зумовлено це тим, що кількість іонів Mg^{2+} , які зв'язані з mag-fura 2/AM, невідома, що робить оцінку концентрації іонізованого кальцію потенційно неточною [10]. Однак зміни концентрації іонізованого кальцію відображаються у співвідношенні інтенсивності флуоресценції на довжині хвилі 360 нм до такої на довжині хвилі 390 нм, яке прямо пропорційно концентрації іонізованого кальцію (константа дисоціації становить 53 кмоль/л).

Нами було показано, що після зафарбовування як fura 2/AM, так і mag-fura 2/AM і до початку пермеабілізації ацинарні клітини характеризуються високою ін-

тенсивністю флуоресценції, що свідчить про ефективне зафарбовування та деаєтерифікацію індикаторів. Перед початком пермеабілізації клітини перфузували протягом 1 хв розчином НДВ з концентрацією вільного кальцію близько 300 нмоль/л, який не містить АТФ. Після інкубування ацинарних клітин протягом 2 – 5 хв у розчині НДВ без АТФ, який містив дигітонін (20 мкг/мл), відбувалося виражене зменшення інтенсивності флуоресцентного сигналу як при фарбуванні клітин fura 2/AM, так і mag-fura 2/AM на обох довжинах хвиль опромінювання (360 і 390 нм; рис. 4).

Як і очікувалось, у разі зафарбовування клітин fura 2/AM, внаслідок дії дигітоніну спостерігалось різке зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу практично до фонового рівня та вирівнювання зовнішньоклітинної та цитоплазматичної концентрації іонізованого кальцію (див. рис. 4,а). Це підтверджує попередній

висновок про те, що дигітонін у концентрації 20 мкг/мл призводить до ефективної пермеабілізації плазматичної мембрани ацинарних клітин.

У ацинарних клітинах, зафарбованих mag-fura 2/AM, аплікація дигітоніну у розчині НДВ з $[Ca^{2+}]$ близько 300 нмоль/л, який не містив АТФ, супроводжувалася вираженим зменшенням інтенсивності флуоресцентного сигналу, що становило в середньому 60 – 80 % від початкового (див. рис. 4,б). Зумовлено це, очевидно, вимиванням цитоплазматичної частки барвника із пермеабілізованих ацинарних клітин. Решта (40 – 20 %) флуоресцентного сигналу відображає свічення індикатора, розташованого всередині внутрішньоклітинних органел у секреторних клітинах. Слід відзначити, що дія дигітоніну не викликала змін $[Ca^{2+}]_{EPR}$, що свідчить про збереження цілісності мембрани ЕПР за даних умов пермеабілізації.

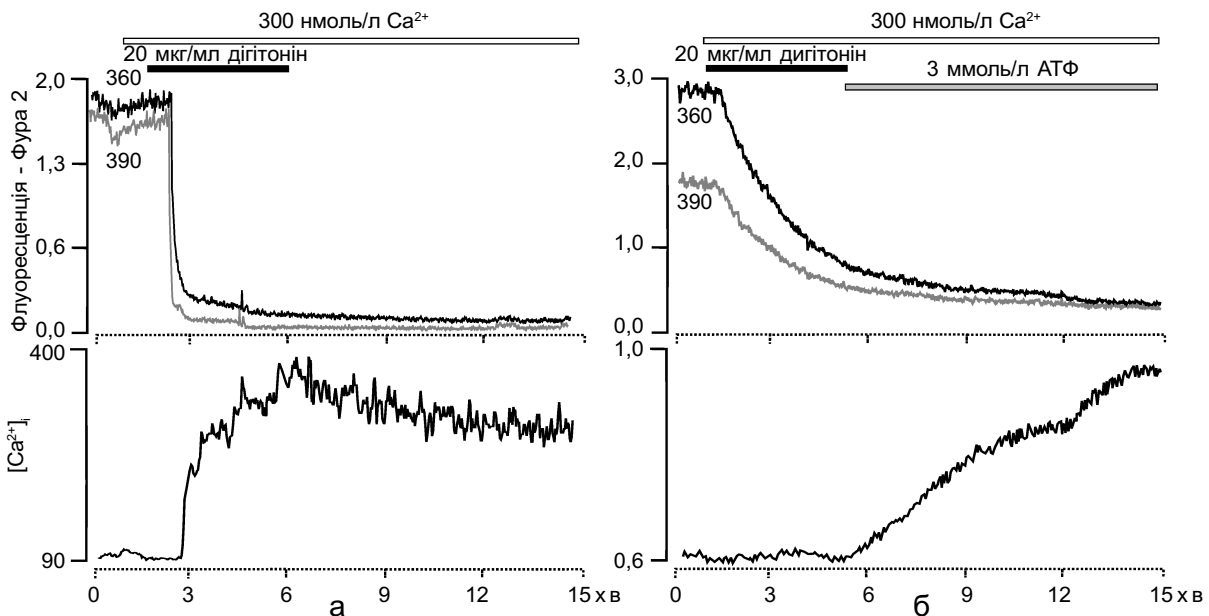


Рис. 4. Пермеабілізація ацинарних клітин слинних залоз зафарбованих fura 2/AM (а) та mag-fura 2/AM (б). На верхній частині рисунку показана інтенсивність флуоресцентного сигналу (а, б), на нижній частині – внутрішньоклітинна концентрація іонізованого кальцію (а) або співвідношення між інтенсивністю флуоресценції 360/390 нм (б) зареєстровані одночасно. Дигітонін (20 мкг/мл) та АТФ (3 ммоль/л) додавали відповідно до того, як вказано на рисунку, детергент видаляли з камери відразу ж після вираженого падіння флуоресценції на 360 та 390 нм

Для перевірки функціональної цілісності внутрішньоклітинних депо ендоплазматичного ретикулума після обробки дигітоніном, ми перфузували ацинарні клітини розчином НДВ. Внаслідок додавання до нього АТФ спостерігалось інтенсивне підвищення співвідношення інтенсивності флуоресценції на довжині хвилі 360 нм до такої на довжині хвилі 390, що відповідає збільшенню концентрації кальцію всередині ендоплазматичного ретикулума (рис. 5,а). Таке підвищення характеризувалося різною кінетикою. Зокрема, найбільш інтенсивним воно було протягом перших 5 хв перфузії клітин АТФ-вмісним розчином і сповільнювалося протягом наступних 10 хв. Таке підвищення концентрації кальцію всередині ЕПР, най-

більш імовірно, викликане АТФ-залежним транспортом кальцію до ЕПР за рахунок роботи SERCA. Внаслідок заміни розчину та такий, що не містить АТФ, спостерігалось повільне зменшення вмісту кальцію в ЕПР (див. рис. 5,а). На нашу думку, це зумовлено неможливістю за даних умов АТФ-залежного транспорту кальцію до ЕПР на фоні його стаціонарного витоку через кальційпроникні канали мембрани ЕПР (наприклад IP_3 -чутливі). Подібне АТФ-залежне захоплення Ca^{2+} внутрішньоклітинними депо було продемонстровано на клітинах кришталика ока [4], панкреацитах [26, 28], гепатоцитах [27] тощо.

Підтвердженням ролі SERCA у забезпеченні накопичення кальцію всередині ЕПР

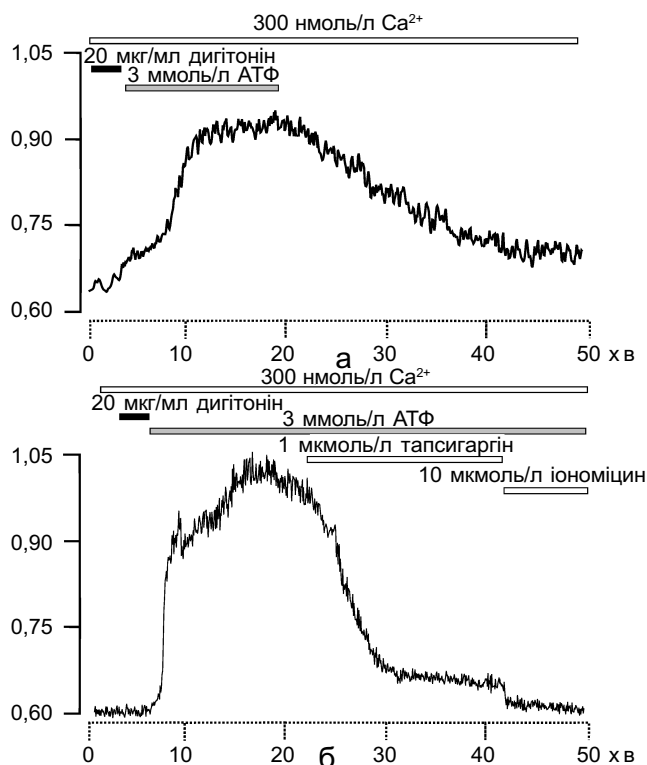


Рис. 5. Пермеабілізація та АТФ-залежне накопичення Ca^{2+} у внутрішньоклітинних структурах ацинарних клітин слинних залоз зафарбованих mag-fura 2/AM. Зміни співвідношення інтенсивності флуоресценції mag-fura 2/AM (360/390) внаслідок перфузії розчином наближеним до внутрішньоклітинного, що містив 3 ммоль/л АТФ та без АТФ (а). Вплив тапсигаргіну та іономіцину на концентрацію Ca^{2+} у внутрішньоклітинних структурах дигітонінпермеабілізованих клітин (б). Аплікацію тапсигаргіну (1 мкмоль/л) та іономіцину (10 мкмоль/л) здійснювали в розчині, наближеному до внутрішньоклітинного, який містив 3 ммоль/л АТФ

є зменшення внутрішньоретикулярної концентрації кальцію після додавання до АТФ-вмісного розчину НДВ 1 мкмоль/л тапсигаргіну (див. рис. 5,б). Це зменшення також характеризувалося різною кінетикою: наявністю швидкої (до 5 хв) та наступної повільної фаз і тривало протягом 20 хв. Наступна аплікація 10 мкмоль/л іономіцину (кальцієвого іонофору, який призводить до вивільнення Ca^{2+} із ЕПР у рецептор- та енергонезалежний спосіб) супроводжувалась подальшим зменшенням концентрації депонованого кальцію (див. рис. 5,б).

Отже, із одержаних результатів можна зробити висновок про здатність пермеабілізованих секреторних клітин слинних залоз здійснювати тапсигаргін-інгібоване АТФ-залежне накопичення Ca^{2+} у депо ЕПР. Наявність такого депо та його функціональна активність за умов пермеабілізації клітин показана на клітинах кристалика ока [4] та підшлункової залози [6, 31], епітеліальних клітин шлунка [10], нейронах периферичної нервової системи [25] та астроцитах [7]. Ефект іономіцину зумовлений вивільненням кальцію із нечутливих до тапсигаргіну депо, які можуть бути розташовані у мітохондріях чи апараті Гольджі, або, менш імовірно, у ЕПР. Таке тапсигаргіннечутливе вивільнення кальцію було показано на пермеабілізованих клітинах кристалика ока [4], епітеліальних клітин шлунка [10] і клітинах легень [33].

Таким чином, пермеабілізовані секреторні клітини слинних залоз здійснюють кальційзалежну секрецію загального білка, рівень якої залежить від часу інкубації клітин. За допомогою біохімічних методів, а також моніторингу внутрішньоретикулярної концентрації кальцію з використанням барвника mag-fura 2/AM показано здатність пермеабілізованих клітин до тапсигаргінінгібованого АТФ-залежного накопичення Ca^{2+} у внутрішньоклі-

тинних депо. Отже, пермеабілізовані з використанням дигітоніну секреторні клітини слинних залоз є зручною та адекватною моделлю для вивчення внутрішньоклітинних кальційзалежних механізмів регулювання екзоцитозу та кальцієвого гомеостазу.

Робота виконана за підтримки Західно-українського фонду біомедичних досліджень

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

PERMEABILIZED SALIVARY GLAND CELLS, AS A MODEL FOR TO STUDY CALCIUM-TRANSPORTING SYSTEMS OF ENDOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE

A method for chemical permeabilization of secretory cells of rat submandibular salivary gland has been elaborated. It was shown that the effects of digitonin on total calcium content in permeabilized acinar cells and protein content in their incubation medium correlated with concentration and duration of the detergent treatment. Digitonin-permeabilized acinar cells perform Ca^{2+} -dependent protein secretion, which level depends on the duration of cell incubation in an intracellular buffer solution. The ability of permeabilized acinar cells to perform thapsigargin-sensitive ATP-dependent Ca^{2+} transport was established by using biochemical approaches and monitoring of the intracellular calcium concentration with mag-fura 2 dye. Thapsigargin-insensitive Ca^{2+} store in the permeabilized acinar cells of the salivary gland was shown to be also available. Thus, these data give evidence to conclude that digitonin-permeabilized secretory cells of the submandibular salivary gland are an adequate model to study the mechanisms of Ca^{2+} -dependent control of the exocytosis and membrane Ca^{2+} -transporting systems of the intracellular calcium stores.

*Ivan Franko National University of Lviv;
A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, NASU*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Andersson C., Zhang A.L., Roomans G.M. Ca^{2+} mobilization in the human submandibular duct cell line A253 // *Cell Biol Int.* – 2000. – **24**, № 5. – P. 273 – 277.
2. Brayden D.J., Hanley M.R., Thastrup O. et al. Thapsigargin, a new calcium-dependent epithelial anion secretagogue // *Brit. J Pharmacol.* – 1989. – **98**, № 3. – P. 809 – 816.
3. Chatton J.Y., Liu H., Stucki J.W. Simultaneous measurements of Ca^{2+} in the intracellular stores and the cytosol

- of hepatocytes during hormone-induced Ca^{2+} oscillations // *FEBS Lett.* – 1995. – **368**, № 1. – P. 165 – 168.
4. Churchill G.C., Louis C.F. Imaging of intracellular calcium stores in single permeabilized lens cells // *Am J Physiol.* – 1999. – **276**, № 2 Pt 1. – P. C426 – C434.
 5. Fedirko N.V., Klevets M.Y., Kruglikov I.A. et al. Mechanisms mediating Ca^{2+} homeostasis in the secretory cells of submandibular salivary gland // *Neurophysiology.* – 2001. – **33**, № 4. – P. 252 – 259.
 6. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Belan P.V. et al. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules // *Cell.* – 1996. – **84**, № 3. – P. 473 – 480.
 7. Golovina V.A., Blaustein M.P. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum // *Science.* – 1997. – **275**, № 5306. – P. 1643 – 1648.
 8. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, № 6. – P. 3440 – 3450.
 9. 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. U. S. A.* – 1993. – **90**, № 7. – P. 2598 – 2602.
 10. Hofer A.M., Machen T.E. Direct measurement of free Ca in organelles of gastric epithelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **267**, № 3 Pt 1. – P. G442 – G451.
 11. Howell T.W., Cockcroft S., Gomperts B.D. Essential synergy between Ca^{2+} and guanine nucleotides in exocytotic secretion from permeabilized rat mast cells // *J. Cell Biol.* – 1987. – **105**, № 1. – P. 191 – 197.
 12. Hyrc K.L., Bownik J.M., Goldberg M.P. Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC // *Cell Calcium.* – 2000. – **27**, № 2. – P. 75 – 86.
 13. Knight D.E., Baker P.F. Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields // *J. Membr. Biol.* – 1982. – **68**, № 2. – P. 107 – 140.
 14. 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.
 15. Martin T.F., Walent J.H. A new method for cell permeabilization reveals a cytosolic protein requirement for Ca^{2+} -activated secretion in GH3 pituitary cells // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, № 17. – P. 10299 – 10308.
 16. Murphy E., Coll K., Rich T.L. et al. Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes // *Ibid.* – 1980. – 255, № 14. – P. 6600 – 6608.
 17. Pahl H.L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus // *Physiol Rev.* – 1999. – **79**, № 3. – P. 683 – 701.
 18. Park M.K., Petersen O.H., Tepikin A.V. The endoplasmic reticulum as one continuous Ca^{2+} pool: visualization of rapid Ca^{2+} movements and equilibration // *EMBO J.* – 2000. – **19**, № 21. – P. 5729 – 5739.
 19. Park M.K., Tepikin A.V., Petersen O.H. The relationship between acetylcholine-evoked Ca^{2+} -dependent current and the Ca^{2+} concentrations in the cytosol and the lumen of the endoplasmic reticulum in pancreatic acinar cells // *Pflugers Arch.* – 1999. – **438**, № 6. – P. 760 – 765.
 20. Peppers S.C., Holz R.W. Catecholamine secretion from digitonin-treated PC12 cells. Effects of Ca^{2+} , ATP, and protein kinase C activators // *J. Biol. Chem.* – 1986. – **261**, № 31. – P. 14665 – 14669.
 21. Sarafian T., Aunis D., Bader M.F. Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis // *Ibid.* – 1987. – **262**, № 34. – P. 16671 – 16676.
 22. Schafer T., Karli U.O., Gratwohl E.K. et al. Digitonin-permeabilized cells are exocytosis competent // *J Neurochem.* – 1987. – **49**, № 6. – P. 1697 – 1707.
 23. Schulz I. Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes // *Methods Enzymol.* – 1990. – **192**. – P. 280 – 300.
 24. Shlykov S.G., Babich L.G., Kosterin S.A. Suspension of smooth muscle cells treated with digitonin as a model for studying the myometrial endoplasmic reticulum calcium pump // *Biochemistry (Mosc.)*. – 1997. – **62**, № 12. – P. 1424 – 1428.
 25. Solovyova N., Verkhatsky A. Neuronal endoplasmic reticulum acts as a single functional Ca^{2+} store shared by ryanodine and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors as revealed by intra-ER [Ca^{2+}] recordings in single rat sensory neurones // *Pflugers Arch.* – 2003. – **446**, № 4. – P. 447 – 454.
 26. Tengholm A., Hellman B., Gylfe E. Mobilization of Ca^{2+} stores in individual pancreatic beta-cells permeabilized or not with digitonin or alpha-toxin // *Cell Calcium.* – 2000. – **27**, № 1. – P. 43 – 51.
 27. Thomas A.P. Enhancement of the inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable Ca^{2+} pool by GTP in permeabilized hepatocytes // *J. Biol. Chem.* – 1988. – 263, № 6. – P. 2704 – 2711.
 28. Toescu E.C., Gardner J.M., Petersen O.H. Mitochondrial Ca^{2+} uptake at submicromolar [Ca^{2+}]_i in permeabilized pancreatic acinar cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **192**, № 2. – P. 854 – 859.
 29. Tse F.W., Tse A., Hille B. Cyclic Ca^{2+} changes in intracellular stores of gonadotropes during gonadotropin-releasing hormone-stimulated Ca^{2+} oscillations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – **91**, № 21. – P. 9750 – 9754.
 30. van de Put F.H., De Pont J.J., Willems P.H. GTP-sensitivity of the energy-dependent Ca^{2+} storage pool in permeabilized pancreatic acinar cells // *Cell Calcium.* – 1991. – **12**, № 9. – P. 587 – 598.
 31. van de Put F.H., Elliott A.C. Imaging of intracellular calcium stores in individual permeabilized pancreatic acinar cells. Apparent homogeneous cellular distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in permeabilized pancreatic acinar cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271, № 9. – P. 4999 – 5006.
 32. 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.
33. Waldron R.T., Short A.D., Gill D.L. Thapsigargin-resistant

intracellular calcium pumps. Role in calcium pool function and growth of thapsigargin-resistant cells // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, № 20. – P. 11955 – 11961.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 19.09.2003*