МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Пономарчук Ольга Олеговна

Механизмы ауторегуляции объема клеток эпителия в гипотонических условиях

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, а также в лаборатории научно-исследовательского центра при Монреальском университете (Канада).

Научные руководители	_	Сергей Николаевич Орлов доктор биологических наук, профессор Георгий Владимирович Максимов	
Официальные оппоненты	_	ооктор оиологических наук, профессор Лопина Ольга Дмитреевна доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета МГУ	
	_	имени М.В.Ломоносова Архипенко Юрий Владимирович доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник научно- исследовательской лаборатории адаптационной медицины на факультете фундаментальной медицины МГУ имени М В Ломоносова	
	_	Зинченко Валерий Петрович доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории	

Защита диссертации состоится «__» декабря 2018 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

внутриклеточной

ПНЦБИ РАН, г. Пущино

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/152208009/

Автореферат разослан «___»____2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Althung

М.Г. Страховская

ФИЦ

R

сигнализации

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одно из универсальных свойств клеток – поддержание объема на стационарном уровне вне зависимости от изменений осмолярности внеклеточной происходящих различных воздействиях среды И цитоплазмы, при И патофизиологических состояниях. Так, например, клетки эпителия могут быть подвержены изменениям внеклеточной осмолярности при контакте с пресной или морской водой. Причинами изменения внутриклеточной осмолярности этих клеток может быть несбалансированный транспорт ионов и органических осмолитов через мембрану или сдвиги во внутриклеточном балансе между высокомолекулярными полимерами и их осмотически активными низкомолекулярными предшественниками и метаболитами (Mongin and Orlov 2001). Длительные изменения объема, обусловленные дисбалансом вне- и внутриклеточных осмолитов, влияют на системы внутриклеточной сигнализации, вовлеченные в регуляцию пролиферации и смерти клеток: длительное и чрезмерное сжатие приводит к апоптозу, а набухание – к некрозу клеток (Orlov, Model et al. 2013).

В поддержании стационарного объема, как правило, участвуют мембранные транспортеры, осуществляющие поглощение внеклеточных или выведение внутриклеточных осмолитов. В результате этих процессов, получивших в англоязычной литературе название Regulatory Volume Increase (RVI) и Regulatory Volume Decrease (RVD), происходит восстановление клеточного объема до исходных значений. В большинстве случаев быстрые процессы RVI связаны с накоплением одновалентных ионов как основных неорганических осмолитов за счет активации Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ котранспорта и/или Na⁺/H⁺ обмена, в то время как потеря этих осмолитов при RVD происходит за счет активации К⁺, Cl⁻-котранспорта, калиевых и анионных каналов, включая объем регулируемые анионные каналы (Volume-Regulated Anion Channel, VRAC) (Lang, Busch et al. 1998), (Hoffmann, Lambert et al. 2009).

Другим фактором регуляции объема клеток является перераспределение свободной и связанной воды цитоплазматического геля. Сравнительно недавно было установлено, что в отсутствии плазматической мембраны цитоплазма ведет себя как биогель, изменяющий свой объем в ответ на изменения осмолярности среды (Fels, Orlov et al. 2009). Белки трехмерного цитоскелета клеток являются одним из основных компонентов цитоплазмы, принимающих участие в регуляции объема клеток. Известно, что целостность цитоскелета нарушается при 48-49 °C в результате плавления одного из его структурных составляющих – спектрина и, возможно, других минорных белков (Brandts, Erickson et al. 1977), (Shnyrov, Orlov et al. 1990). В этой связи в настоящей работе исследовали действие температурного плавления белков цитоскелета и химических агентов, разрушающих образующие его микротрубочки и микрофиламенты, на объем клеток эпителия и ион-транспортирующие системы, вовлеченные в RVD.

Известно, что увеличение концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) активирует ионные каналы, вовлеченные в RVD. В этой связи мы предположили, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ может влиять на объем клеток, приводя к перераспределению свободной и связанной воды цитоплазмы. Следует, однако, отметить несовершенство методов и подходов при изучении данной темы. В большинстве случаев эксперименты проводятся не на одиночных клетках, а на монослоях клеток, где флуктуации $[Ca^{2+}]_i$ выражены по-разному внутри популяции. Кроме того, измерения объема клеток и $[Ca^{2+}]_i$ проводятся раздельно во времени. Учитывая выше сказанное, мы использовали разработанный в нашей лаборатории метод реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (Double Image Surface Reconstruction, DISUR) и модифицировали его для возможности одновременного измерения изменений клеточного объема и $[Ca^{2+}]_i$.

Целью настоящей работы было изучить механизмы формирования RVD в эпителиальных клетках A549. Перед нами были сформулированы следующие задачи исследования:

1) Разработать метод одновременной регистрации изменений объема клеток и внутриклеточной концентрации кальция.

2) Исследовать действие предварительной инкубации клеток при температуре 40-50 °С на кинетику изменения их объема и потоков ионов калия в гипотонической среде.

3) Исследовать роль цитоскелета в изменениях объема интактных и пермеабилизированных клеток в гипотонической среде.

4) Изучить роль кальция в изменениях объема в гипотонической среде и ионных токов, вовлеченных в RVD.

5) Провести анализ семейства белков LRRC8, образующих VRAC, на наличие Ca²⁺/кальмодулин-связывающих сайтов и Ca²⁺/кальмодулин-зависимых сайтов фосфорилирования.

Научная новизна и практическая значимость работы

Нами впервые разработан метод, позволяющий проводить одновременную регистрацию изменений $[Ca^{2+}]_i$ и объема одиночных клеток эпителия. Установлена относительная роль ионных потоков через плазматическую мембрану, цитоплазмы и белков цитоскелета в регуляции объема клеток эпителия в гипотонических условиях. Показано, что сигнальные системы, опосредованные увеличением $[Ca^{2+}]_i$, не вовлечены в активацию VRAC и RVD. Полученные результаты вносят существенный вклад в изучение фундаментальных механизмов регуляции объема клеток, а также в разработку новых подходов для диагностики и лечения таких респираторных болезней, как отек легкого и муковисцидоз, обусловленных нарушениями регуляции ионного баланса и объема клеток.

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Разработан новый метод одновременной регистрации изменений объема клеток и внутриклеточной концентрации кальция ([Ca²⁺]_i).

2) Первоначальное набухание клеток эпителия в гипотонической среде сопровождается процессом регуляторного уменьшения объема (RVD), опосредованным

5

активацией Ba²⁺-чувствительных К⁺-каналов и анионных каналов (VRAC).

3) Установлен Ca²⁺-независимый механизм RVD и активации VRAC при гипотоническом набухании клеток.

4) Разрушение сети цитоскелета подавляет набухание цитоплазмы клеток в гипотонической среде, но не влияет на потоки ионов K^+ и RVD.

5) Предынкубация при 48 °C снижает набухание биогеля цитоплазмы в гипотонических условиях и полностью подавляет активацию Ba²⁺-чувствительных K⁺- каналов и связанный с ними RVD.

Апробация

Апробация работы была проведена на семинарах кафедры биофизики и лаборатории физико-химии биомембран биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Основные результаты диссертационной работы были изложены на 17-ом конгрессе студентов, аспирантов и стажеров Монреальского университета (Монреаль, 2014); на ежегодном квебекском конгрессе по респираторному здоровью (Леви, 2015); на 18-ом конгрессе студентов, аспирантов и стажеров Монреальского (Монреаль, 2016); ежегодном университета на международном конгрессе американского тораксического сообщества (Сан-Франциско, 2016); на симпозиуме по репарации легкого и ответам на стресс (Монреаль, 2016); на 11-ом международном конгрессе по изучению регуляции объема клетки (Чикаго, 2016); на 61-ой ежегодной встрече биофизического сообщества (Новый Орлеан, 2017); на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях (индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI), а также 6 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их интерпретации, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, включает 40 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 471 источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения цели нашего исследования мы выбрали эпителиальные клетки аденокарциномы легкого человека (A549). Клетки этой линии являются моделью клеток альвеолярного эпителия второго типа (AT II), для которых полно охарактеризованы ион-транспортные системы (Hollenhorst et al. 2011). Клетки линии A549 при низком содержании эмбриональной бычьей сыворотки в среде (0.1%) растут в виде одиночных клеток, что необходимо для выполнения установленных нами экспериментальных задач. В дополнение, данный тип клеток прост в культивировании.

Измерение клеточного объёма проводили ранее разработанным в нашей лаборатории методом реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (Double Image Surface Reconstruction Technique, DISUR). Значения клеточного объёма были рассчитаны из реконструированных моделей клеток (Boudreault and Grygorczyk 2004). Для экспериментов по изучению роли кальциевой сигнальной системы в RVD мы модифицировали метод DISUR для возможности одновременной регистрации изменений объема и $[Ca^{2+}]_i$ с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM (Tatur, Groulx et al. 2007). Изучение токов VRAC проводили методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка». Анализ аминокислотных последовательностей белков LRRC8 проводили с помощью программного обеспечения, свободно доступного в интернете (http://www.phosphosite.org/, http://calcium.uhnres.utoronto.ca).

В некоторых экспериментах оценивали объем внутриклеточной воды как пространство, доступное для [¹⁴C]-мочевины, и рассчитывали согласно формуле: $V=A_c/A_m$, где A_c – радиактивность клеток после инкубации с 2 мкКи/мл [¹⁴C]мочевины (распады в минуту), A_m – радиактивность инкубационной среды (распады в минуту/мкл), m – содержание белка в клеточном лизате (мг); Активность K⁺-каналов определяли по Ba²⁺-чувствительной компоненте скорости входа ⁸⁶Rb. Поглощение ионов рассчитывали как V=A/amt, где A – радиоактивность образца (число импульсов/мин), a – специфическая радиоактивность ⁸⁶Rb (K⁺) в среде инкубации, m– содержание белка в образце (мг) и t – время инкубации (мин); Для оценки статистической достоверности различий применяли параметрический t-критерий Стьюдента. Результаты считались достоверными при р < 0.05.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Воздействие температуры на осмочувствительные свойства цитоплазматического биогеля

Набухание клеток A549, развивающееся в первые 5 минут после гипотонического шока (параметр V_{max} - V_1 , рис. **1**A), сопровождалось почти полным восстановление объема в последующие 25 минут (параметр V_{max} - V_2 , рис. **1**A). Предварительная инкубация при 48 °C приводила к резкому уменьшению максимальной амплитуды набухания клеток в гипотонических условиях на фоне отсутствия достоверно значимого RVD (рис. **1Б** и **2**).



Рис. 1. Эффект гипотонической среды (В-гипо) на изменения объема в контрольных клетках A549 (**A**) и клетках A549, подверженных 10-минутной предынкубации при 48 °C (**Б**). Измерение объема проводили при 37 °C. Среднее значение объема в течение первых 5 минут инкубации принималось за 100%. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (n = 4).



Рис. 2. Эффект 10-минутной предынкубации при 48 °C на гипотонически стимулированное набухание (параметр V_{max} - V_1) и RVD (параметр V_{max}-V₂). Для определения момента измерения параметров V₁, V_{max}, V₂ см. рис. **1А** и **1Б**. Измерение объема проводили при 37 °С. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4), **p < 0.001.

Как видно из рис. ЗА, перенос клеток в среду, содержащую низкую концентрацию натрия и высокую концентрацию калия, т.е. раствор, подобный ионному составу цитоплазмы (Intracellular-Like Solution, ILS), а также последующая пермеабилизация плазматической мембраны дигитонином приводили к увеличению объема клеток приблизительно на ~ 60% (параметр V₃-V₁, рис. **3A**). В соответствии с более ранними исследованиями (Fels, Orlov et al. 2009) подвержение пермеабилизированных A549 действию клеток гипотонической среды сопровождалось увеличением амплитуды набухания (параметр V_{max}-V₃, рис. 3A). Однако, мы не наблюдали опосредованный оттоком внутриклеточных ионов калия и RVD В пермеабилизированных клетках. что хлора вызвано разрушением электрохимического градиента ионов в ILS растворе.



Рис. 3. Эффект гипотонической среды (ILS-гипо) на изменения объема в пермеабилизированных клетках A549 (**A**) и пермеабилизированных клетках A549, подверженных 10-минутной предынкубации при 48 °C (**Б**). Измерение объема проводили при 37 °C. Среднее значение объема в течение первых 5 минут инкубации принималось за 100%. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (n = 4).

10-минутная предынкубация клеток при 48 °C подавляла как изосмотическое набухание, вызванное разрушением равновесия Доннана (параметр V_3 - V_1 , рис. **3Б** и **4**), так и набухание, стимулированное применением гипотонического ILS раствора (параметр V_{max} - V_3 , рис. **3Б** и **4**), что указывает на ключевую роль цитоплазматического биогеля как сенсора изменений объема.



Рис. 4. Эффект 10-минутной при 48 °C предынкубации на изосмотическое набухание, стимулированное разрушением равновесия Доннана (параметр V₃-V₁), стимулированное И на гипотонической средой набухание (параметр $V_{max}-V_3$) в пермеабилизированных клетках А549. Для определения момента измерения параметров V₁, V_{max}, V₃ см. рис. **ЗА** и 3Б. Измерение объема проводили при 37 °С. Данные представлены как стандартная среднее ± ошибка среднего (n = 4), *p < 0.001.

В последующей серии экспериментов мы исследовали зависимость максимальной амплитуды набухания в гипотонических условиях от температуры предынкубации. Установлено, что 10-минутная предынкубация клеток А549 при 37-46 °C не оказывала влияния на максимальную амплитуду гипотонического набухания, в то время как последующее увеличение температуры до 48 °C резко уменьшало этот параметр в 5-6 раз (рис. 5). Такое поведение демонстрирует свойства цитоплазмы как гидрогелей.



Рис. 5. Зависимость значений максимальной амплитуды набухания клеток A549 В гипотонических условиях от температуры предынкубационной среды. Клетки инкубировали указанных при температурах в течение 10 минут и впоследствии подвергали действию гипотонического раствора при 37 °С. Максимальная амплитуда набухания клеток А549, предынкубированных при 37 °C, была взята за 100 %. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 5).

Известно, что в большинстве клеток RVD опосредован K⁺, Cl⁻-котранспортом и/или K⁺ и Cl⁻-каналами, осуществляющими выход из клетки ионов калия и хлора как основных неорганических осмолитов. Действительно, нами установлено, что в клетках A549 в гипотонической среде возрастает активность K⁺-каналов (уабаин + буметанид-устойчивая, чувствительная к Ba²⁺ компонента входа ⁸⁶Rb) (рис. **6**).



Рис. 6. Зависимость скорости ⁸⁶Rb. опосредованная входа K^+ осмолярности каналами, от инкубационной среды. Активность К⁺-каналов в клетках А549 была измерена как (уабаин + буметанид)устойчивый, чувствительный к Ba² приток ⁸⁶Rb. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4).

Учитывая эти данные, мы исследовали зависимость активности K^+ -каналов от температуры предынкубационной среды. Нами было обнаружено, что базовая активность K^+ -каналов достоверно не изменялась при увеличении температуры предынкубационной среды (рис. 7, кривая 1). В то же время, активация K^+ -каналов, вызванная гипотоническим набуханием клеток, была упразднена при увеличении температуры предынкубационной среды с 47 до 48 °C (рис. 7, кривая 2), что находится в согласии с более ранними результатами (Parshina, Yusipovich et al. 2013).



Рис. 7 Влияние температуры предынкубационной среды на К⁺-каналов базовую активность (кривая 1) и активацию К⁺-каналов при снижении осмолярности среды (кривая 2). Клетки инкубировали при указанных температурах в течение 10 минут, после чего производили измерение ионных потоков при 37 °С изотонической (300 мОсм) в И гипотонической (150 мОсм) средах. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4).

Роль цитоскелета в механизмах регуляторного восстановления объема клеток при стимуляции гипотоническим шоком

В данной серии экспериментов мы изучили роль микротрубочек и микрофиламентов как основных компонентов трехмерного цитоскелета цитоплазмы. Рис. **8A** показывает, что микротрубочки (представлены зеленым) однородно распределены в цитоплазме клеток A549, в то время как актиновые микрофиламенты

(представлены красным) в основном расположены на периферии, по соседству с плазматической мембраной, формируя так называемый кортикальный или мембранный каркас. В соответствии с более ранними публикациями (Ingber, Prusty et al. 1995), (Ujihara, Miyazaki et al. 2008) 20-минутная инкубация клеток с 20 мкМ цитохалазина В приводила к сильному уменьшению проекции площади клетки и накоплению актиновых агрегатов в кортикальной и центральной зонах цитоплазмы (рис. 8Б). Результатом инкубации с 10 мкМ винбластина было разрушение микротрубочек и увеличение содержания актиновых микрофиламентов в цитоплазме (рис. 8В). Учитывая эти наблюдения, мы решили использовать данные концентрации веществ для изучения роли цитоскелета в изменениях объема клеток А549.



Рис. 8. Типичные микроснимки микрофиламентов (красный) и микротрубочек (зеленый) в контрольных клетках А549 (А), после 20-минутной инкубации с 20 мкМ цитохалазина В (Б) и 10 мкМ винбластина (В).

Нами обнаружено, что разрушение микротрубочек винбластином снижало максимальную амплитуду набухания при воздействии гипотоническим шоком (параметр V_{max} - V_1 , рис. 9A, табл. 1). Такое поведение соответствует сниженной способности цитоплазмы присодинять воду в данных условиях. В то же время ни цитохалазин B, ни винбластин не упраздняли вызванный набуханием RVD (рис. 9A).

Табл. 1. Действие цитохалазина В и винбластина на изменения объема интактных клеток А549 при стимуляции гипотоническим шоком.

Параметры	Контроль	Цитохалазин В	Винбластин
	(n=4)	(n=4)	(n=4)
V ₁ , %	102.1 ± 1.8	130 ± 8.8	95.3 ± 2.5
V _{max} , %	148.4 ± 6.9	145.8 ± 10.5	$119.1 \pm 5.5*$
V ₂ , %	107.0 ± 3.6	97.7 ± 9.87	88.9 ± 1.7

Среднее значение объема в течение первых 5 минут инкубации (V_0) принималось за 100%. Для определения параметров V_1 , V_{max} , V_2 см. рис. **1А**,* р < 0.02.



Рис. 9. Действие цитохалазина В и винбластина на изменения объема интактных (**A**) и пермеабилизированных клеток A549 (**Б**) в гипотонических условиях. Среднее значение объема в течение первых 5 минут инкубации (V₀) принималось за 100%. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (n = 4). Момент добавления дигитонина обозначен серым столбцом.

На следующем этапе мы исследовали роль цитоскелета в регуляции объема биогеля цитплазмы на примере клеток с разрушенной плазматической мембраной. Как цитохалазин В, так и винбластин устраняли набухание пермеабилизированных клеток в гипотонической среде (параметр V_{max}-V₃, рис. **9Б**, табл. **2**). Это, вероятно, обусловлено тем, что вода, связанная с интактным цитоскелетом, является главным фактором в регуляции объема клеток эпителия.

Параметры	Контроль	Цитохалазин В	Винбластин
	(n=4)	(n=4)	(n=5)
V ₁ , %	98.0 ± 2.0	115.5 ± 7.7	105.2 ± 3.1
V ₂ , %	132.1 ± 16.3	154.3 ± 6.8	175.9 ± 16.2
V3, %	152.8 ± 12.3	153.2 ± 10.3	145.2 ± 7.4
V _{max} , %	229.7 ± 23.6	$137.5 \pm 6.9*$	121.3 ± 7.7 **

Табл. 2. Действие цитохалазина В и винбластина на изменения объема пермеабилизированных клеток А549 при стимуляции гипотоническим шоком.

Среднее значение объема в течение первых 5 минут инкубации (V₀) принималось за 100%. Для определения времени измерения параметров V₁, V₂, V₃, V_{max} см. рис. **3A**, *p < 0.02; **p < 0.01.

В последующих экспериментах мы изучили регуляцию Ва²⁺-чувствительных К⁺-каналов соединениями, разрушающими сеть цитоскелета. Мы обнаружили, что увеличение проницаемости для К⁺, вызванное действием гипотонической среды, было не чувствительно к присутствию цитохалазина В и незначительно уменьшалось

при обработке клеток винбластином (рис. 11).



Рис. 11. Действие 1мМ Ba^{2+} , 20 мкМ цитохалазина В и 10 мкМ винбластина на приток K^+ (измеренный как поглощение ⁸⁶Rb) в интактных клетках A549 в изотонической (изо) и гипотонической (гипо) средах. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 6),*p < 0.001.

Основываясь на кинетике изменений объема, полученной методом DISUR (рис. 1А), мы провели измерения объема внутриклеточной воды через 5 и 30 минут инкубации в среде со сниженной осмолярностью. Было установлено, что после 5 минут инкубации в гипотонической среде объем внутриклеточный воды возрастал на 40-50% (рис. 12). В соответствии с данными, полученными методом DISUR, объем внутриклеточной воды почти полностью восстанавливался до исходных значений через 30 минут воздействия гипотоническим шоком. Нормализация объема внутриклеточной воды устранялась при ингибировании K⁺-каналов 1 мM Ba²⁺, однако была сохранена в присутствии цитохалазина В и винбластина. Полученные опосредован Ba^{2+} показывают, что процесс RVD активацией результаты чувствительных К⁺-каналов, но не зависит от модификации цитоскелета клетки цитохалазином В и винбластином.



Рис. 12. Эффект 1мМ Ва²⁺, 20 мкМ цитохалазина В и 10 мкМ винбластина на объем внутриклеточной воды клеток А549 через 5 и 30 минут инкубации в гипотонической среде. Среднее значение объема внутриклеточной воды после 30 минут инкубации клеток изотонической среде обозначено пунктирной линией. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4),*p < 0.005.

Вовлечение кальциевой сигнальной системы в механизмы регуляторного восстановления объема

Оптимизация скорости протока внеклеточного раствора и размера камеры – необходимое условие для одновременной регистрации [Ca²⁺]_i и объема клетки с помощью метода DISUR. Проведенный анализ моноэкспоненциальной модели уменьшения тоничности среды показал, что при более медленном замещении изотонической среды на гипотонический раствор кинетика набухания резко замедляется (рис. **13**).



Рис. 13. Воздействие скорости кинетики замещения среды на набухания клеток при стимуляции гипотоническим шоком. Набухание было симулировано клеток моноэкспоненциальной помощью уменьшения тоничности модели среды. Скорость перфузии Q была равна 0.5 мл/мин и объем камеры V был равен 0.2, 0.625, или 1.25 мл, что соответствует скорости замены среды 2.5, 0.8, и 0.4 мин⁻¹(кривые 1, 2 и 3).

В соответствии с этой моделью мы обнаружили, что при скорости замещения среды 0.4 мин⁻¹ максимальное увеличение объема до $40 \pm 6\%$ (V_{max}) происходит через 22 ± 2 минуты (рис. 14). В этих условиях через 20 минут после максимального набухания (VR₂₀) объем клеток восстанавливается на $60 \pm 7\%$. Такая скорость набухания является достаточно медленной в сравнении со скоростью набухания клеток в аналогичных экспериментах с более высокой скоростью замещения среды, где значения максимального объема достигались за более короткое время (~ 2.5 - 5 минут) (Boudreault and Grygorczyk 2004). Таким образом, мы добились улучшения качества изображений за счет сниженной скорости замещения среды в большей по размерам камере, результатом чего стало более медленное набухание. Важно отметить, что медленное набухание не оказывало влияния на способность клеток восстанавливать объем в наших экспериментах и кинетика протекания RVD соответствовала ранее полученным результатам (Hoffmann, Lambert et al. 2009).



Рис. 14. Усредненная кинетика изменений объема одиночных клеток A549 50% при стимуляции гипотоническим шоком. Скорость замещения среды $Q/V \sim 0.4$ мин⁻¹. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 17). График демонстрирует относительные значения объема, нормированные на значение объема клетки до набухания.

Проведя оптимизацию кинетики набухания, мы переключились на изучение изменений концентрации внутриклеточного кальция BO время стимуляции гипотоническим шоком. В этих экспериментах мы не обнаружили достоверного влияния нагрузки клеток флуоресцентным индикатором ионов кальция Fura-2 на кинетику набухания клеток А549, однако отметили наличие тенденции к более медленному RVD (рис. 15). Такой эффект может быть результатом увеличения Ca^{2+} буферной емкости цитоплазмы при использовании данного индикатора, о чем сообщалось в ранее опубликованных работах (Speake, Douglas et al. 1998), и/или действием ультрафиолета повреждения, результатом вызванного ЧТО может оказывать влияние на свойства цитоплазмы как биогеля, а также реорганизацию цитоскелета при изменениях объема.



Рис. 15. Усредненные кинетики изменений объема одиночных контрольных клеток А549 (n = 18) и клеток, нагруженных флуоресцентным индикатором Ca_i²⁺ Fura-2 (n = 11), при стимуляции 50% гипотоническим шоком. Скорость замещения среды $Q/V \sim 0.4$ мин⁻¹. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Графики демонстрируют относительные значения объема, нормированные на значение объема клетки до набухания.

Нам обнаружить достоверных изменений концентрации не удалось внутриклеточного кальция как во время фазы набухания при стимуляции клеток 50% гипотоническим раствором, так и во время RVD (рис. 16). Важно отметить, что во всех экспериментах клетки демонстрировали сильный прирост [Ca²⁺]_i в ответ на Са²⁺-ионофора иономицина, используемого лобавление нами В качестве положительного контроля чувствительности нашего метода для измерения данного параметра.



 $[Ca^{2+}]_{i}$ 16. Изменения Рис. вызванные применением 50% гипотонического раствора (на представлены графике нормированные данные В виде отношения F_{340}/F_{380}), И зарегистрированные одновременно изменения объема в нагруженных Fura-2 клетках А549. Представлены $[Ca^{2+}]_{i}$ кинетики изменения В одиночных клетках (n = 7, тонкие кривые) и усредненная кинетика изменений объема (n = 11, толстая кривая). Кинетика изменений объема представляет относительные значения объема, нормированные на начальное значение объема клетки до набухания.

Можно предположить, отсутствие изменений внутриклеточной что концентрации особенностями кальция связано с методическими наших медленной кинетике набухания экспериментов, приводящими к клеток. Действительно, более быстрое набухание клеток было ассоциировано с выраженными изменениями внутриклеточной концентрации кальция в более ранних работах (Boudreault and Grygorczyk 2004), (Mola, Sparaneo et al. 2016). Для проверки этой гипотезы мы проанализировали изменения [Ca²⁺]; в больших популяциях клеток А549 (плотность клеток ~ 300 клеток/мм²). В 6 независимых экспериментах мы при скорости замещения среды 0.4 мин⁻¹ обнаружили, увеличение ЧТО внутриклеточной концентрации кальция наблюдается только в 11 ± 5% клеток. Уменьшение размера экспериментальной камеры в два раза приводит к увеличению скорости замещения среды до 0.8 мин⁻¹. В этих условиях возрастает скорость набухания клетки в гипотоническом растворе (согласно представленной выше теоретической модели) и в 4 раза увеличивается процент клеток, демонстрирующих изменения [Ca²⁺]_i (42 ± 7%, n=6, рис. 17). Представленные данные указывают на взаимосвязь между скоростью применения гипотонического шока, скоростью набухания и изменениями внутриклеточной концентрации кальция.



Рис. 17. (А) Изменения $[Ca^{2+}]_i$, вызванные применением 50% гипотонического шока, наблюдаются сильно реже при более медленном замещении среды в экспериментальной камере. Процент клеток, отвечающих изменениями $[Ca^{2+}]_i$, был посчитан для поля зрения при двух различных скоростях замещения среды 0.4 и 0.8 мин⁻¹. Соответствующие размеры камеры были: 1.25 мл (n = 6) (стандартный размер) и 0.625 мл (n = 6) (уменьшенный размер). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистически достоверные различия по отношению к контролю (*p < 0.05, параметрический *t*-критерий Стьюдента). (Б) Типичные кинетики изменения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на стимуляцию 50% гипотоническим шоком в камере с уменьшенным объемом. Активация Р2Y рецепторов АТФ использовалась в качестве положительного контроля.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о способности клеток A549 восстанавливать объем после стимуляции 50% гипотоническим шоком при отсутствии изменений $[Ca^{2+}]_i$, что не поддерживает идею о внутриклеточном кальции как вторичном посреднике, вовлеченном в формирование RVD. Однако отметим, что проведенные эксперименты лимитированы границами применимости флуоресцентного индикатора Fura-2, не способного зарегистрировать локальные изменения $[Ca^{2+}]_i$ на субклеточном уровне и в прилегающих к мембране областях, т.е. в местах локализации Ca^{2+} -чувствительных каналов и рецепторов (Thul, Coombes et al. 2012). Для того, чтобы установить роль локальных увеличений внутриклеточной концентрации кальция в RVD, мы решили использовать высокоспецифичный и быстро действующий хелатор внутриклеточного кальция ВАРТА-АМ (Dargan and Parker 2003). Клетки A549, нагруженные ВАРТА-АМ, характеризовались слегка

измененной морфологией, что проявлялось уменьшением контактирующей с субстратом площади. Тем не менее, они успешно претерпевали 50% гипотонический шок без открепления от покровного стекла. Мы обнаружили, что хелатирование $[Ca^{2+}]_i$ незначительно уменьшает как скорость набухания, так и RVD (рис. 18). Хотя эффект замедления не был статистически достоверным, он является интересным в контексте предполагаемой роли кальция в регуляции VRAC как триггера (Basavappa, Chartouni et al. 1995) или как некоторой минимальной концентрации, необходимой для активации этих каналов (Szucs, Heinke et al. 1996). В этой связи в заключительной серии экспериментов мы исследовали роль кальциевой сигнальной системы в регуляции объем-чувствительных анионных каналов.



Рис. 18. Воздействие манипуляций с ионами кальция на кинетику набухания клеток и RVD. (**A**) Усредненные кинетики изменений объема, стимулированные применением 50% гипотонического раствора, в контрольных клетках A549 (n = 17); клетках, нагруженных BAPTA-AM (n = 11); клетках, перфузируемых не содержащим ионы кальция раствором (0 мМ [Ca²⁺]_o, n=5). Кинетики демонстрируют относительные значения объема, нормированные на значение объема клетки до набухания. (**b**) RVD был оценен как процент восстановления объема 20 минут спустя достижения значений максимального набухания (ΔVR_{20}). График демонстрирует значения ΔVR_{20} при воздействии 50% гипотонического шока для контрольных клеток A549 (n = 17); клеток A549, нагруженных Fura-2 (n = 11) или BAPTA-AM (n = 11); клеток, перфузируемых не содержащим кальций раствором (0 мМ [Ca²⁺]_o, n = 5).

Для проверки участия ионов кальция в регуляции VRAC нами было решено сохранить подход на уровне одиночной клетки, используя метод «пэтч-кламп». В типичном эксперименте, представленном на рис. **19**, ток через плазматическую мембрану клеток развивается через несколько минут после двукратного снижения тоничности внеклеточной среды на фоне неизменной концентрации ионов кальция и

магния. Добавление во внеклеточный раствор блокатора хлорных каналов NPPB (250 мкМ) подавляет нарастающий ток (рис. **19А** и **Б**), что указывает на участие в этом процессе объем-регулируемых анионных каналов, предположительно VRAC. Другим подтверждением активации каналов VRAC является выпрямление тока, направленное наружу, и инактивация тока при высоких значениях деполяризующих напряжений (рис. **19 В**, посередине) – типичные характеристики этой анион-транспортирующей системы (Mongin 2015).



Рис. 19. Регистрация активируемого набуханием тока в клетках А549 с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка». (А) Временная зависимость развивающегося тока, регистрируемого каждые 15 с в ответ на 100 мс импульсы от 0 до 40 мВ до и после применения 50% гипотонического шока. * Обозначения времени, когда записывались вольт-амперные характеристики (I-V), представленные на рис. 19Б. (Б) Вольт-амперные характеристики (I-V), в изотонических условиях (открытые круги); в гипотонических условиях (квадраты с крестом); в гипотонических условиях + NPPB (закрытые треугольники). (В) Токи в конфигурации «целая клетка» в ответ на изменение потенциала от -100 до +100 мВ с шагом в 20 мВ, происходящие от поддерживающего потенциала в 0 мВ. Токи были записаны в изотонических условиях (Изо), гипотонических условиях (Гипо) и гипотонических условиях + NPPB (Гипо + NPPB).

Мы повторили этот эксперимент при добавлении в раствор, находящийся в пипетке, хелатор внутриклеточного кальция ВАРТА в концентрации 10 мМ (рис. 20). В конфигурации пэтч-кламп «целая клетка» эта процедура приводит к поддержанию концентрации $[Ca^{2+}]_i$ на уровне ≤ 0.4 нМ. Мы не обнаружили отрицательного действия ВАРТА на кинетику и амплитуду развивающегося объем-чувствительного тока, а также на такие его характеристики, как выпрямление наружу, ингибирование NPPB и инактивация при высоких значениях деполяризующих напряжений (рис. 20).





Рис. 20. Регистрация активируемого набуханием тока в клетках А549 с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» при содержании 10 мМ ВАРТА в заполняющем пэтч пипетку растворе. (А) Временная зависимость развивающегося тока, регистрируемого каждые 15 с в ответ на 100 мс импульсы от 0 до 40 мВ до и после применения 50% гипотонического шока. **(b)** Вольт-амперные характеристики, зарегистрированные в изотонических условиях (открытые круги); в гипотонических условиях (квадраты с крестом); в гипотонических условиях + NPPB (закрытые треугольники). (В) Токи в конфигурации «целая клетка» в ответ на изменение потенциала от -100 до +100 мВ с шагом в 20 мВ, происходящие от поддерживающего потенциала в 0 мВ. Токи были записаны в изотонических условиях (Изо), гипотонических условиях (Гипо) и гипотонических условиях + NPPB (Гипо + NPPB).

В наших экспериментах объем-чувствительные токи в клетках А549 очень редко выходили на уровень плато: стабильное экспоненциальное увеличение доминировало до момента потери целостности клетки. Причиной этого, предположительно, является чрезмерное набухание в результате постоянного диализа клетки изотоническим CsCl из пипетки и блокирования катионами цезия проницаемости плазматической мембраны для ионов калия. Учитывая данное обстоятельство, мы сравнили NPPB-чувствительный и направленный наружу выпрямляющий ток через 7 минут после активации гипотоническим раствором в контрольных клетках и клетках, нагруженных ВАРТА. Полученные результаты показывают, что наличие внутриклеточного хелатора кальция незначительно замедляло скорость набухания (рис. 18А) и увеличивало в два раза, а не снижало объем-чувствительный ток (рис. 21). Это демонстрирует, что наличие ионов кальция не является необходимым условием для активации VRAC каналов при набухании клеток.



Рис. 21. NPPBчувствительный, направленный наружу выпрямляющий ток 7 минут активации гипотоническим после раствором в контрольных клетках (n = 6) и в клетках А549, нагруженных ВАРТА (n = 4). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистически достоверные различия по отношению к контролю параметрический (*p < 0.05,tкритерий Стьюдента).

Молекулярная структура VRAC оставалась загалкой ЛО недавних исследований, в которых семейство белков LRRC8 было идентифицировано как формирующее эти анионные каналы или регулирующее их активность (Qiu, Dubin et al. 2014), (Voss, Ullrich et al. 2014). Согласно нашим экспериментам эти белки не должны содержать кальций-зависимых функциональных доменов. С целью проверить это, мы проанализировали аминокислотные последовательности белков семейства LRRC8 (как указаны на http://www.uniprot.org/) на наличие Ca²⁺-связывающих доменов и участков, которые могут быть фосфорилированы при участии Ca²⁺ферментов, используя доступные интернете зависимых В приложения

(http://calcium.uhnres.utoronto.ca/, http://www.phosphosite.org/), а также визуальное выравнивание. Результаты анализа представлены на рис. 22, построенном с помощью программного обеспечения IBS (Версия 1.0) (Liu, Xie et al. 2015). Рисунок демонстрирует, что все паралоги семейства LRRC8 имеют участки, способные к взаимодействию напрямую с универсальным Ca²⁺-связывающим кальмодулином или которые могут быть фосфорилированы такими Ca²⁺-зависимыми киназами как CAMK I. CAMK Π И PKC. Являются обнаруженные последовательности ЛИ функциональными доменами или, иными словами, вовлечены ли эти домены в регуляцию открытия и проводимости VRAC? Полученные в нашей работе данные указывают на то, что в клетках А549 эти домены не вовлечены в активацию и поддержание активности VRAC, но могут принимать участие в инактивации этих каналов в условиях кальциевой перегрузки клеток.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетки млекопитающих поддерживают свой объем на стационарном уровне вне зависимости от изменения осмолярности среды, что как правило связано с активацией систем, обеспечивающих перенос через плазматическую мембрану вне- и внутриклеточных осмолитов. В нашей работе установлено, что в клетках эпителия легких A549 регуляторное уменьшение объема (RVD) в ответ на первоначальное набухание в гипотонической среде обусловлено активацией Ba²⁺-чувствительных К⁺каналов и объем-чувствительных анионных каналов (VRAC), обеспечивающих выход основных внутриклеточных осмолитов: ИОНОВ ИЗ клеток калия И хлора, соответственно. Увеличение концентрации внутриклеточного кальция ([Ca²⁺]_i), приводящее к активации Ca²⁺-зависимых ионных каналов, осуществляющих выход внутриклеточных осмолитов, рассматривается в качестве возможного триггера RVD. Для проверки этой гипотезы был разработан новый метод одновременной регистрации [Ca²⁺]_і и объема клеток. Однако, с помощью этого метода нами не обнаружено достоверных изменений [Ca²⁺]; как в процессе набухания клеток А549 в гипотонической среде, так и на стадии последующего за набуханием RVD. Более того, мы показали, что кинетические характеристики как RVD, так и VRAC не присутствия ионов кальция и от нагрузки клеток хелатором зависят от внутриклеточного кальция. В этой связи, мы исследовали роль цитоскелета и цитоплазматического биогеля как возможных сенсоров изменений объема клеток. Мы обнаружили увеличение амплитуды гипоосмотического набухания в клетках, пермеабилизированных дигитонином, т.е. в условиях отсутствия на плазматической мембране ионных градиентов. В пермеабилизированных клетках гипоосмотическое набухание подавлялось при нарушении структурной организации цитоскелета соединениями, воздействующими на микротрубочки и микрофиламенты. Мы также обнаружили, гипоосмотическое набухание как интактных, что так И пермеабилизированных клеток полностью устранялось при нарушении структуры цитоплазматического биогеля, вызванного 10-минутной предынкубацией при 48 °C. В интактных клетках предынкубация при 48 °C полностью устраняла активацию Ba²⁺чувствительных К⁺-каналов в гипоосмотической среде, не влияя на их активность в изоосмотических условиях. Полученные результаты позволяют предположить, что цитоплазматический биогель выполняет ключевую роль как в первоначальном увеличении объема клеток, вызванного их переносом в гипоосмотическую среду, так и при последующем восстановлении объема, опосредованном активацией K^+ и CI^- каналов. Дальнейшие исследования должны установить молекулярные механизмы вовлечения осмосенсорных свойств цитоплазмы в активацию ион-транспортирующих систем, вовлеченных в ауторегуляцию объема клеток.

выводы

1. Разработан новый метод одновременной регистрации изменений объема клеток и внутриклеточной концентрации кальция.

2. Ингибитор K⁺-каналов BaCl₂ устраняет увеличение проницаемости для K⁺ и опосредованный этими каналами процесс регуляторного уменьшения объема (RVD) клеток A549 в ответ на гипоосмотическое набухание.

3. Предынкубация при 48 °C уменьшает набухание клеток A549 в гипотонических условиях и полностью подавляет активацию Ba²⁺-чувствительных K⁺-каналов и связанный с этими каналами RVD. Ингибирующее действие температурной предобработки на гипоосмотическое набухание было также обнаружено при изучении клеток с разрушенной плазматической мембраной.

4. Разрушение микротрубочек и микрофиламентов устраняет действие гипотонической среды на объем пермеабилизированных клеток А549.

5. В условиях медленного гипотонического набухания не обнаружено увеличения [Ca²⁺]_i. Кинетика RVD существенно не изменялась как в отсутствие внеклеточного кальция, так и при нагрузке клеток хелатором внутриклеточного кальция.

6. С помощью метода «пэтч-кламп» установлено, что увеличение [Ca²⁺]_i не является необходимым условием для активации анионных каналов VRAC, вовлеченных в RVD.

7. Анализ аминокислотных последовательностей белков LRRC8 показал наличие нескольких участков, которые способны взаимодействовать с Ca²⁺- связывающим белком кальмодулином или фосфорилироваться Ca²⁺/кальмодулинзависимыми киназами. Наши экспериментальные данные не подтвердили факт вовлечения выше упомянутых доменов в процесс активации VRAC при гипотоническом набухании клеток A549, но не исключают их участия в ингибировании этих каналов в условиях кальциевой перегрузки.

25

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПОНОМАРЧУК ОЛЬГИ ОЛЕГОВНЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ В ДИССЕРТАЦИОННОМ СОВЕТЕ МГУ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.01.02 - БИОФИЗИКА:

1. **Пономарчук О.О.**, Будро Ф., Максимов Г.В., Григорчик Р., Орлов С.Н. Метод одновременной регистрации изменений внутриклеточной концентрации кальция и объема клеток. *Биофизика*, 2018; 63: 489-495.

2. **Пономарчук О.О.**, Максимов Г.В., Орлов С.Н. Регуляция объема клеток эпителия в норме и при патологии. *Бюллетень сибирской медицины*, 2017; 16 (4): 42–60.

3. **Ponomarchuk O**, Boudreault F, Orlov S, Grygorczyk R. Calcium is not required for triggering volume restoration in hypotonically challenged A549 epithelial cells. *Pflugers Arch.*, 2016; 468: 2075-2085.

4. Platonova A, **Ponomarchuk O**, Boudreault F, Kapilevich L.V, Maksimov G.V, Grygorczyk R, Orlov S.N. Role of cytoskeleton network in anisosmotic volume changes of intact and permeabilized A549 cells. *Biochim Biophys Acta.*, 2015; 1848: 2337-2343.

5. Platonova A, Boudreault F, Kapilevich L.V, Maksimov G.V, **Ponomarchuk O**, Grygorczyk R, Orlov S.N. Temperature-induced inactivation of cytoplasmic biogel osmosensing properties is associated with suppression of regulatory volume decrease in A549 cells. *J Membr. Biol.*, 2014; 247: 571-799.

ТЕЗИСЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Пономарчук О.О., Будро Ф., Шиян А.А., Максимов Г.В., Григорчик Р., Орлов С.Н. Параллельное измерение объёма клеток и внутриклеточной концентрации кальция. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация* под редакцией В. П. Зинченко и А. В. Бережнова, 2017; с. 274-279 (Тезисы).

2. **Ponomarchuk O,** Boudreault F, Orlov S, Grygorczyk R. Mechanosensitive ATP Release Involves A Non-Conductive Pathway: Evidence From Large Field Of View Real-Time Imaging. *Biophysical Journal*, 2017 (Тезисы).

3. **Ponomarchuk O**, Boudreault F, Grygorczyk R, Orlov S. Cell Volume Regulation In A549 Lung Epithelial Cells. *11th International Congress on Cell Volume Regulation Abstracts Book*, 2016 (Тезисы).

4. **Ponomarchuk O**, Boudreault F, Grygorczyk R, Orlov S. Impact of Ca²⁺ Signalling on Volume Regulated Anion Channel in A549 Alveolar Cells: Implication for Alveolar Fluid Clearance. *Online Abstract Issue of the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Volume 193, 2016 (Тезисы).

5. **Ponomarchuk O**, Boudreault F, Grygorczyk R. Role of intracellular calcium signalling in regulatory volume decrease of A549 lung epithelial cells. *Congrès québécois en santé respiratoire Abstracts Book, 2015* (Тезисы).

6. **Ponomarchuk O.O**, Boudreault F, Orlov S, Grygorczyk R. Regulatory Volume Decrease in A549 Lung Epithelial Cells. *17^e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM Abstracts Book*, 2014 (Тезисы).