

На правах рукописи

Шиян Александра Андреевна

**РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК ПРИ АПОПТОЗЕ, НЕКРОЗЕ И
АКТИВАЦИИ ПУРИНЭРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ**

Специальность 03.01.02 – “биофизика”

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский Государственный Университета имени М.В. Ломоносова», а также в лаборатории патофизиологии ионного транспорта медицинского факультета университета г. Монреаль, Канада.

Научные руководители:

Максимов Георгий Владимирович,

доктор биологических наук, профессор,

заведующий лабораторией биофизики клетки в МГУ имени М.В. Ломоносова,

Орлов Сергей Николаевич,

доктор биологических наук, профессор

заведующий лабораторией физико-химии биологических мембран в МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

Зинченко Валерий Петрович

доктор биологических наук, профессор,

заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации в Федеральном

государственном бюджетном учреждении науки Институт биофизики клетки

Российской академии наук

Пинелис Всеволод Григорьевич

доктор медицинских наук, профессор,

заведующий лабораторией клеточных и молекулярных технологий в Федеральном

государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр здоровья

детей»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__»_____ 2015 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д. 501.001.96 Биологического факультета Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д.1 корп. 12, кафедра биофизики

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «__»_____2015 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Клетки эукариот подвержены осмотическому давлению, возникающему в силу неравновесного распределения белков, нуклеиновых кислот и непроникающих через мембрану низкомолекулярных соединений (аминокислоты, углеводные метаболиты и др.). Чтобы противостоять накоплению воды, сопутствующему повышению содержания органических осмолитов, клетки откачивают с помощью Na^+/K^+ -АТФазы ионы натрия, что приводит к созданию доннановского равновесия (Mongin and Orlov 2001). В условиях поддержания постоянной осмолярности плазмы изменения трансмембранного переноса ионов и органических осмолитов, а также синтеза и распада макромолекул – наиболее частые причины модификации объема клеток. Так, например, инсулин и глутамат вызывает набухание гепатоцитов и нейронов, соответственно (Lang et al. 1998). В обоих случаях увеличение объема клеток обусловлено накоплением NaCl и воды как следствие активации ионных переносчиков ($\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и Na^+/H^+ -обмена) и Na^+ каналов. Предполагается, что резкое набухание и сжатие клеток является непосредственными причинами двух морфологически различных типов клеточной смерти – некроза и апоптоза соответственно (Okada et al., 2001).

В процессе эволюции клетки выработали молекулярные системы, обеспечивающие постоянство клеточного объема за счет изменения транспорта одновалентных ионов и низкомолекулярных органических соединений. Эти системы включают сенсор клеточного объема, активируемые ими системы внутриклеточной сигнализации, и исполнительные системы, которые в ответ на набухание или сжатие компенсируют изменения объема посредством выброса (RVD) или накопления осмолитиков (RVI). В последние годы достигнут существенный прогресс в понимании природы сигнальных процессов, контролирующих RVD и RVI (Hoffmann, 1989; Lang et al., 1998). Напротив, количество комплексных физических методов контроля за изменениями объема при действии факторов, приводящих к смерти клеток, сравнительно невелико. Так, например, светорассеяние, рефрактометрия и счётчик Культера

используются только при исследовании гомогенных клеток, находящихся в суспензии. Измерение объема внутриклеточной воды с помощью проникающих радиоактивных соединений требует длительной инкубации и дополнительного отмывания клеток от меток, локализованных во внеклеточном пространстве. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что получение трехмерного изображения клетки с помощью лазерной интерференционной или голографической микроскопии не может быть использовано для этих целей, так как регистрируются изменения не только объема, но и коэффициента преломления цитоплазмы (Yusirovich et al., 2011). Для исследований на нативной клетке не применим метод тушения флуоресценции внутриклеточных зондов, так как не достигается их равномерное распределение в цитоплазме (Solenov et al., 2004), а также развиваются деструктивные фотодинамические эффекты (Kunz et al., 1997).

Целью работы было изучение кинетики изменения объема при действии индукторов клеточной смерти и активации пуриnergических рецепторов с помощью метода реконструкции поверхности клетки при сопоставлении 2-х фазовоконтрастных изображений, полученных в перпендикулярных плоскостях (DISUR).

В связи с целью исследования были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать методологию применения техники DISUR для исследования изменений объема гладкомышечных и эпителиальных клеток, прикрепленных к подложке, т.е. в условиях, приближенных к *in vivo*.
2. Изучить кинетику изменения объема при действии факторов, приводящих к двум морфологически различным видам клеточной смерти: апоптозу гладкомышечных клеток и некрозу клеток эпителия почечных канальцев.
3. Изучить роль пуриnergических рецепторов и интермедиатов запускаемого ими сигнального каскада в регуляции объема клеток эпителия почечных канальцев.
4. Изучить роль изменений объема в гибели клеток при устранении ростовых факторов, добавлении ингибитора протеинкиназы C стауроспорина и ингибитора Na^+ , K^+ -АТФ-азы убаина.

Научная новизна и практическая значимость работы. С помощью техники DISUR установлено разнонаправленное изменение объема клеток гладкой мускулатуры при действии индукторов апоптоза. Показано, что в клетках эпителия почечных канальцев активация $P2Y_2$ рецепторов приводит к 2-х кратному уменьшению их объема и экспрессии гена раннего ответа *c-Fos*. Оба процесса подавляются ингибиторами K^+ - и Cl^- каналов, что указывает на важное значение регуляции объема в функционировании пуриnergической сигнальной системы. Доказано, что зарегистрированные изменения объема не является первичным механизмом гибели клеток в ответ на устранение ростовых факторов, добавлении стауроспорина и ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы убаином. Полученные результаты имеют большое значение для изучения механизма клеточной смерти и поиска новых подходов для лечения болезней, связанных с изменением объема клеток.

Положения, выносимые на защиту

- 1.** Увеличение объема клеток в ответ на ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы убаином не является причиной нарушения целостности плазматической мембраны и смерти клеток эпителия почечных канальцев с характерными маркерами некроза.
- 2.** Уменьшение объема клеток не может считаться универсальным маркером апоптоза. Ни набухание, ни сжатие гладкомышечных клеток, отмеченные при устранении ростовых факторов и добавке стауроспорина, не являются достаточным условием для запуска апоптоза.
- 3.** Активация $P2Y_2$ пуриnergических рецепторов сопровождается длительным уменьшением объема клеток эпителия почечных канальцев за счет Ca^{2+} -чувствительных K^+ каналов и выхода K^+ . Уменьшением объема в ответ на активацию $P2Y_2$ рецепторов не влияет на жизнеспособность клеток и является причиной увеличения экспрессии гена раннего ответа *c-Fos*.

Апробация работы. Апробация работы проведена на заседаниях кафедры биофизики и лаборатории физической химии биомембран Биологического факультета МГУ. Основные результаты диссертационной работы были изложены

на XXVI симпозиуме группы по изучению мембранных белков университета г. Монреаль (2011); 9-ом Международном конгрессе по изучению регуляции объема клетки (Тюбинген, 2011); 14-ом конгрессе студентов, аспирантов и стажеров ун-та г. Монреаль (2011); 4-ом Российском биофизическом конгрессе (Нижний Новгород 2012); 10-ом Международном конгрессе по изучению регуляции объема клетки (Москва, 2013). По теме диссертации **опубликовано 11 печатных работ.**

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 307 источников. Работа содержит 25 страницы машинописного текста, 10 рисунков и 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовались клетки эпителия почечных канальцев собаки (C11-MDCK), клетки гладкой мускулатуры аорты крысы (VSMC) и клетки VSMC, трансфицированные E1A аденовирусом (E1A-VSMC). При выборе объектов исследования исходили из того, что для C11- MDCK клеток в наиболее полной мере изучена пуриnergическая регуляция ионных транспортеров, вовлеченных в RVD и RVI. В этих же объектах (но не VSMC) ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы убаином вызывает гибель клетки с проявлением маркеров некроза. В отличие от VSMC при дефиците в среде ростовых факторов и наличии стауроспорина наблюдается гибель клеток E1A-VSMC с проявлением маркеров апоптоза.

Для **измерения клеточного объёма** использовали метод реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (Double Image Surface Reconstruction Technique, DISUR). Значения клеточного объёма, поверхности и высоты клетки были рассчитаны из реконструированных клеточных моделей, как описано ранее. **Внутриклеточное содержание Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)** измеряли с помощью флуоресцентного зонда fura 2-AM на спектрофлуорометре SPEX FluoroMax (Edison, NJ). Концентрация $[\text{Ca}^{2+}]_i$ была посчитана как $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, где K_d это константа диссоциации Ca^{2+} -fura на 2 комплекса (224 нМ при 37°C),

и $R = F_{340}/F_{380}$ отношения флуоресценции при $\lambda_{ex} = 340$ и 380 нм. Для определения F_{max} , клетки подвергались воздействию 0.5 мкМ иономицина в присутствии 1 мМ CaCl_2 . Для определения F_{min} , добавлялся MnCl_2 , до конечной концентрации 2 мМ. **Внутриклеточное содержание K^+ , Na^+ и Cl^-** определяли по равновесному распределению изотопов ^{86}Rb , ^{22}Na и ^{36}Cl , соответственно. Для **оценки жизнеспособности клеток использовали комплексный подход:** контролировали относительное содержание клеток, прикрепленных к подложке; образование фрагментов хроматина; активность каспазы-3; выход из митохондрий цитохрома C и выход из клеток лактатдегидрогеназы (LDH). Для определения содержания гена раннего ответа c-Fos использовали метод разделения белков с помощью **электрофореза в полиакриламидном геле** и соответствующие антитела в комбинации с **Вестерн-блотом**. **Содержания белка** определяли модифицированным методом Лоури и методом Бредфорда. Для оценки статистической достоверности различий применяли параметрический t-критерий Стьюдента. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение объёма клеток при действии ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы

Как отмечалось выше, Na^+ , K^+ -АТФаза вовлечена в поддержание объема клеток посредством регуляции внутриклеточной концентрации одновалентных катионов. Было установлено, что блокирование Na^+ , K^+ -АТФазы убаином и другими кардиотоническими стероидами (КТС) оказывает тканеспецифическое влияние на жизнеспособность клеток. Так, например, КТС не влияли на жизнеспособность клеток VSMC (Orlov et al., 1999; 2001) и астроцитов крысы (Akimova et al., 2006), но приводили к гибели MDCK клеток (Ledbetter et al., 1986; Bolivar et al., 1987) и эндотелиальных клеток аорты свиньи (Orlov et al., 2004). Было предположено, что увеличение объема клетки в ответ на нарушение распределения ионов может быть достаточным условием для разрушения плазматической мембраны (Okada et al., 2001; Carini et al., 1999). Для проверки

этой гипотезы мы сравнили кинетику изменения клеточного объёма при действии убаина на КТС-чувствительные C11-MDCK и КТС-устойчивые VSMC клетки.

Мы обнаружили, что в обоих типах клеток полная инверсия соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ происходит через 2 часа после добавления убаина. Как видно из данных, приведенных в **Таблице 1**, 24-часовое ингибирование Na^+,K^+ -АТФазы убаином приводило к гибели C11-MDCK клеток, проявляющейся в их отрыве от подложки, и появлению таких маркеров некроза как высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH). В отличие от C11-MDCK клеток 24-часовая инкубация с убаином не влияла на выживаемость клеток VSMC. Исходя из того, что 2-х часовая инкубация с убаином приводит к полномасштабной потере K^+_i и накоплению Na^+_i , мы сопоставили изменения клеточного объёма после 3-х часового ингибирования Na^+,K^+ -АТФазы. **Таблица 2** показывает, что подавление Na^+,K^+ -АТФазы убаином увеличивало объём C11-MDCK клеток на 20%. Следует отметить, что примерно такое же увеличение объёма было обнаружено в КТС-резистентных VSMC клетках.

Таблица 1. Действие убаина на отрыв от подложки (% от общего количества клеток) и высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) (% от общего содержания) из клеток эпителия почечных канальцев (C11-MDCK) и клеток гладкой мускулатуры сосудов (VSMC)

Среда	C11-MDCK		VSMC	
	Отрыв от подложки, %	Выброс LDH, %	Отрыв от подложки, %	Выброс LDH, %
1. Контроль	6±3	7±3	4±1	9±4
2. убаин	78±9	89±7	5±3	6±2
$P_{1,2}$	<0.001	<0.001	NS	NS

Таблица 2. Изменения объёма клеток эпителия почечных канальцев и клеток гладкой мускулатуры сосудов через 3 часа инкубации с убаином

Среда	Клеточный объём, %	
	C11-MDCK	VSMC
Контроль (среда А)	104±5 (n=4)	101±3 (n=4)
Среда А + убаин	120±6 (n=7)	113±7 (n=5)

В последующих экспериментах мы увеличили время инкубации и измеряли объём C11-MDCK клеток за несколько минут до их смерти. Обнаружено, что за 5-10 минут до гибели обработанных убаином C11-MDCK клеток их объём увеличивался на ~30-40% (Рис.1).

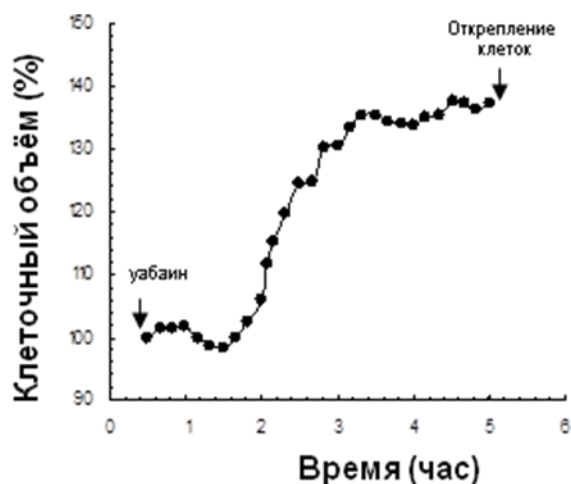


Рис. 1. Кинетика изменения объёма в C11-MDCK клетках при действии 3 мкМ убаина.

В какой мере отмеченные изменения объема могут быть причиной гибели C11-MDCK клеток? Для ответа на этот вопрос, мы сравнили кинетику увеличения объема и выброса LDH в клетках, помещенных в раствор, осмолярность которого уменьшена на 98%. (Рис. 2). Установлено, что увеличение в 2-3-раза объема C11-MDCK клеток достигалось через ~3 мин, в то время как его максимальное увеличение (в ~5-раз) через ~10 мин после уменьшения осмолярности среды от ~310 до 15 мОсм. В параллельных экспериментах, мы не обнаружили статистически достоверного выброса LDH через 3 мин, который резко увеличивался через 10 мин после гипотонического шока (Таблица 3). Итак, деструкция плазматической мембраны при действии убаина не обусловлена увеличением объема клетки.

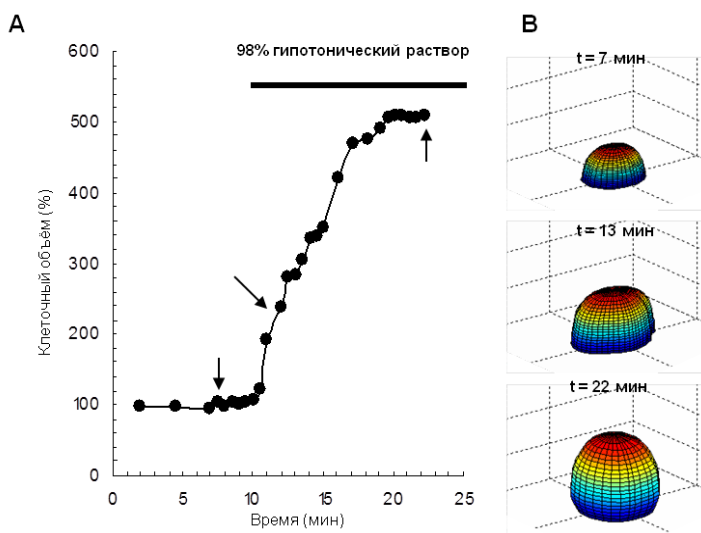


Рис. 2. А. Кинетика изменения объема С11-MDCK клеток при инкубации в среде, содержащей 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ и 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4). В. 3D модели клеток, соответствующие временные точки (~7, 13 и 22 мин) отмечены стрелками.

Механизм, лежащий в основе независимого от объема клеток разрыва плазматической мембраны и смерти клеток при действии КТС, остаётся плохо изученным. Известно, что наряду с увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ КТС могут запускать Na^+_i, K^+_i -независимые сигнальные каскады, включая, в том числе митоген-активируемые протеин киназы (МАРК), фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K), PI3K-зависимую протеин киназу В, фосфолипазу С (PLC), осцилляции $[Ca^{2+}]_i$ и увеличение продукция активных форм кислорода (АФК) (Xie et al., 2003; Aperia, 2007; Schoner et al., 2007). В нашей лаборатории участия PLC, Ca^{2+}_i и АФК в индуцированной убаином смерти С11- и С7-MDCK клеток не обнаружено (Akimova et al., 2005). Показано, что гибель MDCK клеток, обработанных КТС, уменьшалась при закислении цитоплазмы (Akimova et al., 2006), блокировании р38 МАРК киназы (Akimova et al., 2009) и трансфекции клеток КТС-устойчивой $\alpha 1-Na^+, K^+$ -АТФазой, присутствующей в клетках грызунов (Akimova et al., 2010). Относительное участие различных субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы также как и *de novo* экспрессированных H^+ -чувствительных генов в клеточной смерти, вызванной КТС, должно быть изучено более подробно.

Таблица 3. Клеточный объём и выход LDH из C11-MDCK клеток в условиях гипосмотической среды

	Клеточный объём (%)	Выброс LDH (%)
1. 10-мин действия изоосмотической среды	103±7 (n=3)	12±6 (n=4)
2. 3-мин действия гипосмотической среды	248±62 (n=5)	17±8 (n=4)
3. 10-мин действия гипосмотической среды	494±26 (n=5)	91±5 (n=4)
P _{1,2}	NS	NS
P _{1,3}	<0.0001	<0.0005

Изменение объема E1A-VSMC при действии индукторов апоптоза

Ранее было предположено, что в отличие от некроза уменьшение объема клеток является обязательным маркером апоптоза. Более того, было сформулирована гипотеза о том, что апоптотическое сжатие (apoptotic volume decrease, AVD) является пусковым механизмом программируемой смерти клеток (Okada et al., 2001). В этой связи мы использовали разработанную методологию DISUR для изучения кинетики изменения объема E1A-VSMC клеток при устранении ростовых факторов и добавлении староспорина – двух канонических индукторов апоптоза. В самом деле, нами было установлено, что 4-5-часовая инкубация E1A-VSMC клеток в среде, лишенной ростовых факторов, приводила к 10-ти кратной активации каспазы-3 и 15-ти кратному увеличению фрагментации хроматина (**Рис. 3А**). С помощью фазовоконтрастной микроскопии нами было обнаружено существенное накопление плавающих тел (**Рис. 3В**), содержащих пикнотичные остатки ядер (т.н. апоптотические тельца).

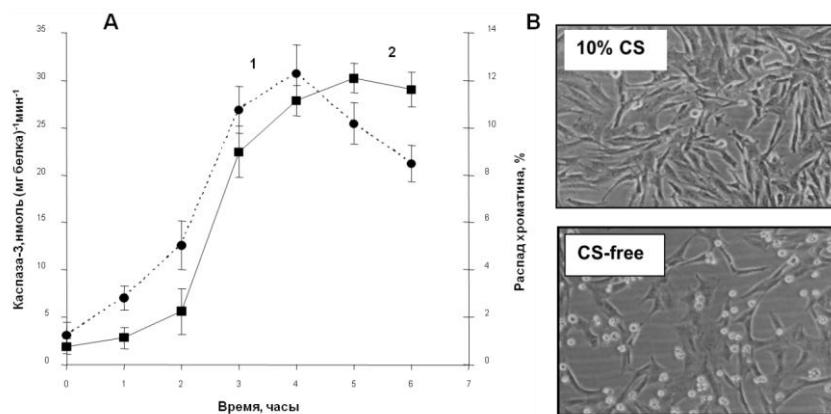


Рис. 3. А. Кинетика активации каспазы-3 (1) и расщепление хроматина (2) в E1A-VSMC клетках, инкубированных в среде, не содержащей факторов роста. **В.** Фазовоконтрастная микроскопия клеток через 5 часов после инкубации в контрольной среде (10% CS) удаления факторов роста (CS-free).

Данные, приведенные на **рисунке 4А** показывают, что после 30-60-мин лаг-фазы объём E1A-VSMC клеток, лишенных ростовых факторов, увеличивался на ~30-50%. Процесс набухания клеток завершался их быстрым апоптотическим разрушением с образованием пузырьков плазматической мембраны, и заканчивающимся через 10-15 мин формированием множества апоптотических тел (**Рис. 4С**). Следует отметить, что увеличение объема E1A-VSMC клеток предшествовало активации каспазы-3 и расщеплению хроматина.

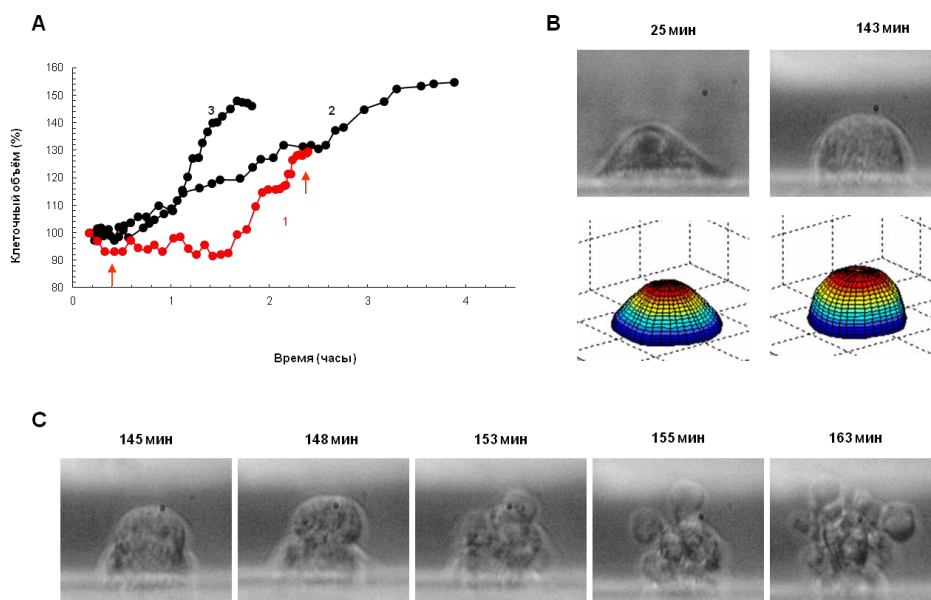


Рис. 4. А. Репрезентативные кинетики изменения объёма E1A-VSMC клеток в отсутствии факторов роста. **В.** *Вверху:* Вид сбоку клетки, чья кинетика изменения объёма показана красным, на времена, отмеченные стрелками. *Внизу* 3D модель той же клетки в те же точки

времени, полученная с помощью методики DISUR. **С.** Изображения клетки сбоку, чья динамика изменения объёма показана красным, свидетельствующие об их апоптотической смерти.

Как и в случае дефицита ростовых факторов, 5 час инкубация E1A-VSMC с индуктором апоптоза – стауроспорином, приводила к активации каспазы 3 и накоплению фрагментов хроматина. Однако, в отличие от среды, лишенной факторов роста, стауроспорин через 90 мин запускал уменьшение клеточного объёма на ~30% (Рис. 5). Следует отметить, что не смотря на разнонаправленное изменение объема клетки, обработанные стауроспорином, после 2-5-часов максимального сжатия, меняли морфологию, отпочковывали фрагменты плазматической мембраны и подвергались разрушению по механизму апоптотического колапса (Рис. 5D).

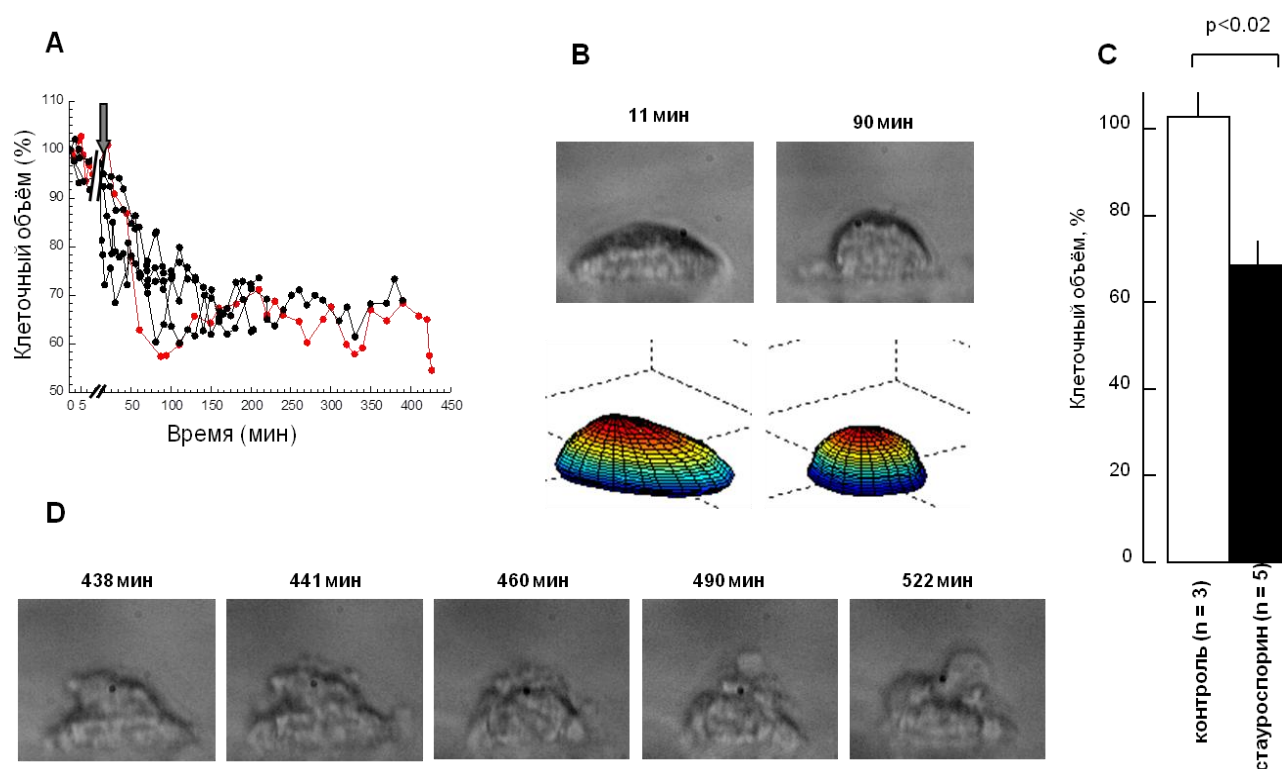


Рис. 5. А. Кинетики изменения объёма, запускаемые в E1A-VSMC клетках добавлением 1 мкМ стауроспорина. В. *Вверху*: Изображения сбоку клеток, чья кинетика изменения объёма показана красным через 11 и 90 минут после добавления стауроспорина. *Внизу*: Соответствующие 3D модели этой же клетки, полученные с помощью методики DISUR. С. Объём E1A-VSMC через 90 мин инкубации в присутствии и отсутствии стауроспорина. D. Изображения, показывающие апоптотический коллапс клеток при действии стауроспорина, кинетика изменения клеточного объёма которого показана **красным**.

Итак, полученные нами данные противоречат гипотезе о том, что сжатие является универсальным маркёром апоптоза и участвует в запуске и/или развитии

этого типа клеточной смерти (Okada et al., 2001). Действительно, мы обнаружили разнонаправленное изменение объема E1A-VSMC клеток при дефиците ростовых факторов и добавлении стауроспорина – двух канонических индукторов апоптоза. Показано, что увеличение клеточного объёма на ~50%, а не сжатие предшествует инициации апоптоза в клетках, лишенных ростовых факторов. В связи с полученными данными можно предположить следующие механизмы разнонаправленного изменения объёма апоптотических клеток. Первое, изменение объёма клеток, притерпевающих апоптоз, находится под контролем тканеспецифичного набора мембранных транспортёров, участвующих в поддержании электрохимического градиента внутриклеточных осмолитиков. Второе, стимулы апоптоза различной природы оказывают различное влияние на активность транспортирующих систем, приводящих к изменению объёма клеток. Третье, уменьшение клеточного объёма, отмеченное в клетках, притерпевающих апоптоз, может быть частично объяснено вторичными событиями: почкование плазматической мембраны и формирование апоптотических тел, а не первичным сжатием, запускаемым изменением ионного градиента и воды.

С целью выявления роли обнаруженных нами изменений объёма в индукции апоптоза мы сопоставили активность каспазы 3, накопление фрагментов хроматина и объём E1A-VSMC клеток, при их помещении клеток в гипер- и гипотоническую среды. В этих экспериментах было установлено, что уменьшение осмолярности среды за счет снижения [NaCl] от 135 до 85 мМ приводило к увеличению клеточного объёма на ~50%, который восстанавливался через 30 мин из-за активации систем, участвующих в RVD. Последующая перфузия E1A-VSMC изосмотической средой сопровождалось сжатием клеток, которое исчезало со временем из-за включения механизмов, обеспечивающих RVI. Увеличение осмолярности среды при добавлении 150 и 300 мМ маннитола уменьшало клеточный объём на ~20 и 40%, соответственно. В этих экспериментах нами было установлено, что ни активность каспазы-3, ни разрушение хроматина не меняются при гипоосмотическом набухании, изосмотическом сжатии и умеренном гиперосмотическом сжатии, вызванном добавлением 150 мМ маннитола

(Таблица 4), т.е. при воздействиях, вызывающих изменения объема клеток в диапазоне, отмеченном при устранении ростовых факторов (Рис. 4) и добавлении стауроспорина (Рис. 5). Таким образом, данные наших исследований указывают на ведущую роль в развитии апоптоза объем-нечувствительных механизмов, связанных с активацией Fas-L-рецепторов, протеаз, транскляптаминаз и высвобождением цитохрома С, описанных ранее (Duvall, Wyllie, 1986; Cotter et al., 1990; Jordan, Harrison, 1999; Bortner, Cidlowski, 2011).

Таблица 4. Действие анизосмотической среды на клеточный объём, активность каспазы-3 и расщепление хроматина в E1A-VSMC клетках

	Клеточный объём [#] , %	Активность каспазы-3, , нмоль (мг белка) ⁻¹ мин ⁻¹		Расщепление хроматина, %	
		3 ч	24 ч	3 ч	24 ч
Контроль (изосмотическая среда)	100	0.70±0.20	0.88±0.08	1.91±0.34	2.99±0.27
Гипосмотическое набухание	153±11 (n=5)	0.78±0.11	1.09±0.15	2.48±0.42	3.13±0.33
Изосмотическое сжатие	77±7 (n=5)	0.64±0.09	0.95±0.14	1.33±0.19	2.93±0.30
Умеренное гиперосмотическое сжатие	76±4 (n=3)	0.77±0.14	1.44±0.30	2.45±0.27	4.48±0.61
Сильное гиперосмотическое сжатие	52±5 (n=3)	0.98±0.23	7.88±0.66*	3.77±0.41	22.01±2.22*

*p<0.001 в сравнении с контрольными значениями

Пуринэргическая регуляция объема C11-MDCK клеток

С целью дальнейшего изучения роли изменений клеточного объема в гибели клеток мы сопоставили влияние агонистов и антагонистов пуринэргических рецепторов на объем и жизнеспособность C11-MDCK клеток. В начальных экспериментах было обнаружено, что при добавлении в среду 50 мкМ АТФ наблюдается уменьшение объема C11-MDCK клеток, которое за 2-3 ч

достигало 40% от его исходных значений (**Рис.6**). Как и в случае АТФ, 30 мин перфузия с 50 мкМ УТФ вызывала уменьшение объема C11-MDCK клеток на ~45%.

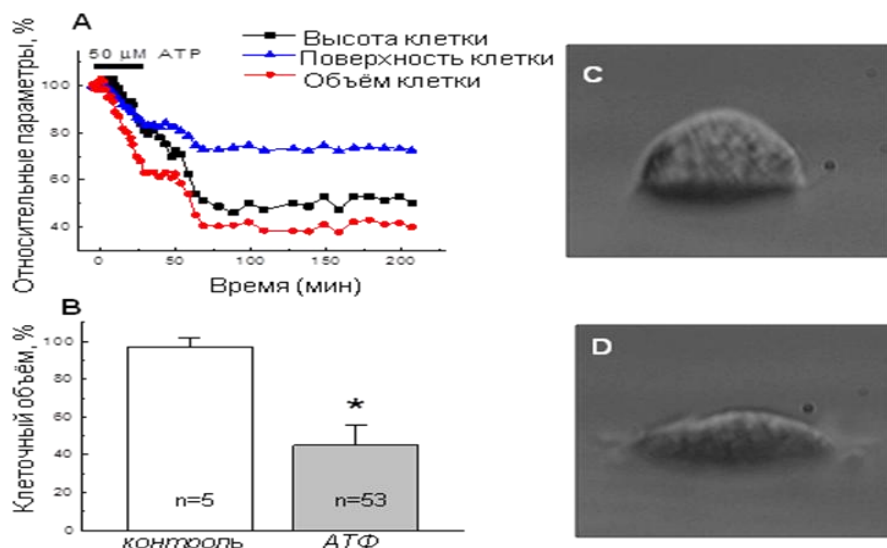


Рис. 6. А: Кинетика изменения высоты, площади поверхности и объема C11-MDCK клеток при добавлении АТФ. Исходная величина объема принята за 100%. **В:** Изменения объема в клетках после 60 мин инкубации в контрольной среде (контроль) или в течение 30 мин в среде, содержащей 50 мкМ АТФ, и 30 мин в среде без АТФ (*АТФ*). **С, D:** Вид сбоку клетки до добавления АТФ (**С**) и через 30-мин инкубации с 50 мкМ АТФ (**D**).

Известно, что АТФ активирует все пуриnergические рецепторы, в то время как УТФ является селективным агонистом P2Y₂, P2Y₄ и P2Y₆ рецепторов (Burnstock, 2007). Ранее в нашей лаборатории было установлено, что C11-MDCK клетки содержат P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁ и P2Y₁₂ рецепторы (Akimova et al., 2006). В большинстве типов клеток активация P2Y приводит к выходу Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и увеличению концентрации Ca²⁺ в цитоплазме ([Ca²⁺]_i) (Burnstock, 2002). В связи с этим, мы исследовали влияние антагонистов P2Y₁ и P2Y₆ рецепторов (соединений MRS2179 и MRS2578, соответственно) и антагониста P2X₂, P2X₅, P2Y₂, P2Y₄ и P2Y₁₁ рецепторов (сурамин) на изменения клеточного объема и [Ca²⁺]_i при действии на клетку АТФ и УТФ. Установлено, что сурамин (но не MRS2179 и MRS2578) полностью устранял уменьшение объема и на 80-90% снижал прирост [Ca²⁺]_i, вызванное действием АТФ и УТФ на

рецепторы. Полученные результаты доказывают, что уменьшение клеточного объема связано с активацией $P2Y_2$ рецепторов и снижением концентрации Ca^{2+}_i .

Известно, что $P2Y_2$ рецепторы в C11-MDCK клетках увеличивают содержание таких вторичных посредников как $[Ca^{2+}]_i$ и цАМФ и активируют протеинкиназу C (PKC) (Orlov et al., 1999; Akimova et al., 2006). В этой связи, мы исследовали роль этих процессов в уменьшении объема C11-MDCK клеток. Установлено, что как Ca^{2+} ионофор иономицин, так и активатор Ca^{2+} -чувствительных изоформ PKC, 4β -PMA, приводили к развивающемуся во времени сжатию C11-MDCK клеток. Важно, что при последовательном введении 4β -PMA и иономицина мы наблюдали аддитивный эффект, и после 1 часа инкубации клеточный объем, как и в случае добавления АТФ, уменьшался на ~60% (Рис. 7).

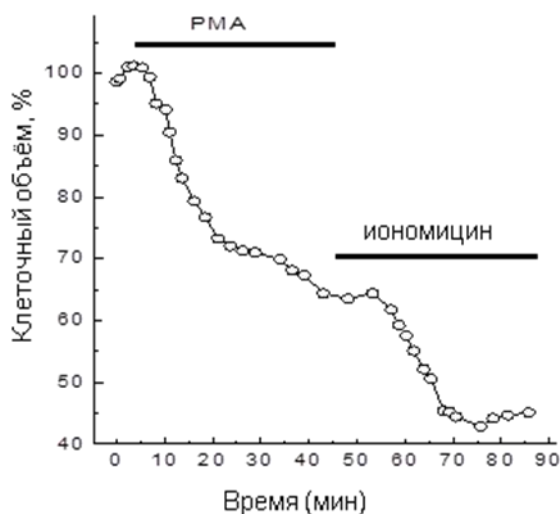


Рис. 7 Изменение объема клетки C11-MDCK при действии Ca^{2+} ионофора иономицина и активатора PKC 4β -PMA.

Для дальнейшего исследования роли Ca^{2+} в уменьшении объема мы нагрузили C11-MDCK клетки хелатором внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА-АМ и инкубировали в среде, свободной от Ca^{2+} и содержащей хелатор внеклеточного Ca^{2+} EGТА. Было обнаружено, что эта процедура блокировала АТФ-зависимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i = 673 \pm 91$ (n=4) и 67 ± 33 нМ (n=3) в контроле и в присутствии хелаторов Ca^{2+} , соответственно, $p < 0.001$) (Рис. 8) и полностью предотвратила сжатие C11-MDCK клеток, запускаемое АТФ, УТФ и 4β -PMA. Эти

результаты указывают на ключевую роль $[Ca^{2+}]_i$ и Ca^{2+} -зависимых изоформ РКС в клеточном сжатии, запускаемом агонистами $P2Y_2$ рецепторов.

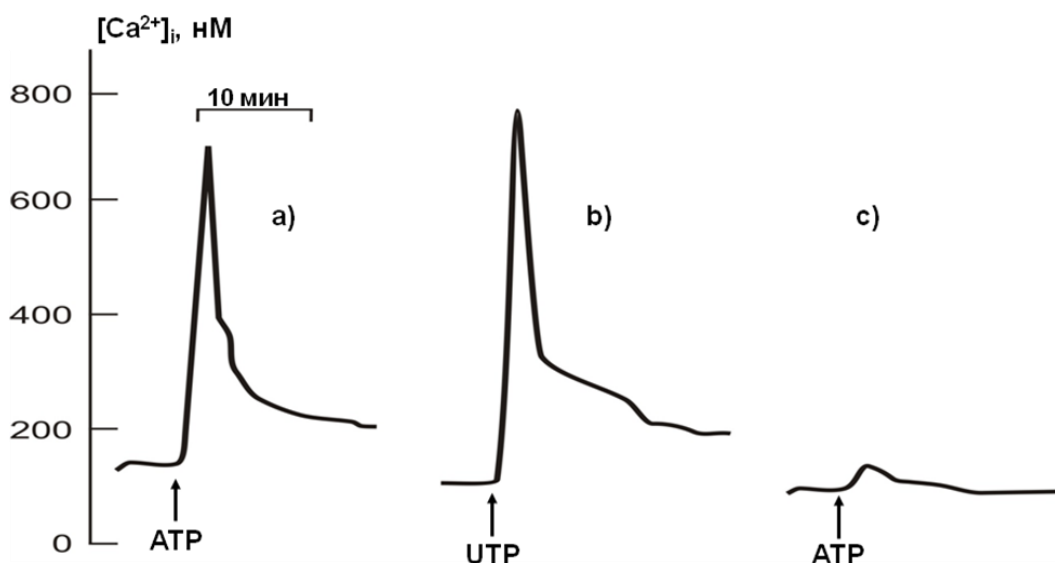


Рис. 8. Динамика изменения концентрации внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ в C11-MDCK клетках при действии 50 мкМ АТФ (а, с) и УТФ (b). а, b) – Клетки перфузировались контрольной средой; с) – клетки перфузировались в течение 30 мин 20 мкМ ВАРТА-АМ в среде без Ca^{2+} , содержащей 0.2 мМ EGTA, после чего добавляли АТФ.

Так как K^+ и Cl^- являются основными внутриклеточными осмолитиками, в следующей серии экспериментов мы исследовали действие ингибиторов ионных каналов на АТФ-индуцированное уменьшение объема клеток. Паксиллин и ибериотоксин известны как селективные ингибиторы Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов высокой проводимости (BK_{Ca}), карибдотоксин является ингибитором BK_{Ca} и Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов умеренной проводимости (IK_{Ca}), в то время как клотримазол блокирует IK_{Ca} , но не BK_{Ca} . Мы обнаружили, что карибдотоксин, ибериотоксин и паксиллин полностью предотвращают клеточное сжатие, запускаемое АТФ. Отметим, что ни исходный клеточный объем, ни АТФ-запускаемое клеточное сжатие не изменились при действии клотримазола (Таблица 5). Известно, что 5-нитро-2-(3-фенилпропиламинобензойная кислота (NPPB) блокирует все известные анионные каналы (Schultheiss G, Diener M. 1998). Мы обнаружили, что это соединение устраняет сжатие C11-MDCK клеток в ответ на добавление АТФ (Таблица 5).

Данные, приведенные в **Таблица 6** показывают, что инкубация C11-MDCK клеток с АТФ приводила к уменьшению внутриклеточного содержания K^+ и Cl^- на 33% и 41%, соответственно. Мы обнаружили, что ингибирование Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов паксидином, ибериотоксином и карибдотоксином полностью предотвратило потерю K^+ и Cl^- , запускаемую АТФ. Действие АТФ на внутриклеточный состав ионов также снижалось при действии ингибиторов анионных каналов NPPB (Таблица 6). Эти данные свидетельствуют о том, что уменьшение объема клеток в ответ на активацию $P2Y_2$ рецепторов вызвано утечкой K^+ и Cl^- через VK_{Ca} и NPPB-чувствительные анионные каналы.

Из таблицы 6 следует, что при активации пуриnergических рецепторов общее содержание одновалентных катионов в клетках C11-MDCK снижалось на 34%. В соответствии с принципом электронейтральности это должно сопровождаться потерей анионов и снижением объема внутриклеточной воды на 34%. Мы, однако, обнаружили, что в этих условиях объем C11-MDCK клеток уменьшался на ~52% (Таблица 6). Это несоответствие может быть объяснено двумя причинами. Первое, наряду с потерей одновалентных ионов сжатие клеток обусловлено высвобождением аминокислот и других органических осмолитиков. Второе, существенная часть калия как основного неорганического осмолитика находится в связанном с белками состоянии и не принимает участия в регуляции объема клеток. Последнее предположение подтверждено рядом исследователей (Pollack, 2002). Данные, приведенные в Таблице 6, показывают, что в соответствии с уравнением Нернста потенциал плазматической мембраны C11-MDCK клеток при добавлении АТФ увеличивается с -81 мВ до -56 мВ. По-видимому, деполяризация мембраны обусловлена входом Ca^{2+} , что в свою очередь приводит к активации K^+ каналов и диссипации калиевого градиента (Таблица 2).

Таблица 5. Действие ингибиторов ионных каналов на сжатие C11-MDCK клеток при добавлении АТФ

Добавки, μM	Клеточный объём (%)
1. Нет (контроль)	99 \pm 3
АТФ, 50	47 \pm 6
Карибдотоксин + АТФ	96 \pm 4
Паксиллин + АТФ	101 \pm 6
Ибериотоксин + АТФ	90 \pm 7
Клотримазол + АТФ	67 \pm 9
NPPB + АТФ	92 \pm 9

Таблица 6. Действие АТФ и ингибиторов ион-транспортирующих систем на внутриклеточный состав моновалентных катионов (нмоль на мг белка)

Добавки, μM	K^+	Na^+	Na^+ / K^+	Cl^-
Нет (контроль)	210 \pm 12	49 \pm 10	0.23	146 \pm 19
АТФ	141 \pm 13**	32 \pm 8	0.23	86 \pm 10*
АТФ + карибдотоксин, 0.1	205 \pm 15	35 \pm 12	0.17	138 \pm 17
АТФ + паксиллин, 2	218 \pm 8	43 \pm 10	0.2	150 \pm 14
АТФ + ибериотоксин, 0.1	197 \pm 11	40 \pm 8	0.2	130 \pm 12
АТФ + NPPB, 100	189 \pm 15	50 \pm 13	0.26	139 \pm 16

*, ** - $p < 0.05$ и < 0.02 в сравнении с контролем, соответственно

Известно, что экспрессия гена раннего ответа *c-Fos* возрастает при действии агонистов P2Y рецепторов и других стимулов, вызывающих увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и активацию протеинкиназ А и С (Muscella et al., 2003), и является маркером функционального состояния клеток. В связи с этим, мы сравнили действие АТФ на экспрессию *c-Fos* в отсутствие и присутствии карибдотоксина и NPPB – ингибиторов ионных каналов, препятствующих АТФ-индуцированному снижению объема клетки (**Рис. 9**). Было обнаружено, что 30 мин инкубация C11-MDCK клеток с АТФ приводила к ~5-ти кратному увеличению содержание белка *c-Fos*. Карибдотоксин резко уменьшал, а NPPB полностью ингибировал эффект в ответ на активацию P2Y рецепторов. Представленные данные свидетельствуют, что увеличение экспрессии *c-Fos* опосредовано утечкой K^+ и Cl^- , приводящей к сжатию клеток.

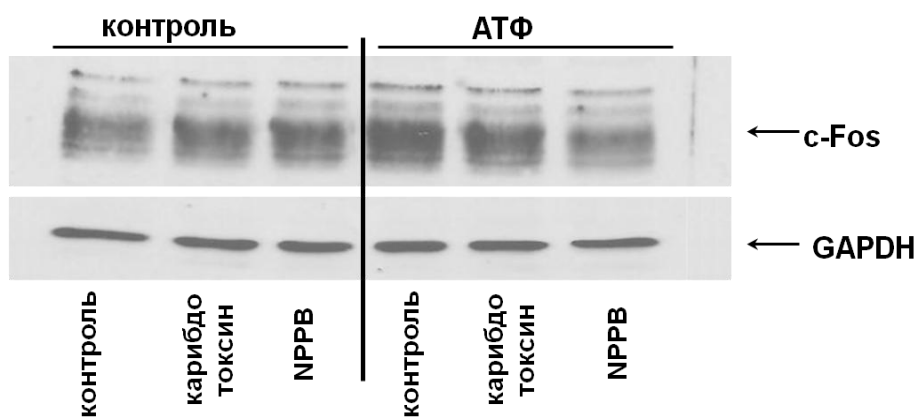


Рис.9. Действие АТФ, карибдотоксина и NPPB на содержание с-Fos и GAPDH в C11-MDCK клетках.

Приведенные выше результаты указывают на то, что уменьшение объема C11-MDCK клеток при активации G_q/G_{11} -связанных $P2Y_2$ рецепторов ведёт к стимуляции фосфолипазы C, увеличивает продукцию инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG) что, в свою очередь, приводит к выбросу Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных внутриклеточных резервов и активации Ca^{2+} - и DAG-чувствительных изоформ РКС (Рис. 10). Известно, что апикальная мембрана интеркалированных клеток, функциональная характеристика которых идентична C11-MDCK клеткам, обогащена $ВК_{Ca}$ каналами (Pacha et al., 1991). Мы обнаружили, что ингибиторы $ВК_{Ca}$ устраняли как АТФ-индуцированное сжатие клеток, так и прирост содержания с-Fos. Эти данные указывают на ключевую роль клеточного сжатия в активации экспрессии с-Fos и проведения сигналов, опосредованных с-Fos-чувствительными генами позднего ответа. Такая связь наблюдается во время действия на интерстициальные клетки механического раздражения, приводящего к массивному выбросу АТФ и УТФ с апикальной и базолатеральной поверхностей монослоя клеток (Burnstock, 2007). Было установлено, что 30-мин механическое воздействие приводит к сжатию C11-MDCK клеток, которое исчезало при Ca^{2+}_i -истощении, ингибировании K^+ каналов и значительно уменьшалось в клетках, подвергнутых воздействию $ВК_{Ca}$ - $\beta 4$ siRNA (Holtzclaw et al., 2010). Рассматривая эти данные в совокупности с результатами наших исследований, мы предполагаем, что активация $P2Y_2$ рецепторов, запускаемая аутокринным выбросом АТФ/УТФ, приводит к увеличению

интралюминального диаметра нефрона посредством сжатия интерстициальных клеток эпителия дистального отдела. Эта гипотеза согласуется с ингибированием прироста Ca^{2+}_i в монослоях MDCK клеток, вызванного трансэпителиальными пульсовыми колебаниями давления, при разрушении внеклеточного АТФ апиразой и добавлении неспецифического антагониста P2 рецепторов сурамина (Praetorius et al., 2005).

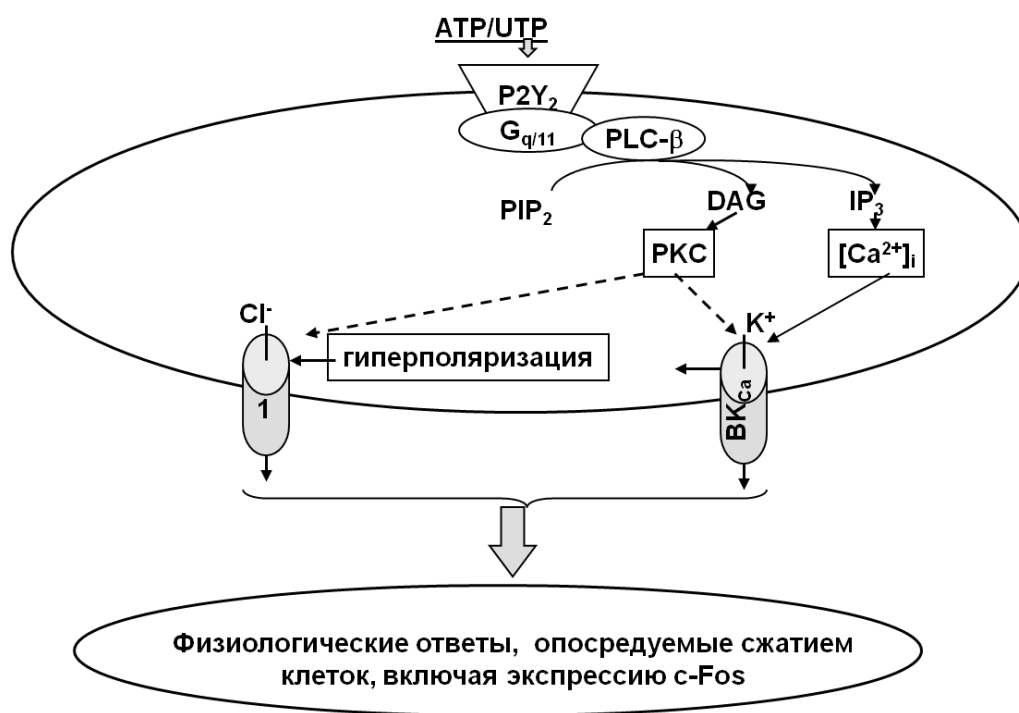


Рис. 10. Механизм сжатия клеток эпителия почечных канальцев при активации $P2Y_2$ рецепторов

В заключительной части нашей работы мы исследовали действие долгосрочной активации $P2Y_2$ рецепторов сопоставили на жизнеспособность С11-MDCK клеток. Мы не обнаружили достоверного прироста активности каспазы-3, накопления фрагментов хроматина и высвобождения LDH после 24-часовой инкубации С11- MDCK клеток в присутствии как АТФ, так и УТФ (Таблица 7). Эти эксперименты показывают, что 2-х-кратное уменьшение объема С11- MDCK клеток в изоосмотических условиях не приводит к их гибели, что согласуется с отсутствием влияния на жизнеспособность клеток в условиях

умеренного гиперосмотического сжатия и гипоосмотического набухания (Таблицы 3 и 4).

Таблица 7. Влияние агонистов P2Y₂ рецепторов на активность каспазы-3, накопления фрагментов хроматина и высвобождения LDH из C11- MDCK клеток

	Активность каспазы-3, , нмоль (мг белка)⁻¹ мин⁻¹	Расщепление хроматина, %	Высвобождение LDH, %
Контроль	0.91±0.08	4.29±0.57	10.07±1.57
АТФ, 1 мМ	1.01±0.15	5.00±0.43	9.21±0.82
УТФ, 1 мМ	0.94±0.11	4.93±0.39	10.93±1.39

Выводы

1. Длительное ингибирование Na⁺,K⁺-АТФазы убаином не влияет на жизнеспособность клеток гладкой мускулатуры сосудов крысы (VSMC), но вызывает некроз C11-MDCK клеток, регистрируемый по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH) как следствие нарушения целостности плазматической мембраны.

2. Ингибитор Na⁺,K⁺-АТФазы убаин вызывает умеренное набухание как VSMC, так и C11-MDCK клеток, опосредованное инверсией соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i. Сопоставление этих данных с изменением объема и высвобождением LDH в гипосмотической среде показывает, что разрыв плазматической мембраны C11-MDCK клеток под действием убаина не является прямым следствием увеличения их объема.

3. Канонические индукторы апоптоза - устранение ростовых факторов и стаурспорин - оказывают разнонаправленное влияние на объём VSMC клеток, трансфицированных E1A аденовирусом (~50% набухание и 30% сжатие,

соответственно). Эксперименты, проведенные в гипо- и гиперосмотической среде, показывают, что изменение объема E1A-VSMC клеток в пределах, отмеченных при запуске апоптоза, не является достаточным условием для генерации сигнала, приводящего к их смерти.

4. Активация P2Y₂ пуриnergических рецепторов АТФ и УТФ вызывает 2-х кратное уменьшение объема клеток эпителия почечных канальцев (клетки C11-MDCK). Сжатие C11-MDCK клеток опосредовано увеличением внутриклеточной концентрации Ca²⁺, активацией Ca²⁺-чувствительных изоформ протеинкиназы C, потерей калия и хлора и устраняется при действии ингибиторов анионных каналов и Ca²⁺-активируемых K⁺ каналов высокой проводимости.

5. Активация P2Y₂ рецепторов сопровождается увеличением экспрессии гена раннего ответа *c-Fos*, которая подавлялась ингибиторами как Ca²⁺-активируемых калиевых каналов высокой проводимости, так и анионных каналов. Эти данные свидетельствуют о важной роли регуляции клеточного объема в функционировании клеток эпителия почечных канальцев.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Koltsova SV, Platonova(Shiyan) A, Maksimov GV, Mongin AA, Grygorczyk R, Orlov SN Activation of P2Y receptors causes strong and persistant shrinkage of C11-MDCK renal epithelial cells *Am J Physiol -Cell Physiol* 2011;**301**:C404-C412
2. Yusipovich AI, Zagubizhenko MV, Levin GG, Platonova (Shiyan) A, Parshina AY, Grygorczyk R, Maksimov GV, Rubin AB, Orlov SN Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index *J Microscopy* 2011;**244**:223-229
3. Platonova (Shiyan) A, Koltsova S, Maksimov GV, Grygorczyk R, Orlov SN The death of ouabain-treated renal epithelial C11-MDCK cells is not mediated by swelling-induced plasma membrane rupture *J Membr Biol* 2011;**241**:145-154

4. Platonova(Shiyan) A, Koltsova SV, Hamet P, Grygorczyk R, Orlov SN Swelling rather than shrinkage precedes apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells *Apoptosis* 2012;**17**:429-438
5. Parshina EYu, Yusipovich AI, Platonova (Shiyan) AA, Grygorczyk R, Maksimov GV, Orlov SN Thermal inactivation of volume-sensitive K^+,Cl^- cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes *Pflugers Archiv – Eur.J.Physiol.* 2013; **465**:977-983
6. Orlov SN, Platonova (Shiyan) AA. Hamet P, Grygorczyk R. Cell volume and monovalent ion transporters: their role in triggering and progression of the cell death machinery *Am.J.Physiol. – Cell Physiol.* 2013; **305**:C361-C372
7. Платонова (Шиян) А.А., Кольцова С.В., Максимов Г.В., Григорчик Р, Орлов С.Н. 3-х мерная микроскопия как метод измерения объёма клеток, проходящих апоптоз *Биофизика* 2013; **58**: 389-393
8. Platonova (Shiyan) A.A., Orlov S.N., Grygorczyk R. Volume changes triggered by anisotonic media in intact and permeabilized A549 cells: role of cytoskeleton network *Бюллетень сибирской медицины*, 2013, **12** (№4): 60
9. Platonova (Shiyan) A.A., Grygorczyk R., Orlov S.N. Temperature dependence of volume changes triggered by anisotonic media in intact and permeabilized A549 cells *Бюллетень сибирской медицины*, 2013, **12** (№4):59
10. Platonova (Shiyan) 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
11. Grygorczyk R, Boudreault F, Platonova (Shiyan) A, Orlov SN Salt and osmosensing: role of cytoplasmic hydrogel. *Pflugers Arch – Eur J. Physiol* 2015; **467**:489-498