

28.91
Г-856

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ЛЬВОВСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ЗООВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

ГРИНЬКИВ МИРОСЛАВА ЯКОВЛЕВНА

УДК 612.3:612.343:612.343.012:612.344:616:37.

**РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В МЕХАНИЗМЕ
ЭКСТРУЗИИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ
ФЕРМЕНТОВ КЛЕТКАМИ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.00.13 — физиология человека и животных

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Львов — 1989

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Львовского ордена Ленина государственного университета им. И. Франко

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор **ШОСТАКОВСКАЯ И. В.**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор **СКОРОХИД В. И.**, заслуженный деятель науки УССР, доктор медицинских наук, профессор **Панасюк Е. Н.**

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт физиологии Киевского государственного университета им. Т. Г. Шевченко

Защита диссертации состоится «.....»..... 1989 г. в часов, в аудитории № 1 на заседании специализированного совета Д 120.17.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Львовском ордена Трудового Красного Знамени зооветеринарном институте (290010, г. Львов, ул. Пекарская, 50)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Львовского ордена Трудового Красного Знамени зооветеринарного института.

Автореферат разослан «.....»..... 1989 г.

**Ученый секретарь
специализированного совета, доцент**

П. И. ГОЛОВАЧ



Актуальность тем. В настоящее время изучение механизмов холинэргической регуляции секреторного процесса на клеточном и субклеточном уровнях продолжает оставаться одной из наиболее актуальных проблем физиологии. Особый интерес вызывают пути передачи информации от постсинаптических рецепторов к эффекторным системам клетки, в частности к тем из них, которые обеспечивают экструдицию секреторных продуктов. Считают, что вторичным посредником в реализации холинэргической импульсации на клеточном уровне являются ионы кальция (Rasmussen, Goodman, 1977; Williams, 1980). Хорошо изучена функция Ca^{2+} в электромеханическом сопряжении. Она заключается в обеспечении взаимодействия между актиновыми и миозиновыми протофибриллами (Huxley, 1973). Признание мессенджерной роли кальция является составной частью контракильной или механо-химической гипотезы секреции медиаторов и гормонов (Глебов, Крыжановский, 1976; Douglas, 1968; Poisner, 1970), которая предполагает участие в секреторном процессе сократительных белков. Доказано, что повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле необходимо и для стимуляции экструдиции пищеварительных ферментов экзокринными клетками поджелудочной железы (Dogmer, 1983). Однако механизм, опосредующий влияние катионов кальция на экструдицию панкреатических ферментов окончательно не выяснен. Выявленные в ацинарных панкреатических клетках миозин, актиновые микрофиламенты и тубулиновые микротрубочки (Поглазов, 1962; Orci e.a., 1972; Hermodson, 1965), а также энергозависимость процесса экструдиции (Kanno e.a., 1983) дают возможность предположить, что и в сопряжении стимул-секреция панкреатических ферментов роль Ca^{2+} также связана с регуляцией состояния сократительных белков. Предполагают, что эта регуляция осуществляется через Ca^{2+} - связывающий белок кальмодулин (Howell, Tyhurst, 1982; Lee, Wolff, 1982), но участие его в экструдиции панкреатических ферментов не доказано. Кроме того, несмотря на большое количество проведенных исследований, в литературе имеются довольно противоречивые данные относительно участия внутри- и внеклеточных ионов кальция в запуске экструдиции панкреатических ферментов, относительно путей и механизмов трансмембранного входа Ca^{2+} в ацинарные клетки (Argent e.a., 1971; Teufel e.a., 1977; Poulsen, Williams, 1977). Часть этих данных получена при различных условиях исследования секреторной функции поджелудочной железы. Поэтому для конкретизации мессенджерной роли кальция представляет интерес изучение комплекса этих вопросов на изолированных панкреатических

8465/1

ацинусах, при использовании которых в качестве объекта исследования максимально сохраняется нативная структура ацинарных клеток и, в то же время, имеется возможность точно дозировать регуляторные воздействия на них.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в исследовании роли Ca^{2+} как вторичного посредника в холинергической стимуляции экстррузии панкреатических ферментов клетками изолированных ацинусов поджелудочной железы крыс. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать зависимость экстррузии амилазы, липазы и белка от концентрации экстрацеллюлярного кальция;
- выяснить возможность замены Ca^{2+} в сопряжении стимул-секреция катионами других щелочноземельных металлов;
- изучить пути и механизмы трансмембранного входа Ca^{2+} в ацинарные панкреатические клетки;
- определить роль кальция внутриклеточных депо в электросекреторном сопряжении;
- выяснить роль кальмодулина в реализации эффектов Ca^{2+} в сопряжении стимул-секреция панкреатических ферментов;
- исследовать значение нативного состояния микротрубочек и микрофиламентов для экстррузии секреторных белков.

Научная новизна:

- выявлена стимуляция экстррузии амилазы и белка клетками изолированных ацинусов поджелудочной железы при освобождении Ca^{2+} , депонированного в эндоплазматическом ретикулуме;
- получены данные в пользу существования двух систем переноса Ca^{2+} в плазматической мембране ацинарных панкреатических клеток: электроуправляемой и хемотропноуправляемой, по которым осуществляется вход Ca^{2+} в клетки при холинергической стимуляции, а также в пользу наличия Na^+ - Ca^{2+} -обмена в мембранах экзокринных клеток поджелудочной железы;
- показано, что в экстррузии панкреатических ферментов принимает участие Ca^{2+} - связывающий белок кальмодулин;
- установлено, что стимулированная карбахолином экстррузия пищеварительных ферментов ацинарными панкреатическими клетками происходит с участием микротрубочек и микрофиламентов.

Научно-практическая ценность работы. Расширены и конкретизированы представления о роли Ca^{2+} в сопряжении стимул-секреция пищеварительных ферментов ацинарными панкреатическими клетками. Полученные результаты могут использоваться как исходные для пони-

иания внутриклеточных механизмов, опосредующих влияние холинергической иннервации на ферментовыделительную деятельность экзокринных клеток поджелудочной железы. Данные относительно влияния на экстензию панкреатических ферментов кофеина, ингибитора кальмодулина трифторперазина, блокатора кальциевых каналов верапамила могут служить теоретическими предпосылками для поиска фармакологических препаратов, корректирующих деятельность поджелудочной железы.

Апообатия работы. Материалы диссертации докладывались на XIV Всесоюзной конференции по физиологии пищеварения и всасывания (г.Тернополь, 1986), на XII съезде Украинского физиологического общества им. И.П.Павлова (г.Львов, 1986), на XV съезде Всесоюзного физиологического общества им. И.П.Павлова (г.Кишинев, 1987), на Всесоюзной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения И.П.Разенкова "Секреция пищеварительных желез в норме и патологии" (г.Андижан, 1988), на ежегодных научных конференциях Львовского госуниверситета им. И.Франко (1985-1989 г.г.).

Публикации. Результаты исследований по теме диссертации отражены в 7 печатных работах.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований внедрены в учебный процесс при чтении лекционных курсов "Физиология человека и животных", "Нормальная физиология" и спецкурсов на кафедре физиологии человека и животных Львовского госуниверситета им. И.Франко и на кафедре нормальной физиологии Львовского медицинского института.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 142 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 7 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 13 рисунками. Список литературы содержит 314 источников литературы, из них 85 отечественных и 229 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводили на белых лабораторных крысах массой 220-250 г, голодавших перед опытом 24 ч при свободном доступе к воде. Объектом исследований являлись изолированные, диспергированные в инкубационной среде ацинусы поджелудочной железы, что дало возможность сохранить структурную и функциональную целостность ацинарных клеток и, в то же время, точно регулировать воздействия на них. Суспензию изолированных ацинусов получали мето-

дом Вильямса и соавторов (Williams e.a., 1978), применяя в качестве диспергирующего агента коллагеназу. Функциональную интактность клеток изолированных ацинусов контролировали визуально, под световым микроскопом с применением витального красителя трипанового синего (Каниева и др., 1975; Гринчишин и др., 1981; Seglen, 1976). Вторым критерием состояния ацинарных клеток являлся контроль за их дыханием в полярографической ячейке (полярограф-анализатор РА-2) с помощью открытого платинового электрода. Об интактности холинорецепторов мембран ацинарных клеток судили по способности ацинусов реагировать на добавки карбахолина в инкубационную среду.

Базисным физиологическим раствором являлся раствор Кребса (Покина и др., 1983), рН 7,4. Для определения зависимости экстружии ферментов от концентрации внеклеточного Ca^{2+} необходимое количество CaCl_2 в базисном физиологическом растворе заменяли эквимолярным количеством NaCl , а для полного устранения ионов Ca^{2+} применяли хелатирующий агент ЭГТА 10^{-4} моль/л. Гиперкальцевый раствор (100 ммоль/л) готовили добавлением сухой соли KCl к раствору Кребса, а также заменой 100 ммоль/л NaCl эквимолярным количеством KCl . В гипонатриевом растворе (26,3 ммоль/л NaCl) уменьшение концентрации Na^+ компенсировалось увеличением содержания сахарозы. С целью предотвращения образования нерастворимой соли Mn^{2+} с фосфатом в качестве инкубационной среды использовали раствор Рингера-Локка. Ионифор X-537A растворяли в этаноле, а затем вносили в раствор Кребса. Окончательная концентрация этанола не превышала 0,025%. В качестве стимулятора экстружии использовали холиномиметик карбахолин (КХ).

Интегральным показателем экстружии служило количество белка, выделяемого клетками ацинусов в инкубационную среду. Кроме того, определяли экстружию ацинарными клетками амилазы, а в некоторых сериях опытов и липазы. Экстружию фермента выражали в процентах от общего содержания его в клетках и рассчитывали как процентное соотношение между приростом ферментативной активности инкубата за период инкубации в нем диспергированных ацинусов и суммарной ферментативной активностью инкубата и клеточного лизата (Otsuki, Williams, 1982). Активность амилазы в инкубационной среде и клеточном лизате определяли методом Смита и Рое в модификации А.М.Уголева (1969), активность липазы — методом Бонди в модификации Рожковой (1937), содержание белка — методом Лоури и соавторов (Lowry e.a., 1951), а также, в некоторых сериях опытов — методом Кальба и Бернлора (Kalb, Bernlohr, 1977). Результаты исследований анализировали методом вариационной статистики по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Контроль функционального состояния клеток изолированных панкреатических ацинусов

Получаемая суспензия содержала группы клеток, конфигурация которых соответствовала ацинусам поджелудочной железы. Клетки ацинусов имели четко очерченную, выпуклую поверхностную линию, отражающую свет. Трипановый синий не окрашивал ядро и цитоплазму ацинарных клеток, что свидетельствует о структурной целостности их плазматических мембран (Каньева и др., 1975; Гринчишин и др., 1981; Seglen, 1976). Изолированные ацинусы, помещенные в полярографическую ячейку, поглощали кислород по уравнению первого порядка, что указывает на функциональную целостность их клеточных мембран (Коваленко и др., 1975).

Клетки изолированных ацинусов дозозависимо реагировали на внесение карбахолина в инкубационный раствор. Пороговой была концентрация препарата 10^{-8} моль/л. Максимальный секреторный эффект наблюдался при концентрациях холинимиетика 10^{-5} моль/л ($14,2 \pm 0,88\%$ амилазы и $17,9 \pm 1,12\%$ белка). При более высоких концентрациях карбахолина секреторный ответ клеток ацинусов снижался, что по-видимому, объясняется процессом десенситизации холинорецепторов их плазматических мембран (Katz, Thesleff, 1957; Gero, 1983). Концентрация карбахолина 10^{-7} моль/л вызывала близкий к полумаксимальному ответ ацинарных клеток, что хорошо согласуется с литературными данными (Arpert e.a., 1961). Наблюдаемые нами двухфазные дозозависимые взаимоотношения при стимуляции экстрюзии панкреатических ферментов карбахолином отображают общую закономерность ответа ацинарных клеток на холинергические агонисты, отмеченную и другими авторами в опытах *in vivo* и *in vitro* (Williams e.a., 1978; Savion e.a., 1978; Argent e.a., 1982 и др.) и свидетельствующую об интактности М-холинорецепторов на мембранах клеток изолированных ацинусов.

2. Зависимость экстрюзии панкреатических ферментов от концентрации внеклеточного Ca^{2+}

При действии ионофора X-537A (10^{-6} моль/л) экстрюзия амилазы достигала $6,5 \pm 0,91\%$, белка — $11,2 \pm 0,90\%$, что значительно повышало спонтанную экстрюзию (соответственно $3,6 \pm 0,52\%$ и $5,1 \pm 0,77\%$). Известно, что ионофор X-537A осуществляет трансмембранный перенос

экстрацеллюлярного Ca^{2+} в клетки, поэтому увеличение им экстракции панкреатических ферментов доказывает, что этот процесс стимулируется повышением концентрации ионизированного Ca^{2+} в цитозоле за счет катионов, поступающих из внеклеточного пространства. Это согласуется с точкой зрения других исследователей (Kondo, Schulz, 1975; Dogmer e. a., 1981). Существует, однако, мнение, согласно которому внеклеточные катионы Ca^{2+} не играют существенной роли в экстракции панкреатических ферментов (Teufel e. a., 1977; Chandler, 1978). В наших исследованиях наблюдалась четко выраженная зависимость стимулированной карбахолином экстракции амилазы, липазы и белка клетками изолированных панкреатических ацинусов от концентрации внеклеточного Ca^{2+} (Рис. 1). При увеличении содержания экстрацеллюлярного Ca^{2+} от следовых количеств до 0,64 ммоль/л наблюдалось увеличение экстракции белка в 2,5 раза, амилазы — в 2 раза и липазы в 1,9 раз. Дальнейшее увеличение содержания Ca^{2+} в инкубационной среде в меньшей мере влияло на экстракцию, и концентрация Ca^{2+} в среде, близкая к миллимольной, очевидно, достаточна для полной реализации действия КХ. Существующих в этих условиях трансмембран-

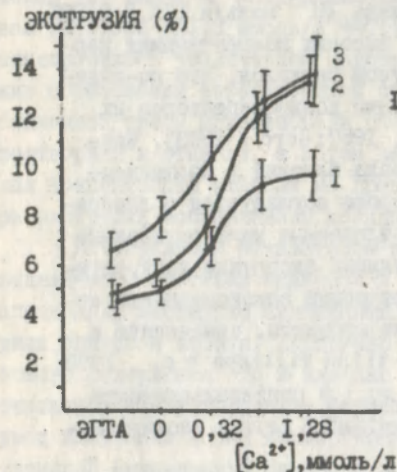


Рис. 1. Зависимость стимулированной карбахолином экстракции (%) амилазы (1), белка (2) и липазы (3) от внеклеточной концентрации Ca^{2+} (ммоль/л). Продолжительность экстракции — 30 мин.

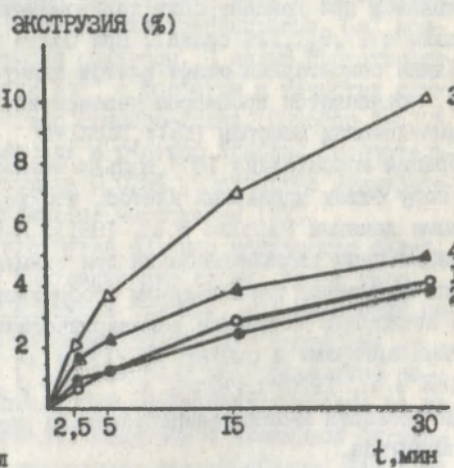


Рис. 2. Динамика спонтанной (1, 2) и стимулированной карбахолином (3, 4) экстракции (%) амилазы в кальций-содержащем (1, 3) и бескальциевом, с ЭГТА (2, 4) растворе.

ный кальциевый градиент обеспечивает, по-видимому, достаточное для экстружии поступление в клетки Ca^{2+} .

Исследование экстружии амилазы в динамике в кальцийсодержащей и бескальциевой (с ЭГТА) средах показало, что удаление Ca^{2+} из инкубационной среды не изменяло базальную секрецию, но значительно уменьшало секреторный ответ на карбахолин (рис.2). Тогда как в кальцийсодержащем растворе за 30 мин инкубации с холиномиметиком экстружия амилазы ацинарными клетками достигала $10,2 \pm 0,48\%$, в бескальциевой среде она же превышала $5,0 \pm 0,24\%$ общего запаса фермента. Аналогичный характер носит динамика выделения белка. Необходимо отметить, что в первые минуты после внесения КХ резкое увеличение экстружии ферментов наблюдалось не только в кальцийсодержащей, но и в бескальциевой среде, что указывает на проявление действия холиномиметика в этих условиях. Очевидно, при этом роль мессенджера в сопряжении стимул-секреция играет внутриклеточный, освобождаемый из депо кальций.

3. Пути трансмембранного входа ионов кальция в ацинарные панкреатические клетки

Неорганический блокатор преимущественно потенциалозависимых кальциевых каналов Mn^{2+} (10^{-3} моль/л) в результате 5-минутного действия на клетки изолированных ацинусов снижал стимулированную карбахолином экстружию амилазы и белка от $3,3 \pm 0,30\%$ и $4,7 \pm 0,14\%$ до $2,5 \pm 0,39\%$ и $3,0 \pm 0,15\%$ соответственно. Органический блокатор потенциалозависимых кальциевых каналов верапамил (10^{-5} моль/л) уменьшал стимулированную карбахолином экстружию амилазы в 1,4 раза и белка - в 1,5 раз (рис.3). Ингибирующий эффект обоих блокаторов, с одной стороны, подтверждает зависимость экстружии панкреатических ферментов от внеклеточного кальция, и с другой, указывает на возможный потенциалозависимый характер входа Ca^{2+} в ацинарные клетки при холинергической стимуляции.

Активация потенциалозависимых ионных каналов производится деполяризацией клеточной мембраны. В наших опытах деполяризацию вызывали гиперкалиевым раствором. Гиперкалиевый раствор, приготовленный добавлением 100 ммоль/л KCl к раствору Кребса незначительно (в 1,3 раза), но статистически достоверно повышал экстружию белка и амилазы. Действие его полностью устранялось верапамиллом (рис.3). Очевидно, холиномиметик, взаимодействуя с холинорецепторами, вызывает деполяризацию мембраны, которая затем активирует электроуправляемые кальциевые каналы. Данные электрофизиологичес-

ких исследований указывают на то, что ацетилхолин действительно вызывает деполяризацию мембран ацинарных панкреатических клеток (Шостаковская и др., 1986; Matthews e.a., 1973). В то же время, на фоне калиевой деполяризации мембраны карбахолин дополнительно стимулировал экструзию, поэтому можно предполагать проникновение в клетки Ca^{2+} и по хемочувствительным каналам.

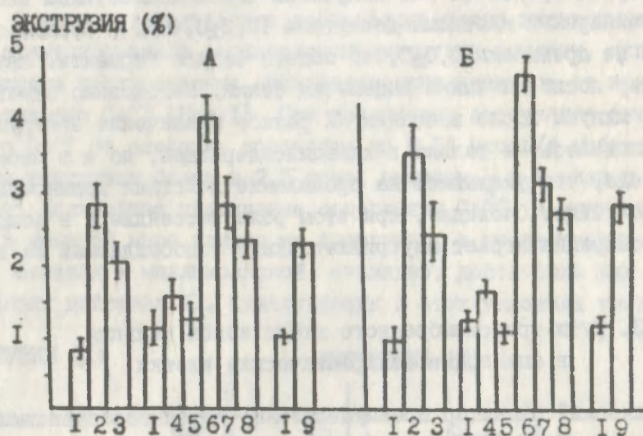


Рис. 3. Влияние верапамила и гиперкалиевой среды на экструзию (%) амилазы (А) и белка (Б) изолированными ацинусами поджелудочной железы: 1 - спонтанная экструзия, 2 - при добавлении КХ, 3 - при добавлении КХ на фоне верапамила, 4 - в гиперкалиевом растворе с нормальным содержанием Na^+ , 5 - в гиперкалиевом растворе на фоне верапамила, 6 - при добавлении КХ в гиперкалиевый раствор, 7 - в гиперкалиевом растворе со сниженной концентрацией Na^+ (до 26,3 ммоль/л), 8 - в том же растворе на фоне верапамила, 9 - в гипонатриевом (26,3 ммоль/л) растворе.

В гиперкалиевом растворе, приготовленном заменой 100 ммоль/л $NaCl$ таким же количеством KCl , наблюдалось увеличение экструзии амилазы и белка более, чем в 2 раза (рис.3), что значительно превышало действие предыдущего гиперкалиевого раствора. Очевидно, в этих условиях на экструзию, кроме деполяризации мембраны, влияет еще какой-то фактор, наиболее вероятно, уменьшение концентрации Na^+ . И действительно, уменьшение концентрации Na^+ во внеклеточной среде до 26,3 ммоль/л само по себе также стимулировало экструзию ферментов ацинарными панкреатическими клетками (рис.3).

Вероятно уменьшал действие гиперкалиевого раствора со сниженной концентрацией Na^+ лишь частично, по-видимому, не влияя на прирост экстрезии, обусловленный удалением из внеклеточной среды большей части Na^+ . Стимуляцию экстрезии в ответ на действие гипонатриевого раствора можно объяснить снижением в этих условиях оттока из клеток Ca^{2+} посредством $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - обмена, обнаруженного в различных мышечных и нервных клетках (Baker, 1976). В нормальных условиях эта транспортная система играет, по-видимому, важную роль в выведении Ca^{2+} из ацинарных клеток. Значительная стимуляция экстрезии панкреатических ферментов гиперкалиевым раствором со сниженной концентрацией Na^+ вызвана, очевидно, двойным механизмом повышения содержания ионов Ca^{2+} в цитозоле: активацией потенциалозависимых кальциевых каналов и угнетением $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - обмена.

4. Участие кальция внутриклеточных депо в запуске экстрезии панкреатических ферментов

Как показало исследование экстрезии амилазы и белка клетками изолированных ацинусов в динамике, на начальном этапе действие стимулятора проявляется даже в бескальциевой, содержащей ЭГТА среде. Очевидно, при этом используются депонированные в клетках запасы кальция. Для проверки этого предположения мы действовали на клетки изолированных ацинусов кофеином, который высвобождает Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (Weber, 1968), полагая, что этот препарат может оказывать аналогичное воздействие и на Ca^{2+} -пул в ацинарных панкреатических клетках. Инкубация диспергированных ацинусов с кофеином (10^{-3} моль/л) в течение 5 мин вызывала значительную стимуляцию экстрезии амилазы и белка. В сравнении с базальным уровнем, составляющим для амилазы $1,0 \pm 0,09\%$, а белка - $0,9 \pm 0,10\%$, под влиянием кофеина выделялось $2,7 \pm 0,35\%$ амилазы и $3,1 \pm 0,41\%$ белка. Интересно отметить, что эти величины близки к величине стимулированной КХ экстрезии в бескальциевой среде за такое же время. Очевидно, на этом этапе задействован Ca^{2+} , освобождаемый из хорошо выраженного в ацинарных клетках поджелудочной железы эндоплазматического ретикулума (Barnard, Roomens, 1982). Известно, что способностью к освобождению Ca^{2+} из ретикулума обладает цПМФ (називен е.а., 1975). Не исключено, что это его свойство связано со способностью активировать обмен фосфоинозитидов (Torch, 1974). Кофеин угнетает фосфодиэстеразу (Sutherland, Hall, 1968), что приводит к увеличению содержания в клетке циклических мононуклеотидов, в т.ч. и цПМФ. Имеются сведения, что под влиянием холинотоме-

тиков повышается активность гуанилатциклазы (Massoulié e.a., 1979), а это также увеличивает концентрацию цГМФ в клетке. Поэтому вполне возможно, что и холминометики стимулируют экстрюзию за счет выхода Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула при участии цГМФ.

5. Изучение возможности замены Ca^{2+} в сопряжении стимул-секреция панкреатических ферментов катионами других щелочноземельных металлов

Замена Ca^{2+} в базисном физиологическом растворе катионами Ba^{2+} , Mg^{2+} и Sr^{2+} значительно уменьшала секреторный ответ ацинарных панкреатических клеток на карбахоллин ($p < 0,05$). Тогда как в кальцийсодержащей среде стимулированная экстрюзия амиллазы на 30 мин инкубации достигала $9,0 \pm 1,20\%$, а белка — $10,6 \pm 0,75\%$, в растворе с Ba^{2+} эти величины составляли соответственно $4,0 \pm 0,62\%$ и $5,1 \pm 0,41\%$, с Mg^{2+} — $4,7 \pm 0,65\%$ и $5,2 \pm 0,49\%$ и в присутствии Sr^{2+} — $4,2 \pm 0,87\%$ и $4,8 \pm 0,60\%$. Незначительный прирост экстрюзии в сравнении с базальным уровнем сопоставим с величиной стимулированной экстрюзии в бескальциевой, ЭГТА — содержащей среде и, по-видимому, обусловлен наличием внутриклеточных ионов Ca^{2+} . Неспособность катионов других щелочноземельных металлов заменять Ca^{2+} в экстрюзии панкреатических ферментов может быть обусловлена неспособностью их проникать через плазматическую мембрану к месту действия Ca^{2+} в секретирующей клетке. Селективность Ca^{2+} — каналов в мембранах ацинарных панкреатических клеток не изучена. Однако, как показали исследования, проведенные на нервных клетках, Ba^{2+} и Sr^{2+} лучше, чем Ca^{2+} , а Mg^{2+} — хотя и в меньшей мере, но также проникает через Ca^{2+} — каналы (Костык, 1984). Очевидно, Ba^{2+} , Mg^{2+} и Sr^{2+} не могут вступать в свойственные Ca^{2+} внутриклеточные процессы, опосредующие холинэргическую стимуляцию. Причиной этому, по-видимому, служат уникальные координационные свойства Ca^{2+} , то есть способность катиона кальция в водном растворе образовывать нефиксированное число координационных связей — 7 или 8. Катионы других щелочноземельных металлов таким свойством не обладают. Благодаря такой особенности Ca^{2+} может вступать во взаимодействие с различными органическими молекулами, в том числе белками (Орлов, 1981; Williams R., 1970; Уггу, 1976). Так, известно, что большой избирательностью по Ca^{2+} обладает белок кальмодулин. В различных клетках, в том числе панкреатических, обнаружены Ca^{2+} — кальмодулин — зависимые протеинкиназы (Gergelick e.a., 1983), осуществляющие фосфорилирование белков, которое, согласно концепции П.Грингарда (Greengard, 1976),

может быть конечным звеном для многих биологических регуляторов.

6. Роль кальмодулина в экстрюзии панкреатических ферментов экзокринными панкреатическими клетками

Ингибитор кальмодулина трифторперазин (ТФП) в концентрациях 10 и 20 мкмоль/л полностью подавлял ответ ацинарных панкреатических клеток на карбахолин и снижал экстрюзию ими амилазы и белка до уровня, меньшего, чем базальный (рис.4). Это свидетельствует о важной роли кальмодулина в секреторном процессе. Возможно, действие ТФП связано с блокированием или кальмодулинподобной группировки, наличие которой предполагают в Ca^{2+} - каналах (Костюк, 1966). Однако, ТФП учитал и эффект Ca^{2+} -донофора, который индуцирует экстрюзию перенесением в цитозоль Ca^{2+} , минуя Ca^{2+} -каналы (рис.4). По-видимому, в экстрюзии панкреатических ферментов принимает участие внутриклеточный кальмодулин, хотя нельзя исключать значение и кальмодулинподобной группировки кальциевых каналов. Считают, что кальмодулин прямо или через активацию ряда ферментов, в том числе протеинкиназ, регулирует состояние некоторых элементов цитоскелета, в частности, актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек (Howell, Turkurst, 1982; Lee, Wolff, 1982).

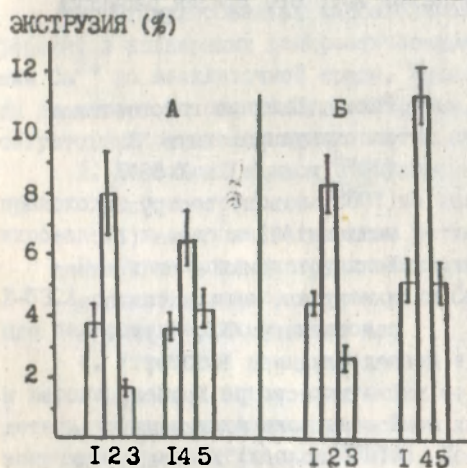


Рис.4. Влияние трифторперазина и ионофора X-537A на экстрюзию (%) амилазы (А) и белка (Б) диспергированными панкреатическими ацинусами: 1 - спонтанная экстрюзия; 2 - при добавлении КХ (10^{-6} моль/л); 3 - при добавлении КХ на фоне ТФП (20 мкмоль/л); 4 - при добавлении X-537A (10^{-6} моль/л); 5 - при добавлении X-537A на фоне ТФП (20 мкмоль/л).

Длительность экстрюзии - 30 мин.

7. Участие микротрубочек и микрофиламентов в экстрюзии пищеварительных ферментов экзокринными клетками поджелудочной железы

Роль тубулиновых микротрубочек и актиновых микрофиламентов в экстрюзии панкреатических ферментов изучалась с помощью ингибиторов этих структур колхицина, винбластина и цитохалазина Б.

Винбластин в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л полностью блокировал стимулированную экстрюзию амилазы и белка. Колхицин в эквимолярной концентрации был менее эффективен; увеличение его содержания в инкубационной среде до 10^{-5} моль/л уменьшало эффект секретстагога более, чем наполовину. Цитохалазин Б проявлял свое действие уже в концентрации 10^{-6} моль/л, а в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л устранял секреторный ответ на карбахолин.

Полученные результаты свидетельствуют об участии микротрубочек и микрофиламентов в секреторном процессе. Некоторые авторы утверждают, что эти структуры задействованы, в основном, на стадии рецепции молекул секретстагога, регулируя плотность рецепторов на клеточной поверхности (Grishel - Stewart, 1980; Rubin, 1982). Однако в наших опытах совместное воздействие колхицина и цитохалазина Б на изолированные панкреатические ацинусы уменьшало также и экстрюзию, индуцируемую Ca^{2+} -ионофором, при действии которого стадия рецепции отсутствует (рис. 5).

ЭКСТРЮЗИЯ (%)

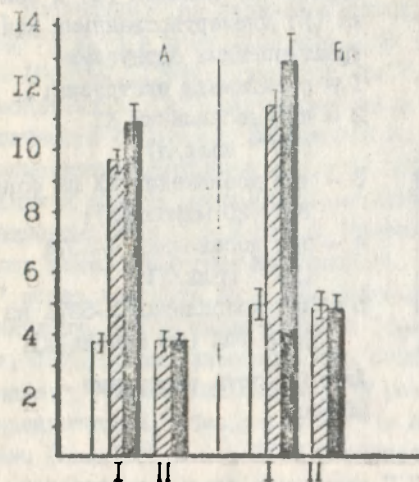


Рис. 5. Влияние цитостатиков на стимулированную КХ (10^{-6} моль/л) и X-537A (10^{-6} моль/л) экстрюзию амилазы (А) и белка (Б). Белые столбики - спонтанная экстрюзия, заштрихованные - под влиянием КХ, черные - под влиянием X-537A; I - в растворе Кребса, II - на фоне колхицина (10^{-3} моль/л) и цитохалазина Б ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л).

Таким образом, микротрубочки и микрофиламенты, по-видимому, задействованы непосредственно в процессе экстррузии панкреатических ферментов, которая, как показали электронномикроскопические исследования (Пермяков и др., 1973; Кирнер, Теэсалу, 1978; Дадабаев, 1982; Palade, 1959) происходит путем экзоцитоза. В настоящее время наиболее признанной является конкратильная гипотеза экзоцитоза, предложенная первоначально для объяснения механизмов нейросекреции, а затем и экстррузии некоторых гормонов (Глебов, Крыжановский, Douglis, 1968; Poisner, 1970). Она предполагает участие сократительных белков в транспорте синаптических пузырьков к пресинаптической мембране и в выделении их содержимого в синаптическую щель. Полученные нами результаты относительно роли Ca^{2+} , микротрубочек и микрофиламентов, а также литературные сведения об энергозависимости процесса экстррузии (Каппо е.а., 1983) позволяют предположить, что Ca^{2+} - зависимое взаимодействие сократительных белков может обеспечивать и продвижение секреторных гранул к апикальной мембране, а возможно и экзоцитоз пищеварительных ферментов в экзокринных клетках поджелудочной железы.

В В О Д Н

1. Стимулированная карбахолином экстррузия пищеварительных ферментов ацинарными панкреатическими клетками зависит от содержания Ca^{2+} во внеклеточной среде. Удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды не влияет на спонтанную экстррузию, но значительно уменьшает секреторный ответ ацинарных клеток на холиномиметик.

2. Начальный период стимулированной карбахолином экстррузии происходит и в отсутствие Ca^{2+} во внеклеточной среде за счет депонированных в эндоплазматическом ретикулуме запасов Ca^{2+} .

3. Стимуляция экстррузии амилазы и белка Ca^{2+} - ионофором X-537A служит доказательством роли Ca^{2+} в сопряжении стимул-секреция панкреатических ферментов.

4. Угнетение стимулированной экстррузии амилазы и белка Mn^{2+} и верапамилом, а также стимуляция ее гиперкалиевым раствором свидетельствуют о потенциалозависимом характере переноса Ca^{2+} в экзокринные панкреатические клетки. Дополнительное увеличение экстррузии карбахолином в условиях гиперкалиевой среды свидетельствует о переносе Ca^{2+} в клетки и по хемоуправляемым каналам.

5. Снижение концентрации внеклеточного Na^+ вызывает значительный прирост экстррузии амилазы и белка, что обусловлено умень-

шением оттока Ca^{2+} из клеток вследствие угнетения $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - обмена.

6. Замена внеклеточного Ca^{2+} катионами других щелочноземельных металлов приводит к снижению уровня стимулированной карбахолном экстрюзии амиллазы и белка, что свидетельствует о неспособности Ba^{2+} , Mg^{2+} и Sr^{2+} участвовать в электросекреторном сопряжении.

7. Ингибитор кальмодулина трифторперазин блокирует секреторный ответ клеток ацинусов на карбахолин и кальциевый ионофор, что доказывает роль кальмодулина в сопрягающей функции Ca^{2+} .

8. Ингибиторы микротрубочек и микрофиламентов колхицин, винбластин и цитохалазин Б уменьшают или даже полностью устраняют экстрюзию амиллазы и белка в ответ на карбахолин и на кальциевый ионофор. Следовательно, микротрубочки и микрофиламенты принимают участие в процессах, обеспечивающих экстрюзию пищеварительных ферментов экзокринными клетками поджелудочной железы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Гринькив М.Я., Клевец М.Ю. Влияние колхицина на экстрюзию амиллазы // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса: Вест. Львов. ун-та. Сер. биол., вып. 16. - Львов: Вища школа. Изд-во при Львов. ун-те, 1985. - С. 79-82.

2. Галькив М.А., Гринькив М.Я., Лазарева Н.Н. Влияние ацетилхолина и атропина на секрецию пищеварительных ферментов поджелудочной железы // XIV Всесоюз. конф. по физиологии пищеварения и всасывания: Тез. докл. - Тернополь; Львов, 1986. - С. 83.

3. Шостаковская И.В., Клевец М.Ю., Гринькив М.Я. Влияние трифторперазина на экстрюзию амиллазы изолированными ацинусами поджелудочной железы // Львов. гос. ун-т, 1986, 8 с. - Деп. в Укр. НИИТИ 29.09.86, № 2359-Ук86.

4. Шостаковская И.В., Клевец М.Ю., Гринькив М.Я. Диспергирование ацинуса как объект исследования секреторной деятельности поджелудочной железы // XII съезд Укр. физиол. общества: Тез. докл. - Львов, 1986. - С. 454 (на укр. языке).

5. Шостаковская И.В., Габский А.И., Гринькив М.Я., Долиба Н.М., Клевец М.Ю. О роли кальция в функционировании секреторных клеток пищеварительных желез // XV съезд Всесоюз. физиол. общества им. И.П. Павлова: Тез. докл. - Кишинев, 1987. - С. 489.

6. Гринькив М.Я., Клевец М.Ю., Шостаковская И.В. Роль кальция в экстрюзии пищеварительных ферментов ацинарными клетками

поджелудочной железы // Физиол. журн. - 1988. - Т.34, № 4, С. 13-18,

7. Гринькив М.Я., Шостаковская И.В., Клевец М.Ю. О роли нитей цитоскелета в экстррузии пищеварительных ферментов ацинарными панкреатическими клетками // Секрция пищеварительных желез в норме и патологии. Всес. конф., посвященная 100-летию со дня рождения И.П.Разенкова: Тез. докл. - Андижан, 1988. - С.63.