

МОДУЛЮЮЧИЙ ВПЛИВ АДЕНОЗИНОВИХ P1 ПУРИНОРЕЦЕПТОРІВ НА КАЛЬЦІЄВУ СИГНАЛІЗАЦІЮ, ВИКЛИКАНУ АКТИВАЦІЄЮ ХОЛІНОРЕЦЕПТОРІВ В АЦИНАРНИХ КЛІТИНАХ ПІДЩЕЛЕПНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ

Н.В. Федірко¹, О.В. Копач¹, Н.В. Войтенко², П.Г. Костюк²

¹ Львівський Національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів

² Інститут фізіології імені О. Богомольця, НАН України, вул. Богомольця, 4, м. Київ

e-mail: n.fedirko@franko.lviv.ua

Надійшла в редакцію 5 жовтня 2005 р.

Виважену роль аденозинових рецепторів у функціонуванні ацинарних клітин слинних залоз залишається неясною. З використанням флуоресцентного Ca^{2+} -чутливого барвника фура-2/AM проведено вимірювання концентрації іонізованого кальцію у цитоплазмі ($[Ca^{2+}]_i$) ацинарних клітин підщелепної слинної залози щурів при активній аденозинових рецепторів. Показано відсутність прямого ефекту аденозину на $[Ca^{2+}]_i$ та його здатність ефективно потенціювати підвищення $[Ca^{2+}]_i$, викликане активацією холінорецепторів ацетилхоліном та карбамхоліном. При цьому стимулюючий ефект аденозину на амплітуду $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів проявлявся лише при концентраціях вищих за субмаксимальну. Одержані нами результати свідчать про те, що в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози функціонують P1 пуринорецептори, активація яких прямо не впливає на перебіг кальцієвої сигналізації, проте призводить до модуляції фосфоліпаза C – $InsP_3$ сигнального шляху при активній холінорецепторів. Останнє, на нашу думку, може бути викликане фосфорилуванням $InsP_3$ -рецепторів мембрани ендоплазматичного ретикулулу цАМФ-залежними протеїнкіназами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кальцієва сигналізація, Ca^{2+} , холінорецептори, P1 пуринорецептори, аденозин, форсколін, цитоплазма.

Зовнішньоклітинні пурини (аденозин, АТФ та АДФ) є важливими сигнальними молекулами, які шляхом взаємодії з пуриновими рецепторами плазматичної мембрани здатні модулювати чисельні клітинні процеси [1, 11]. Виділяють два типи пуринових рецепторів: P1 рецептори, агоністом яких є аденозин, та P2 рецептори, які активуються, в основному, зовнішньоклітинним АТФ. Показано [8, 14], що активація P2 рецепторів у клітинах підщелепної слинної залози призводить до підвищення концентрації іонізованого Ca^{2+} у цитоплазмі ($[Ca^{2+}]_i$), що, найбільш ймовірно, опосередковує модулюючий ефект зовнішньоклітинного АТФ на функціонування ацинарних клітин.

Ідентифіковано декілька підтипів P1 рецепторів (A2, A2B та A3), кожен з яких клоновано та характеризовано фармакологічно і біохімічно [2]. Сигнальний механізм P1 рецепторів опосередковується активацією G_q -білка, що призводить в основному до інгібування аденілатциклази (АЦ), проте βγ субодиниць G_q -білка спряжена з активацією фосфоліпази C-β, що призводить до відкриття K^+ -каналів та активації Ca^{2+} -каналів. Встановлено [2], що стимуляція A2A та A2B рецепторів, спряжених з G_q -білками, призводить до активації АЦ, підвищення рівня цАМФ та активації протеїнкінази А (РКА). За даними деяких авторів [7, 11] сигнальний механізм A2B рецепторів може включати, зокрема, й активацію G_q -білків і, як наслідок, опосередковуватись іншим шляхом, а саме, ініціюванням вивільнення Ca^{2+} з депо ендоплазматичного ретикулулу (ЕР). Ймовірно, що у деяких типах епітеліальних клітин цАМФ може мобілізувати Ca^{2+} шляхом активації фосфоліпази C-ε за участю цАМФ-активованого обмінного білка – $EFAC$ або $RAP1B$ -білка [5]. У той же час, сигнальний механізм A3 рецепторів опосередковується $G_{i/o}$ -білками, активація яких призводить, в основному, до пригнічення АЦ, але у деяких випадках спостерігається також активацією ФЛС та генерацією $[Ca^{2+}]_i$ -сигналів [2, 10].

Показано [4, 12, 13], що активація P1 рецепторів відіграє важливу фізіологічну роль у регуляції іонного транспорту через мембрану епітеліальних клітин нирок та дихального епітелію. Зокрема, виявлено наявність P1-опосередкованого контролю за секрецією Cl^- через цАМФ-залежний SFTR Cl^- канал та за Ca^{2+} -залежними струминами, активованими через G_i /фосфоліпаза C-β сигнальний шлях. Проте до сьогодні залишаються нероз'ясненими внутрішньоклітинні сигнальні механізми, які опосередковують активацію P1/аденозинових рецепторів в ацинарних клітинах слинних залоз та їх фізіологічна роль у регуляції слиновиділення.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Ізолювання ацинарних клітин підщелепної слинної залози. Експерименти проводили на ізолюваних ацинарних клітинах підщелепної слинної залози самців щурів лінії Wistar у віці 1,5 міс. Клітини ізолювали з тканини залози після її ферментативної обробки у базовому зовнішньоклітинному розчині, який містив колагеназу (тип I, 320 mU/mg) за методикою, описаною раніше [15]. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонову кислоту (HEPES) – 10, глюкозу – 10, pH = 7,4.

Вимірювання концентрації іонізованого кальцію у цитоплазмі клітин ([Ca²⁺]_i). Для завантаження ацинарних клітин флуоресцентним Ca²⁺-барвником клітини інкубували у базовому зовнішньоклітинному розчині з мембранно-проникною формою фура-2 (фура-2/AM, 5 мкмоль/л) за наявності детергенту плоронік F-127 (0,02 %) протягом 30 хв при 33°C. Після цього суспензію клітин відмивали базовим розчином і додатково інкубували протягом 30 хв для повної диетерифікації фура-2/AM. Зафарбовані фура-2/AM ізолювані ацинарні клітини поміщали на скельця, попередньо оброблені полі-L-лізином, які поміщали в перфузовану експериментальну камеру, змонтовану на мікроскопі (AxioLab, Zeiss, Oberkochen, Germany). Клітини спостерігали за допомогою довгофокусного, водо-імерсійного об'єктива (63x, Ч.А. 0,9). Для збудження флуоресценції зафарбовані фура-2/AM клітини по чергово освітлювали світлом довжиною хвиль 360±5 та 390±5 нм. Флуоресцентний сигнал реєстрували на довжині хвилі 510±10 нм. Сигнали, які відповідають двом довжинам хвиль збудження, зберігали за допомогою IBM-сумісного комп'ютера з програмно-апаратним комплексом Tida (Batelle, Germany). Концентрацію вільного кальцію у цитоплазмі ацинарних клітин розраховували за формулою Грінкевича [9].

Статистичний аналіз. Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакету Microsoft Excel, вибірку даних з критерієм $p < 0,05$ приймали за статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для активації P1 пуринорецепторів ми використовували специфічний агоніст даного типу рецепторів – аденозин у концентрації 1 мкмоль/л. З'ясувалось, що короткочасна (10 с) аплікація до ацинарних клітин аденозину (1 мкмоль/л) не супроводжувалась генерацією [Ca²⁺]_i-транзисентів, а також достовірними змінами базального рівня [Ca²⁺]_i (n = 5). На основі цього ми припустили, що в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози відсутній прямий вплив активації P1 рецепторів плазматичної мембрани на процеси внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

Згідно даних літератури [14] сигнальні функції деяких речовин можна виявити шляхом одночасної активації кількох рецепторних груп плазматичної мембрани. Враховуючи це, ми припустили можливий синергізм аденозинових рецепторів з іншими рецепторними структурами у досліджуваному нами типі клітин. Раніше було показано [1, 6], що основну фізіологічну роль у здійсненні кальцій-залежної регуляції функціонування ацинарних клітин відіграють холінорецептори, тому у наступній групі експериментів ми вивчали ефект сумісної дії аденозину та потужного агоніста холінорецепторів – ацетилхоліну (АХ) у різних концентраціях.

Нами встановлено, що аденозин ефективно потенціював здатність АХ (у не насичуючих концентраціях) викликати підвищення [Ca²⁺]_i. Зокрема, внаслідок прикладання до ацинарних клітин АХ (200 мкмоль/л) спостерігалась генерація [Ca²⁺]_i-транзисенту з амплітудою в середньому 67 ± 5 нмоль/л, тоді як при сумісній дії АХ та аденозину (1 мкмоль/л) амплітуда такого [Ca²⁺]_i-транзисенту становила в середньому 95 ± 9 нмоль/л, що було на 43 ± 12 % (n = 6, p < 0,05) вище, порівняно з ефектом лише АХ (рис. 1А,Б). Внаслідок аплікації до ацинарних клітин АХ у концентрації 500 нмоль/л разом з аденозином (1 мкмоль/л) зростання амплітуди АХ-індукованого [Ca²⁺]_i-транзисенту становило в середньому 58 ± 7 % (n = 9, p < 0,005). При цьому амплітуда [Ca²⁺]_i-відповіді, викликаной тільки АХ, становила 91 ± 15 нмоль/л, тоді як на фоні аденозину зростала в середньому до 122 ± 18 нмоль/л (рис. 1А,Б). Однак, при дії АХ у субмаксимальній концентрації ми виявили відсутність потенції [Ca²⁺]_i-відповіді аденозином. Зокрема, при одночасному прикладанні АХ (5 мкмоль/л) та аденозину (1 мкмоль/л) не спостерігалось достовірних змін амплітуди АХ-індукованого [Ca²⁺]_i-транзисенту (рис. 1А).

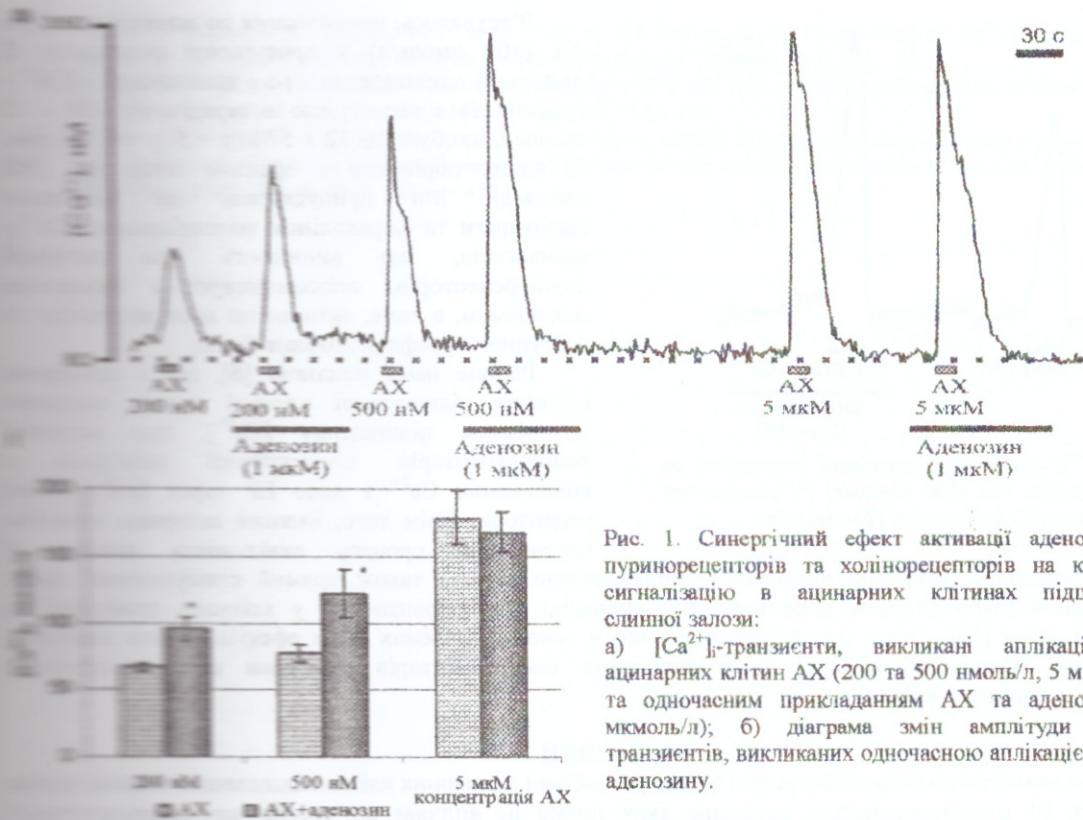


Рис. 1. Синергічний ефект активації аденозинових пуринорецепторів та холінорецепторів на кальцієву сигналізацію в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози:

а) $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнти, викликані апликацією до ацинарних клітин АХ (200 та 500 нмоль/л, 5 мкмоль/л) та одночасним прикладанням АХ та аденозину (1 мкмоль/л); б) діаграма змін амплітуди $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнтів, викликаних одночасною апликацією АХ та аденозину.

Для більш детального вивчення виявленого нами ефекту аденозину на $[Ca^{2+}]_i$ -відповідь, викликану активацією холінергічних рецепторів, ми використали карбахолін, який є більш селективним агоністом мускаринових холінорецепторів, ніж АХ. Нами встановлено, що, як у випадку з АХ, аденозин характеризується здатністю потенціювати $[Ca^{2+}]_i$ -відповідь, викликану активацією мускаринових холінорецепторів карбахоліном. Зокрема, апликація до ацинарних клітин карбахоліну (5 мкмоль/л) призвела до генерації $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнтів з амплітудою в середньому 94 ± 16 нмоль/л ($n = 7$, $p < 0,001$), а карбахоліну у присутності аденозину (1 мкмоль/л) – до 119 ± 15 нмоль/л, що було на $26 \pm 6\%$ ($n = 7$, $p < 0,001$) вище, порівняно з ефектом лише карбахоліну (рис. 2).

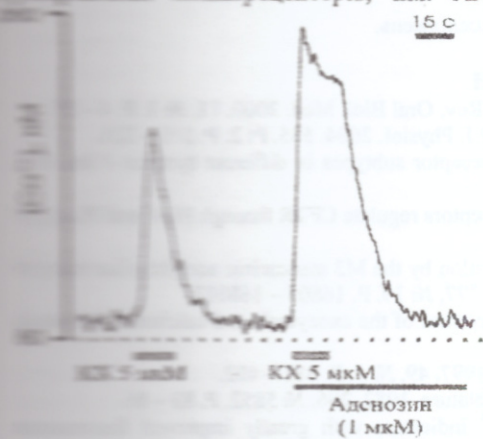


Рис. 2. $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнти, викликані апликацією до ацинарних клітин 5 мкмоль/л карбахоліну (КХ) та одночасної дії КХ і аденозину (1 мкмоль/л).

Таким чином, нами виявлено, що в ацинарних клітинах аденозин потенціює $[Ca^{2+}]_i$ -відповідь, викликану активацією мускаринових холінорецепторів за допомогою АХ та карбахоліну. Цікавим є той факт, що стимулюючий ефект аденозину проявляється лише при дії холіноміметиків у концентраціях нижчих, ніж субмаксимальна. Враховуючи, що аденозин не викликає достовірних змін $[Ca^{2+}]_i$ в ацинарних клітинах, потенціювання ним $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнтів, індукованих активацією холінорецепторів, зумовлене модуляцією однієї з ланок фосфоліпаза C – $InsP_3$ -сигнального шляху.

Як раніше відомо, активація P1 рецепторів спряжена з активацією аденілатциклази і, як результат, підвищення рівня цитлічної АМФ. Для перевірки того, що викликане аденозином потенціювання АХ-індукованих $[Ca^{2+}]_i$ -транзєнтів опосередковується активацією аденілатциклазного сигнального шляху, ми використали форскалін, який активує аденілатциклазу, незалежно від активації P1 рецепторів.

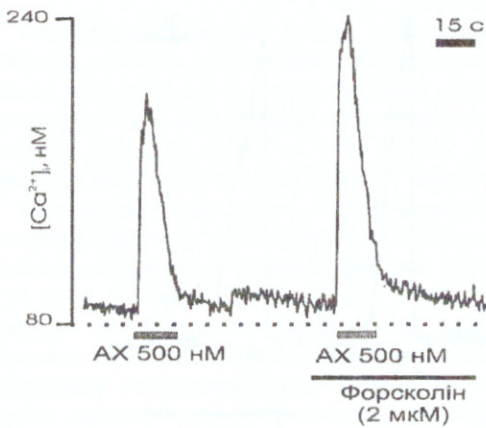


Рис. 3. $[Ca^{2+}]_i$ -транзйенти, викликані аплікацією до ацинарних клітин АХ (500 нмоль/л) та одночасним прикладанням АХ і форсколіну (2 мкмоль/л).

внутрішньоклітинного депо при активації аденілатциклази [16], а також прямий стимулюючий ефект фосфорилування $InsP_3$ -чутливих рецепторів на генерацію $[Ca^{2+}]_i$ -транзйентів у клітинах привушної та підшлункової залоз [17]. Отже, ми припускаємо, що в основі виявлених нами ефектів лежить аденозин-опосередковане посилення процесу фосфорилування $InsP_3$ -рецепторів мембрани ендоплазматичного ретикулуму ацинарних клітин.

ВИСНОВКИ

Одержані нами результати свідчать про те, що у мембрані ацинарних клітин підщелепної слинної залози функціонують P1 пуринорецептори, активація яких прямо не впливає на перебіг внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, проте призводить до модуляції фосфоліпаза C – $InsP_3$ сигнального шляху, опосередкованого активацією холінорецепторів. Останнє, на нашу думку, може бути викликане фосфорилуванням $InsP_3$ -рецепторів мембрани ЕР цАМФ-залежними протеїнкіназами.

Робота виконана за підтримки Західно-Українського фонду біомедичних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ambudkar I.S. Regulation of calcium in salivary gland secretion // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000. 11, № 1. P. 4 – 25.
2. Bucheimer R.E., Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport // *J. Physiol.* 2004. 555. Pt 2. P. 311 – 321.
3. Burnstock G., Knight G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems // *Int. Rev. Cytol.* 2004. 240. P. 31 – 304.
4. Cobb B.R., Ruiz F., King C.M., Fortenberry J. Et al. A(2) adenosine receptors regulate CFTR through PKA and PLA(2) // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002. 282, № 1. P. 12 – 25.
5. Evellin S., Nolte J., Tysack K. et al. Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B // *J. Biol. Chem.* 2002. 277, № 19. P. 16805 – 168013.
6. Fedirko N., Vats Ju., Klevets M., Kruglikov I., Voitenko. N. Neuronal control of the exocytosis and calcium homeostasis // *Neurophysiology.* 2002. P. 144 – 147.
7. Feoktistov I., Biaggioni I. Adenosine A2B receptors // *Pharmacol. Rev.* 1997. 49, № 4. P. 381 – 402.
8. Gallacher D.V. Are there purinergic receptors on parotid acinar cells? // *Nature.* 1982. 296, № 5852. P. 83 – 86.
9. Gryniewicz 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.
10. Linden J., Thai T., Figler H., Jin X., Robeva A.S. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells // *Mol. Pharmacol.* 1999. 56, № 4. P. 705 – 713.
11. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rev.* 1998. 50, № 3. P. 413-492.
12. Reshkin S.J., Guerra L., Bagorda A. et al. Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells // *J. Membr. Biol.* 2000. 178, № 2. P. 103-113.
13. Sitarman S.V., Wang L., Wong M. et al. The adenosine 2b receptor is recruited to the plasma membrane and associates with E3KARP and Ezrin upon agonist stimulation // *J. Biol. Chem.* 2002. 277, № 36. P. 33188 – 33195.
14. Turner J.T., Landon L.A., Gibbons S.J., Talamo B.R. Salivary gland P2 nucleotide receptors // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1999. 10, № 2. P. 210 – 224.

15. Van J.A., Fedirko N.V., Klevets M.Y. et al. Role of SH Groups in the Functioning of Ca²⁺-Transporting ATPases Regulating Ca²⁺ Homeostasis and Exocytosis // *Neurophysiology*. 2002. 34, № 1. P. 5 – 12.
16. Zhang G.H., Martinez J.R., Effects of forskolin, dibutyryl cAMP and H89 on Ca²⁺ mobilization in submandibular salivary cells of newborn rats // *Arch Oral. Biol.* 1999. 44, № 9. P. 735 – 744.
17. Wager L.E., Li W.H., Yule D.I. Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the S²⁺ and S2- splice variants // *J. Biol. Chem.* 2003. 278, № 46. P. 45811 – 45817.