

Ca²⁺ СИГНАЛІЗАЦІЯ В ЗІРЧАСТИХ КЛІТИНАХ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ, ВИКЛИКАНА АКТИВАЦІЄЮ БРАДИКІНІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ДРУГОГО ТИПУ

А. М. Афросіаб^{1, а}, О. В. Грищенко^{2, б}

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

²Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАУ України

Анотація

Робота над зірчастими клітинами в культурі показала, що вони можуть генерувати істотні цитозольні кальцієві сигнали у відповідь на стимуляцію брадикініном (БК) і деякими іншими речовинами [6].

Ми з'ясували, що зірчасті клітини більш чутливі до БК, ніж культивовані. Вони генерують суттєві кальцієві сигнали у відповідь навіть на низьку концентрацію БК (при 100 мкМ та з максимальним ефектом при 1 нМ). Це на два порядки нижче, ніж те, що спостерігалось в культивованих клітинах [9].

В цілому, наші нові дані вказують на те, що до цих пір загальноприйняте поняття, що зірчасті клітини у стані спокою – пасивні, піддається сумніву, так як, насправді, вони надзвичайно чутливі до відносно невеликих змін концентрації БК, зареєстрованих *in vivo*.

Ключові слова: В2 рецептори, зірчасті клітини, кальцій, блокатори

Вступ

Іони кальцію служать посередниками безлічі клітинних реакцій, в тому числі секреторних процесів і проліферації. Зміна концентрації іонів кальцію в спеціальних клітинах призводить до безлічі біологічних ефектів на рівні органів і тканин.

За своєю будовою підшлункова залоза відноситься до складних альвеолярних залоз. В її функціях розрізняють дві різні частини: основна маса залози здійснює екзокринну функцію, виділяючи свій травний секрет через вивідні протоки в дванадцятипалу кишку; інша частина залози представлена так званими панкреатическими острівцями і відноситься до ендокринних залоз.

Відомо вже більше сорока років, що секреція панкреатичних ферментів регулюється шляхом кальцієвої сигналізації в ацинарних клітинах підшлункової залози. Основний механізм збудження ацинарних клітин – це виникнення позаклітинного кальцієвого сигналу у відповідь на дію холецистокініну або ацетилхоліну [1, 2, 3]. Вищезгадана внутрішньоклітинна кальцієва відповідь опосередкована інозітолтрифосфатом (IP3) [8].

Деполаризація мембрани ацинарних клітин викликається підвищенням рівня позаклітинного калію не викликає секрецію фермента або кальцієву відповідь.

В ацинарних клітинах здійснюється синтез двох видів білків – структурного, використовуваного для побудови компонентів клітини, і секреторного, що виділяється з клітини у вигляді гранул секрету. В

формуванні секрету бере участь ядро клітини: перше, в ядрі утворюється первинний секреторний продукт, остаточне формування якого здійснюється в цитоплазмі; по-друге, в ньому, як у центрі генетичної інформації клітини, синтезуються речовини, без яких неможливий синтез секрету в цитоплазмі.

Панкреатичні зірчасті клітини – міофібробластно-подібні клітини, які можуть перемикатися між станом спокою і активним фенотипами, як зірчасті клітини печінки. Панкреатичні зірчасті клітини розташовані в екзокринних областях підшлункової залози. При активації зірчасті клітини підшлункової залози починають впливати на процеси відновлення тканинної діяльності, секреції компонентів і міжклітинної речовини. Зірчасті клітини можуть брати певну участь в патогенезі панкреатиту і раку підшлункової залози.

Найбільш поширена точка зору – це та, що зірчасті клітини в нормальних умовах знаходяться у стані спокою [5], і у всіх опублікованих дослідженнях була зосереджена увага на активації зірчастих клітин і їх ролі (в активованому стані) при хронічному панкреатиті і раку підшлункової залози [4, 7].

Ми досліджували кальцієву сигналізацію та механізми, що лежать в їх основі в зірчастих клітинах за нормальних умов і показали, що БК активує рецептори типу 2 брадикініну (В2), який викликає первинний випуск кальцію з внутрішніх сховищ. Цей ефект може бути скасований інгібітором фосфоліпази С або блокадою IP3 рецепторів (IP3Rs). Після початкового внутрішньоклітинного вивільнення кальцію настає фаза плато, обумовлена входом кальцію із зовнішнього розчину. Ймовірно всього, це відбуває-

^аiarezik@gmail.com

^бalesha_grysh@yahoo.com

ться завдяки активації CRAC (store-release-activated channel) каналів.

Брадикінін є пептидом, який складається з девяти амінокислот та знижує артеріальний тиск розширюючи кровеносні судини.

1. Методика досліджень

Препарування – процес вилучення клітин підшлункової залози для наукових досліджень, а також розтин трупів тварини для вивчення структури досліджуваного матеріалу, а також відділення препаруючого органу від прилеглих тканин, виділення органу або частини органу від супутніх йому анатомічних структур велось відповідно до міжнародних стандартів та актуальних норм роботи з тваринами, визначених для науково-дослідних установ.

Підшлункова залоза розташована забрюшинно, лежить позаду шлунка на задній черевній стінці в епігастральній ділянці, заходячи своєю лівою частиною в ліве підребер'я. Від шлунка її відділяє сальникова сумка. Ззаду прилягає до нижньої порожнистої вени, лівої ниркової вени і аорти. При розтині тіла в лежачому положенні вона дійсно лежить під шлунком, звідси і її назва.

Миші росли і утримувались в спеціальному приміщенні із необхідною кількістю світла, води і їжі за кімнатної температури. Вилучення миші із зазначеного середовища проводилось недовзі перед експериментом. До місця проведення експерименту миші безпечно транспортувались за 10 – 15 хвилин до його початку у закритій ємності.

Експеримент починався із переведення миші у невідомий стан шляхом швидкої інтенсивної фізичної дії із подальшим розривом нервових волокон, відповідальних за проведення больових і рухових сигналів. Після цих дій голова миші була декапітована. Отриманий нерухомий об'єкт був придатний для проведення наступних хірургічних маніпуляцій.

Невеликі панкреатичні кластери були виділені з підшлункової залози дорослих мишей. Підшлункова залоза була швидко видалена та аплікована колагеназою Na-Hepes (Sigma, Poole, Великобританія) шляхом швидкої інекції препарату через шприц та в подальшому інкубуванні при 37°C протягом 10 хв. Після розбиття сполучних тканин колагеназою, тканину витримували в базовому розчині Na-Hepes. Та вимивали всі залишки колагенази шляхом піпетування у пробірках різних діаметрів.

Na-Hepes розчин складається з (в mM): NaCl, 140; KCl, 4,7; HEPES (KOH), 10; MgCl₂, 1; глюкози 10; Cl₂ 1, pH 7,2. Для завантаження кальцій-чутливих барвників клітини інкубувались протягом 15 хвилин у розчині зі вмістом Fluo 4-AM 5мкМ при кімнатній температурі. Кластери переносили в проточну камеру з перфузією базовим розчином Na-Hepes.

Клітини візуалізовували використовуючи флуоресцентний мікроскоп Olympus IX71/IX51 та за допомогою програми CellM реєстрували зміни концентрації клітини у часі.

Серії експериментів проводилися протягом 2 – 3 годин при аплікаціях різних препаратів з різною тривалістю. Реакцію на препарат можна було спостерігати на моніторі комп'ютера у реальному часі, так як до об'єктиву був приєднаний відеореєстратор. Затримка дії препарату на 10 – 15 секунд після введення була обумовлена тим, що за цей час препарат поступав по трубці до проточної камери.

Важливо зазначити, що для зменшення ролі людського фактора експерименти проводилися декілька разів із різними клітинами та розчинами на протязі декількох тижнів. Також щоб сприяти чистоті результатів дані бралися синхронно в часі відразу на декількох клітинах в камері.

Fluo-4 збуджувався при дії світлового випромінювання частотою 488 нм, а релаксував - на хвилях довжиною 510 – 580 нм. На рис. 1 (1-ий та 2-ий сигнал) приведені флуоресцентні сигнали співвідношення хвиль F/F_0 (де F_0 початковий рівень флуоресценції).

2. Результати досліджень

Кальцієву сигналізацію зірчастих клітин досліджували використовуючи кальцій-чутливий барвник Fluo 4AM. Клітини промивалися базовим розчином Na-Hepes за допомогою проточної камери. При додаванні у проток розчину з брадикініном 1 нМ ми спостерігали двофазний кальцієвий сигнал.

Перша фаза продовжувалася короткий проміжок часу та була характерна різким зростанням сигналу з яскраво вираженим піком. Друга фаза – плато, яке трималося ще декілька хвилин після вимивання брадикініну. Швидка фаза не залежала від позаклітинного кальцію, в той час як плато зникало при еквівалентній заміні кальцію на магній, що говорить про те, що саме вхід кальцію визначає наявність фази плато брадикінінової відповіді.

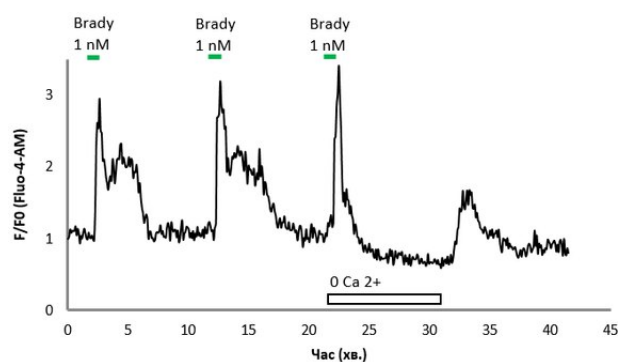


Рис. 1. Зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію в зірчастих клітинах підшлункової залози при додаванні брадикініну. Брадикінін викликає двофазну відповідь при цьому фаза плато визначається входом кальцію з позаклітинного розчину. Третя аплікація проведена у безкальцієвому розчині за допомогою еквівалентній заміні кальція на магній.

Активация В2 рецепторів відповідає за генерацію сигналів кальцієву в зірчастих клітинах у відповідь

на аплікацію брадикініну, що не було раніше досліджено. При аплікації блокатору В2 рецептора (WIN64338) кальцієва відповідь зникала. Це свідчить, що саме активація В2 рецептору у відповідь на аплікацію брадикініну приводила до двофазного кальцієвого сигналу. На протипагу цьому, блокатор рецептора брадикініну першого типу (R715) не зміг пригнічувати БК-індуковану кальцієву сигналізацію.

Висновки

Зірчасті клітини підшлункової залози далеко не пасивні при нормальних умовах, вони збуджуються під впливом брадикініну навіть у малих концентраціях. Двофазний кальцієвий сигнал складається з швидкої фази, яка не залежить від позаклітинного кальцію та фази плато, остання з великою імовірністю викликана входом кальцію у клітину. Також дослідження показало, що саме В2 рецептори, активовані брадикініном, відіграють головну роль у генерації сигналу при аплікації брадикініну.

Актуальність моєї роботи полягає в тому, що дає змогу зрозуміти природу кальцієвих сигналів зірчастих клітин підшлункової залози. Розуміння механізмів роботи брадикінінових рецепторів у зірчастих клітинах підшлункової залози в подальшому дає змогу розробити препарати для регулювання роботи клітин при різних відхиленнях, таких, як хронічний панкреатит та рак підшлункової залози.

Перелік використаних джерел

- Case R. M., Clausen T. The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. — 1973. — *J Physiol.* № 235 — p. 75–102.
- Matthews E. K., Petersen O. H., Williams J. A. Pancreatic acinar cells: acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. — 1973. — *J Physiol.* № 234 — p. 689–701.
- Kondo S., Schulz I. Calcium ion uptake in isolated pancreas cells induced by secretagogues. — 1976. — *Biochim Biophys Acta.* № 419 — p. 76–92.
- Abdoun M., Talbot S., Couture R., Hassessian H. M. Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B1 and B2 receptors. — 2008. — *Br J Pharmacol.* № 154 — p. 136–143.
- Gerasimenko J. V., Gerasimenko O. V., Petersen O. H. The role of $+$ in the pathophysiology of pancreatitis. — 2014. — *J Physiol.* № 592 — p. 269–280.
- Gerasimenko J. V., Gryshchenko O., Ferdek P. E., Stapleton E., Hebert T. O. G., Bychkova S., Peng S., Begg M., Gerasimenko O. V., Petersen O. H. L-type calcium Channel Modulates Cystic Kidney Phenotype. — 2013. — *Proc Natl Acad Sci USA* № 110 — p. 13186–13191.
- Liu Y. H., Yang X. P., Sharov V. G., Nass O., Sabbah H. N., Peterson E., Rretero O. A. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure – role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. — 1997. — *J Clin Invest* № 99. — p. 1926–1935.
- Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. Release of $2+$ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. — 1983. — *Nature* № 306. — p. 67–69.
- Park M. K., Lomax R. B., Tepikin A. V., Petersen O. H. Unclamping of $2+$ reveals distribution of $2+$ -activated Cl⁻ channels in pancreatic acinar cells. — 2001. — *Proc Natl Acad Sci USA* № 98. — p. 10948–10953.
- Smith R. J., Sam L. M., Justen J. M., Bundy J. L., Bala G. A., Bleasdale J. E. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils – effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. — 1990. — *J Pharmacol Exp Ther* № 253. — p. 688–697.
- Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. Release of $2+$ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. — 1983. — *Nature* № 306. — p. 67–69.
- Murphy J. A., Criddle D. N., Sherwood M., Chvanov M., Mukherjee R., McLaughlin E., Booth D., Gerasimenko J. V., Raraty M. G. T., Ghaneh P., Neoptolemos J. P., Gerasimenko O. V., Tepikin A. V., Green G. M., Reeve J. R. Jr, Petersen O. H., Sutton R. Direct activation of cytosolic $2+$ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. — 2008. — *Gastroenterology* № 135. — p. 632–641.
- Ma H-T, Patterson R. L., van Rossum D. B., Birnbaumer L., Mikoshiba K., Gill D. L. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated $2+$ channels. — 2000. — *Science* № 287. — p. 1647–1651.