

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Шиян (Платонова) Александра Андреевна

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности биофизика

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор Г.В. Максимов

Доктор биологических наук, профессор С.Н. Орлов

Москва – 2015

Содержание

Список используемых сокращений.....	5
1. Введение.....	7
2. Обзор литературы.....	12
2.1. Механизмы регуляции объема клеток.....	12
2.1.1. Факторы, определяющие клеточный объем в стационарных условиях.....	12
2.1.2. Нестационарные изменения и механизмы ауторегуляции объема клеток.....	13
2.1.2.1 Мембранные транспортеры, участвующие в RVD.....	16
2.1.2.2. Мембранные транспортеры, участвующие в RVI.....	19
2.1.3 Физико-химические сигналы, генерирующиеся при изменении клеточного объема и природа объемного сенсора.....	20
2.1.3.1 Ионная сила.....	20
2.1.3.2 Внутриклеточная концентрация хлора ($[Cl^-]_i$).....	21
2.1.3.3 Выброс АТФ.....	22
2.1.3.4. Натяжение плазматической мембраны.....	23
2.1.3.5.Трехмерный цитоскелет.....	28
2.1.3.6. Двумерный цитоскелет (мембранный каркас) и полифосфоинозитиды.....	29
2.1.3.7. Концентрация макромолекул: цитоплазма как биогель.....	32
2.1.4. Внутриклеточная сигнализация, связанная с изменением объема клеток.....	34
2.2. Физиологическое и патофизиологическое значение изменения объема клеток.....	35
2.2.1. Изменение объема клеток при действии гормонов и нейротрансмиттеров.....	36
2.2.1.1. Пуриnergические рецепторы как регуляторы ионного транспорта.....	39
2.2.2. Изменение объема клеток при действии факторов, приводящих к гибели клеток.....	43
2.2.2.1 Изменение клеточного объёма как подход для классификации клеточной смерти.....	44
2.2.2.2 Термодинамическая модель вовлечения мембранных транспортеров в изменения клеточного объёма.....	46
2.2.2.3. Изменения объёма, запускаемые стимулами клеточной смерти.....	49
2.2.2.4. Является ли сжатие достаточным стимулом для смерти клеток?.....	51
2.2.2.5. Является ли набухание достаточным стимулом для смерти клеток?.....	58
2.3. Методы, используемые для измерения объема клеток: преимущества и недостатки.....	59
3. Материалы и методы.....	67
3.1. Гладкомышечные клетки.....	67
3.2. Клетки C11-MDCK.....	67

3.3. Измерения клеточного объёма	68
3.4. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)	76
3.5. Внутриклеточный состав моновалентных ионов	77
3.6. Тест на образование фрагментов хроматина	78
3.7. Активность каспазы-3	78
3.8. Выброс цитохрома C	79
3.9. Высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH)	80
3.10. Определение количества клеток, прикрепленных к подложке	80
3.11. Измерение содержания белка модифицированным методом Лоури	81
3.12. Измерение содержания белка методом Бредфорда	81
3.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	82
3.14. Вестерн-блот	82
Реактивы	83
Статистическая обработка результатов	83
4. Результаты	85
4.1. Изменения клеточного объёма, вызванные ингибированием Na^+, K^+-АТФазы и смерть C11-MDCK клеток	85
<i>4.1.1 Действия убаина и безкальевой среды на внутриклеточный состав катионов и жизнеспособность клеток</i>	86
<i>4.1.2 Воздействие убаина и безкальевой среды на объём клеток</i>	90
<i>4.1.3. Клеточный объём и освобождение LDH в гипотонической среде</i>	92
<i>4.1.4. Изменения клеточного объёма, вызванные пермеабиллизацией плазматической мембраны</i>	94
4.2. Изменение объема гладкомышечных клеток сосудов при действии индукторов апоптоза	97
<i>4.2.1. Динамика апоптоза в E1A-VSMC: ингибирование убаином и форсколином</i>	97
<i>4.2.2. Кинетика модуляций объёма в голодающих по сыворотке E1A-VSMC</i>	99
<i>4.2.3. Кинетика модуляций объёма E1A-VSMC клеток при действии стауроспорина</i>	101
<i>4.2.4. Действие анизосмотической среды</i>	103

4.3. Пуриnergическая регуляция объема интеркалированных	
клеток эпителия почечных канальцев.....	106
<i>4.3.1 Эффекты АТФ, УТФ и аннзосмотической среды на клеточный объем С11-</i>	
<i>MDCK клеток.....</i>	<i>106</i>
<i>4.3.2 Роль Ca²⁺_i и протеинкиназы А и С</i>	<i>109</i>
<i>4.3.3 Эффект антагонистов P2Y рецепторов</i>	<i>113</i>
<i>4.3.4 Эффект ингибиторов ионного транспорта на АТФ-зависимые изменения</i>	
<i>клеточного объема</i>	<i>114</i>
<i>4.3.5 Действие АТФ на внутриклеточный состав моновалентных ионов</i>	<i>118</i>
<i>4.3.6. Карнбдотоксин и NPPB подавляют АТФ-индуцированную экспрессию c-Fos.....</i>	<i>119</i>
5. Обсуждение результатов.....	121
5.1 Смерть С11-MDCK клеток при действии уабаина не	
опосредуется набуханием и разрывом плазматической мембраны	121
5.2 Набухание, а не сжатие предшествует смерти гладкомышечных	
клетках сосудов, вызванной устранением ростовых факторов	125
5.3 Роль уменьшения объема в регуляции функционирования	
интерстициальных клеток эпителия почечных канальцев	
пуриnergическими рецепторами	131
<i>5.3.1. Сильное и продолжительное сжатие С11-MDCK клеток при действии</i>	
<i>АТФ/УТФ.</i>	<i>131</i>
<i>5.3.2. Клеточный механизм, служащий связывающим звеном при АТФ-</i>	
<i>индуцируемом клеточном сжатии</i>	<i>133</i>
<i>5.3.3. Физиологические значения АТФ-индуцированных изменений клеточного</i>	
<i>объема</i>	<i>136</i>
7. Выводы.....	140
8. Список литературы	143

Список используемых сокращений

- АСМ** – атомно-силовая микроскопия
- АТФ** – аденозинтрифосфат
- Ацх** – ацетилхолин
- ГАБА** – гамма-аминобутиловая кислота
- Гис** - гистамин
- ГМК** – гладкомышечные клетки
- иРНК** – информационная рибонуклеиновая кислота
- ЯМР** – ядерно-магнитный резонанс
- A549** – базальные эпителиальные клетки аденокарциномы альвеол человека
- сАМР** – циклический 3:5-аденозинмонофосфат
- СТС** - кортикостероиды
- AVD** – апоптотическое уменьшение объёма
- ВСЕСФ** - 2',7'-би-(2-карбоксиэтил)-5-(и-6)-карбоксифлуоресцеин
- ВК_{Ca}** - Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы высокой проводимости
- сGMP** – циклический 3:5-гуанозинмонофосфат
- DISUR** – метод реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений
- DVD** – уменьшение объёма умирающей клетки
- DVI** – увеличение объёма умирающей клетки
- ENaC** – эпителиальный натриевый канал
- IP₃** – инозитолтрифосфат
- IK_{Ca}** – потенциал- и Ca²⁺-зависимые K⁺ каналы со средней проводимостью
- GPCR** – рецепторы, сопряжённые с G-белком
- GRKs** – киназы рецепторов, сопряжённых с G-белками
- KCC** - K⁺,Cl⁻ котранспорт
- MAP-киназы** – митоген активируемые протеин киназы
- MDCK**- клетки Мадин-Дарби почек собак

NKCC – $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт; **NKCC1** и **NKCC2** – изоформы NKCC
NHE - Na^+/H^+ -обменник, **NHE-1**, **NHE-2**, **NHE-3** и **NHE-4** – изоформы
NVI – некротическое увеличение объёма
PKA – cAMP-зависимая протеинкиназа
PKC – Ca^{2+} , фосфолипид-зависимая протеинкиназа
PKG – cGMP-зависимая протеинкиназа
P2 – пуриnergические рецепторы
PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата
PI-3K – фосфоинозитид-3-киназа
RVD – регуляторное уменьшение объёма
RVI – регуляторное увеличение объёма
SK_{Ca} - Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы с маленьким сопротивлением
SDS - додецилсульфат натрия
TNF – фактор некроза опухоли
VRAC – объём регулируемые анионные каналы
VSMC – клетки гладкой мускулатуры

1. Введение

Даже в условиях постоянной осмолярности окружающей среды клетки представителей животного царства подвержены осмотическому давлению, возникающему в силу неравновесного распределения органических молекул – белков, нуклеиновых кислот и непроникающих через мембрану низкомолекулярных соединений (аминокислоты, углеводные метаболиты и др.). Чтобы противостоять медленному накоплению воды, сопутствующему повышенному содержанию органических осмолитов, клетки откачивают неорганические ионы, преимущественно ионы натрия (Na^+) и хлора (Cl^-), что приводит к созданию т.н. доннановского равновесия (Macknight and Leaf 1977; Hoffmann and Simonsen 1989; Lang et al. 1998a; Mongin and Orlov 2001). Ключевая роль в этом процессе принадлежит Na^+, K^+ -насосу, который транспортирует из клетки натрий в обмен на калий.

Изменения трансмембранного переноса ионов и органических осмолитов, а также скорости синтеза и распада макромолекул – наиболее частые причины модификации объема клеток позвоночных. Так, например, в печени инсулин вызывает набухание гепатоцитов вследствие активации $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и Na^+/H^+ -обмена (Hallbrucker et al. 1991; Haussinger and Lang 1992; Haussinger 1996), а в нервной ткани активация ионотропных рецепторов глутамата и потенциал-чувствительных натриевых каналов приводит к увеличению объема нейронов (Churchwell et al. 1996). Напротив, интенсивный синтез макромолекул из должен вести к уменьшению осмолярности внутриклеточной среды и сжатию. Сжатие также может быть вызвано активацией оттока осмолитов из клетки через ионные каналы под действием гормонов и нейромедиаторов (Lang et al. 1998a).

В процессе эволюции клетки выработали “аварийные” системы, необходимые для защиты клеточного объема в случаях быстрого набухания или сжатия. Механизмы быстрой объемной регуляции консервативны и принципиально сходны как в эволюционно удаленных организмах, так и между клетками различных тканей (Gilles 1988; Chamberlin and Strange 1989; Lang et al. 1998b). Эти механизмы включают гипотетический сенсор (сенсоры) клеточного объема, активируемые сенсором системы внутриклеточной сигнализации, и, наконец, исполнительные системы, которые в ответ на набухание или сжатие компенсируют изменения объема посредством выброса или накопления осмотически активных молекул. Защитный выброс избытка осмолитов, ведущий к уменьшению клеточного объема после набухания, получил в англоязычной литературе название “регуляторное уменьшение объема”, RVD (Regulatory Volume Decrease). Противоположный процесс накопления дополнительных осмолитов, ведущей к компенсаторному увеличению объема после сжатия, называют “регуляторное увеличение объема”, RVI (Regulatory Volume Increase). В большинстве клеток млекопитающих RVD и RVI регулируют объем с точностью 2-3% (Hoffmann and Simonsen 1989; Lang et al. 1998a). В ряде случаев, например в клетках эндотелия сосудов роговицы объем поддерживается с точностью ~0.5% (Kuang et al. 2006).

В последние годы достигнут существенный прогресс в понимании природы сенсора клеточного объема и сигнальных процессов, контролирующих активность систем, вовлеченных в ауторегуляцию объема клеток. Напротив, число работ, посвященных количественному описанию кинетики модификации объема при гормональном возбуждении клеток и при действии факторов, модифицирующих клеточный цикл и вызывающих клеточную смерть, т.е. явлениям, имеющим большое

физиологическое и патофизиологическое значение, ограничено крайне малым числом публикаций. Это обстоятельство во многом обусловлено методическими ограничениями. Так, светорассеяние, рефрактометрия и техника Coulter Counter применима только к клеткам, находящимся в суспензии и сравнительно простой (как правило, сферической) формы. Следует также отметить, что перевод прикрепленных к подложке клеток в суспензию путем трипсинизации существенно влияет на их объем и форму и может провоцировать смерть клеток (Akimova et al. 2008). Измерение объема внутриклеточной воды с помощью проникающих через мембрану и не метаболизирующих в цитоплазме соединений требует длительных времен инкубации для установления их стационарного распределения и интенсивной промывки клеток от меток, локализованных во внеклеточном пространстве. Трехмерная реконструкция изображения клетки с помощью лазерной интерференционной или голографической микроскопии (Poulsen et al. 2010) не может быть использована для регистрации объемных изменений, так как рефрактерный индекс цитоплазмы зависит от объема клетки (Yusipovich et al. 2011). Техника измерения тушения флуоресценции красителей предполагает их равномерное распределение в цитоплазме (Solenov et al. 2004). Конфокальная и атомно-силовая микроскопия требует сравнительно длительных времен инкубации (2-3 мин), в течение которых могут развиваться нежелательные фотодинамические эффекты (Kunz and Stark 1997).

Учитывая эти ограничения, в Научно-исследовательском центре университета г. Монреаль был разработан метод, основанный на фазовоконтрастной микроскопии в двух перпендикулярных направлениях (dual surface reconstruction technique, DISUR) (Boudreault and Grygorczyk 2004). Этот метод, позволяющий одновременно измерять высоту, площадь поверхности и объем одиночных клеток, прикрепленных к подложке, с временным разрешением ~ 100 ms.

Целью настоящей 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)(Boudreault and Grygorczyk 2004). Нами были сформулированы следующие **задачи исследования**:

- 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 С стауроспорина и ингибитора Na^+ , K^+ -АТФ-азы убаина.

Выбор **объекта исследования** определялся тремя основными моментами. Во-первых, клетки C11-MDCK по своим функциональным свойствам напоминают интерстициальные клетки собирательных трубочек, для которых в наиболее полной мере охарактеризованы ион-транспортирующие системы, регулирующиеся пуриnergическими рецепторами (Gagnon et al. 1998;Gagnon et al. 1999a;Gagnon et al. 1999b;Orlov et al. 1999a;Bourcier et al. 2002;Brindikova et al. 2003;Akimova et al. 2006a;Rayment et al. 2007). Во-вторых, в отличие от MDCK клеток

(Pchejetski et al. 2003), клетки VSMC сохраняют жизнеспособность при долгосрочном ингибировании Na^+, K^+ -АТФ-азы убаином и другими кардиотоническими стероидами (Orlov et al. 2001). В третьих, в отличие от нативных VSMC клеток, клетки E1A-VSMC крайне восприимчивы к индукторам апоптоза (Bennett et al. 1995; Orlov et al. 1999c).

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 P2Y₂ 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 P2Y₂ рецепторов не влияет на жизнеспособность клеток и является причиной увеличения экспрессии гена раннего ответа c-Fos.

2. Обзор литературы

2.1. Механизмы регуляции объема клеток

В силу отсутствия клеточной стенки животные клетки вынуждены регулировать свой объем, чтобы избежать осмотического лизиса и поддерживать концентрацию внутриклеточных ферментов и метаболитов на оптимальном уровне. Низшие организмы проводят всю свою жизнь в противостоянии осмотическому стрессу. Напротив, у высших позвоночных осмолярность внеклеточной среды надежно регулируется, и поэтому большинство типов клеток, за исключением некоторых эпителиальных клеток, а также транспортируемых через почечные капилляры клеток крови, не подвержены сколь-либо значительным осмотическим стрессам. Тем не менее, несмотря на относительное постоянство внеклеточной среды, клетки позвоночных изменяют свой объем как следствие изменения содержания внутриклеточных осмолитов, что имеет прямое отношение к таким фундаментальным процессам как деление, дифференцировка и смерть клеток. В настоящем разделе мы кратко суммируем данные о механизмах, используемых клеткой для ауторегуляции объема, обращая особое внимание на нерешенные аспекты этой проблемы, а именно – как клетки чувствуют изменения клеточного объема и какие генерируемые при этом сигналы имеют отношение к реакциям регуляторного восстановления клеточного объема.

2.1.1. Факторы, определяющие клеточный объем в стационарных условиях

Даже в условиях постоянного осмолярности окружающей среды клетки высших позвоночных подвержены осмотическому давлению, возникающему в силу неравновесного распределения органических молекул – белков, нуклеиновых кислот и непроникающих через мембрану

низкомолекулярных соединений (аминокислоты, углеводные метаболиты и др.). Чтобы противостоять медленному накоплению воды, сопутствующему повышенному содержанию органических осмолитов, клетки откачивают неорганические ионы, преимущественно ионы натрия (Na^+) и хлора (Cl^-), что приводит к созданию т.н. доннановского равновесия (для обзора см. Macknight and Leaf 1977; Hoffmann and Simonsen 1989; Lang et al. 1998a; Mongin and Orlov 2001). Ключевая роль в этом процессе принадлежит Na^+, K^+ -насосу, который транспортирует из клетки натрий в обмен на калий. Неравновесное распределение Na^+ и K^+ и относительно высокая проницаемость мембраны для K^+ создает отрицательный электрический потенциал на плазматической мембране, что, в свою очередь, движет Cl^- из клетки, дополнительно компенсируя осмотические последствия присутствия непроникающих органических анионов. Исключение из этого правила составляют эритроциты, в которых преобладает анионная проницаемость и которые могут длительное время существовать в условиях ингибированного натриевого насоса.

2.1.2. Нестационарные изменения и механизмы ауторегуляции объема клеток

Как уже отмечалось выше, изменения трансмембранного переноса ионов и органических осмолитов а также скорости синтеза и распада макромолекул – наиболее частые причины модификации объема клеток позвоночных. Так, например, в печени инсулин вызывает набухание гепатоцитов вследствие активации $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и Na^+/H^+ -обмена (Hallbrucker et al. 1991; Haussinger and Lang 1992; Haussinger 1996), а в нервной ткани активация ионотропных рецепторов глутамата и потенциал-чувствительных натриевых каналов приводит к увеличению объема нейронов (Churchwell et al. 1996). Гепатоциты также подвержены

набуханию при увеличенном захвате глюкозы и аминокислот (Haussinger 1998), а мышечные клетки набухают при интенсивных упражнениях вследствие накопления лактата и активации Na^+/H^+ -обмена, вызванного закислением цитоплазмы (Lang et al. 1998a). Напротив, интенсивный синтез макромолекул должен вести к уменьшению осмолярности внутриклеточной среды и сжатию. Сжатие также может быть вызвано активацией оттока осмолитов из клетки через ионные каналы под действием гормонов и нейромедиаторов. Чаще всего уменьшение клеточного объема вызывает активация калиевых каналов, как, например, глюкагоном в гепатоцитах или АТФ или брадикинином в эндотелиальных клетках (см. (Lang et al. 1998a)).

В процессе эволюции клетки выработали “аварийные” системы, необходимые для защиты клеточного объема в случаях быстрого набухания или сжатия. Механизмы быстрой объемной регуляции консервативны и принципиально сходны как в эволюционно удаленных организмах, так и между клетками различных тканей (Gilles 1988; Chamberlin and Strange 1989; Lang et al. 1998b). Эти механизмы включают гипотетический сенсор (сенсоры) клеточного объема, активируемые сенсором системы внутриклеточной сигнализации, и, наконец, исполнительные системы, которые в ответ на набухание или сжатие компенсируют изменения объема посредством выброса или накопления осмотически активных молекул. Защитный выброс избытка осмолитов, ведущий к уменьшению клеточного объема после набухания, получил в англоязычной литературе название “регуляторное уменьшение объема”, RVD (Regulatory Volume Decrease). Противоположный процесс накопления дополнительных осмолитов, ведущей к компенсаторному увеличению объема после сжатия, называют “регуляторное увеличение объема”, RVI (Regulatory Volume Increase) (**Рис.1**). Долговременная

адаптация к анизосмотическим условиям также сопровождается увеличением или уменьшением экспрессии белков участвующих в синтезе низкомолекулярных органических осмолитов. Данные об изменении экспрессии генов при длительной модуляции клеточного объема анализировались ранее (Burg 1995;Burg et al. 1997;Burg et al. 2007;Cheung and Ko 2013) и нами не рассматриваются. В большинстве клеток млекопитающих RVD и RVI регулируют объем с точностью 2-3% (Hoffmann and Simonsen 1989;Lang et al. 1998a). В ряде случаев, например в клетках эндотелия сосудов роговицы (**Рис. 2**) объем поддерживается с точностью ~0.5% (Kuang et al. 2006).

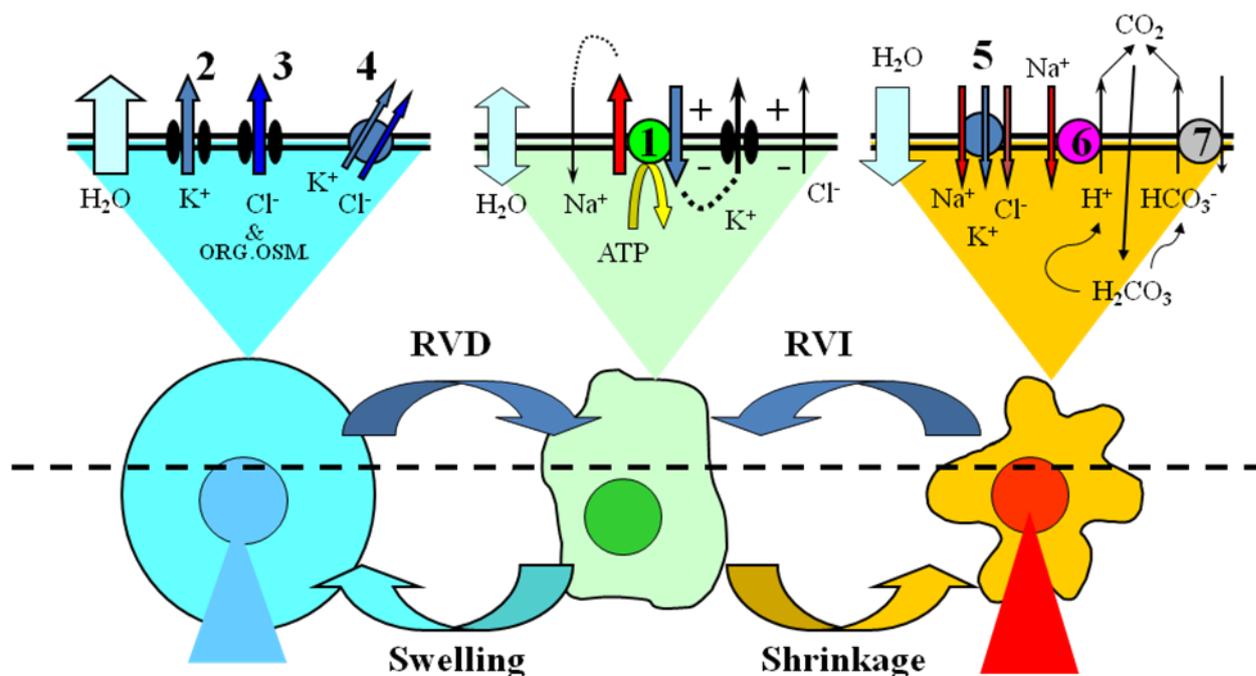


Рис. 1. Основные системы принимающие участие в регуляции объема клеток. 1 - Na^+ , K^+ -АТФаза; 2, 3 – K^+ и Cl^- каналы; 4 – K^+ , Cl^- котранспорт; 5 – Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорт; 6 – Na^+ / H^+ обменник; 7 - анионный обменник (Mongin, Orlov, 2001)

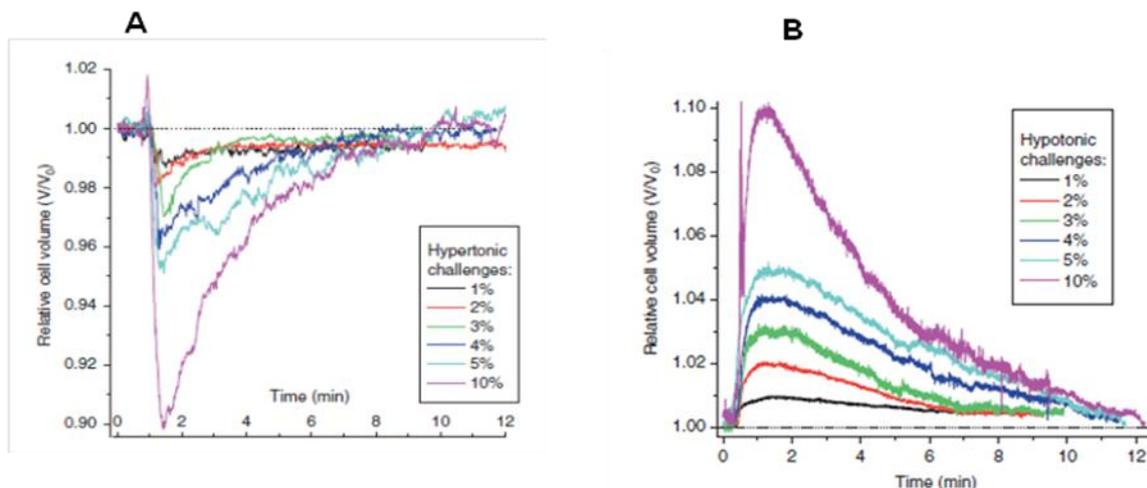


Рис. 2. RVI (A) и RVD (B) в клетках эндотелия сосудов роговицы быка, вызванные увеличением и уменьшением осмолярности среды, соответственно (Kuang et al., 2006)

2.1.2.1 Мембранные транспортеры, участвующие в RVD

В большинстве животных клеток набухание компенсируется оттоком K^+ и Cl^- через независимые, но функционально связанные калиевые и анионные каналы. Функциональная взаимосвязь осуществляется на уровне мембранного потенциала. Интенсивный отток K^+ приводит к гиперполяризации, “закрывающей” K^+ внутри клетки на уровне, соответствующем его электрохимическому потенциалу (E_K), в силу чего эффективная объемная регуляция требует параллельного оттока Cl^- . Если внутриклеточная концентрация Cl^- слишком низка, отток хлора дополняется выбросом органических анионов через каналы, обладающие сравнительно низкой анионной селективностью (Kirk and Strange 1998; Macknight and Leaf 1977; Hoffmann and Simonsen 1989; Lang et al. 1998a; Mongin and Orlov 2001). Альтернативной системой, участвующей в RVD, является электронейтральный котранспортер K^+ и Cl^- , активируемый в эритроцитах (Рис. 3) и некоторых типах эпителиальных клеток, где градиент K^+ и Cl^- способствует выходящей моде работы этого переносчика

(Orlov et al. 1993; Orlov 1994; Lauf and Adragna 2000). Четыре изоформы K^+ , Cl^- -котранспортера и более 50 изоформ K^+ и Cl^- каналов были клонированы в течение последних 20 лет. Данные о вовлечении некоторых из них в RVD приведены в Таблице 1.

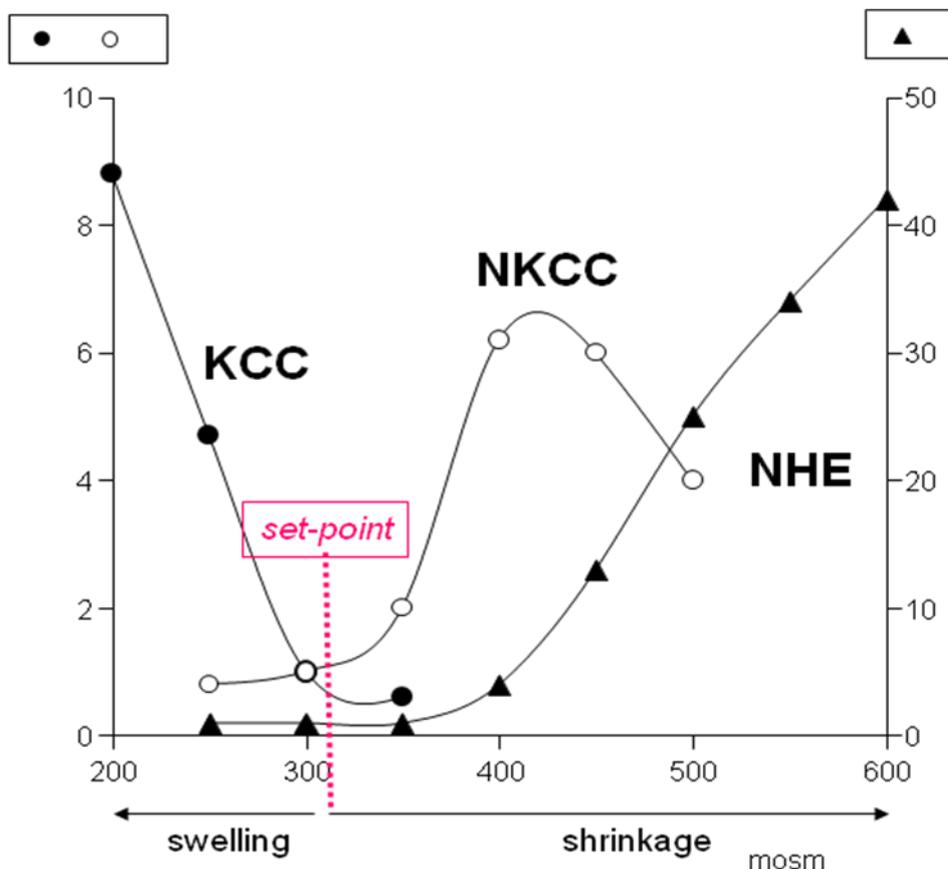


Рис. 3. Зависимость активности K^+ , Cl^- - котранспорта (KCC) Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта (NKCC) и Na^+ / H^+ обмена (NHE) в эритроцитах крысы от осмолярности среды инкубации. Активность ионных транспортеров в изоосмотической среде (310 mOsm) принята как 1.00 (Orlov et al., 1992; 1995)

Таблица 1. Идентифицированные на молекулярном уровне системы ионного транспорта, участвующие в объемной регуляции (Mongin and Orlov 2001)

Тип ионного транспорта	Клонированные каналы и ионные переносчики
Калиевые каналы	Kv1.3, Kv1.5, miniK
Неспецифические катионные каналы	OTRPC4
Анионные (хлорные) каналы	ClC-2, ClC-3, BR-VDAC?
K ⁺ ,Cl ⁻ -котранспортеры	KCC-1, KCC-2, KCC-3, KCC-4
Na ⁺ /H ⁺ -exchangers	NHE-1, NHE-2, NHE-4
Na ⁺ ,K ⁺ ,2Cl ⁻ -котранспортеры	NKCC1, NKCC2?
Натриевые каналы	ENaC

Эффективность осмотической работы Na⁺,K⁺-насоса (3Na⁺:2K⁺) невелика и поэтому он не может противостоять быстрым или значительным изменениям объема. Тем не менее, натриевый насос активируется набуханием в мышечных (Venosa 1991) и нескольких типах нервных клеток (Aksentsev et al. 1994;Mongin et al. 1994;Mongin et al. 1996), а в глиальных клетках его активность настолько высока, что вносит существенный вклад в реакцию RVD (Olson et al. 1995). В намного более редких случаях RVD обеспечивают функционально связанные Ca²⁺-насос и Na⁺/Ca²⁺-обменник (эритроциты хищников) или K⁺/H⁺ и Cl⁻/HCO₃⁻-обменник (эритроциты амфибий) (Lang et al. 1998a;Lang et al. 1998b). В некоторых типах клеток RVD связан с параллельной активацией нескольких систем. Так, в эндотелиальных клетках аорты происходит активация K⁺ и Cl⁻ каналов и K⁺,Cl⁻-котранспорта (Perry and O'Neill 1993). Сходным образом, в некоторых ядерных эритроцитах RVD одновременно обеспечивается K⁺,Cl⁻-котранспортом, анионным обменником и катионными и анионными каналами (Lang et al. 1998b). В глиальных клетках мозга активация катионных и анионных каналов дополняется стимуляцией натриевого насоса (Mongin et al. 1994;Mongin et al. 1996).

2.1.2.2. Мембранные транспортеры, участвующие в RVI

$\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортер и Na^+/H^+ -обменник - две основные системы мембранного транспорта, активирующиеся при сжатии и участвующие в регуляторном накоплении неорганических осмолитов (**Рис. 1**). $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортер экспрессирован в подавляющем большинстве животных клеток и осуществляют электронейтральный сопряженный перенос Na^+ , K^+ , и Cl^- внутрь клетки и из нее по суммарному градиенту всех трех ионов (Russell 2000). В настоящее время клонированы две изоформы $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортера. Одна из них (NKCC2) экспрессирована только на апикальной мембране клеток эпителия петли Генле и macula densa. Сведения об объемной регуляции этой изоформы отсутствуют. Напротив, активация NKCC1, экспрессированного во всех тканях, включая базальную мембрану клеток эпителия почечных канальцев, ведет к регуляторному увеличению объема во многих типах клеток (Gamba 2005).

Второй тип ионного транспорта, активирующийся при сжатии, это Na^+/H^+ -обмен. Работа Na^+/H^+ -обменников сопровождается закислением цитоплазмы и как следствие этого активацией $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмена, в результате чего клетка накапливает Na^+ и Cl^- , выбрасывая H^+ и HCO_3^- . Натриевый насос – необходимый участник RVI, т.к. он создает движущую силу этого процесса за счет поддержания низких внутриклеточных концентраций Na^+ и, непрямым образом, Cl^- . Три из четырех клонированных изоформ Na^+/H^+ -обменника – NHE-1, NHE-2 и NHE-4 (**Таблица 1**) активируются сжатием, а NHE-3, напротив, ингибируется (Orlowski and Grinstein 2004).

Активация Na^+ каналов – потенциально наиболее простой и термодинамически эффективный способ регуляции объема при сжатии. Однако такой тип RVI был найден в очень немногих клетках (тучные

клетки, эпителиальные клетки собирающих протоков почек, культура гепатоцитов) (Lang et al. 1998a; Wehner et al. 2003; Wehner et al. 2006). Вероятно, это отражает стремление клеток избежать резкой деполяризации и падения градиента Na^+ при активации натриевых каналов, и связанной с этим явлением модуляции Na^+ -зависимых транспортеров. Растянутая во времени активация $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и Na^+/H^+ -обмена позволяет Na^+, K^+ -насосу частично компенсировать падение Na^+ градиента.

2.1.3 Физико-химические сигналы, генерирующиеся при изменении клеточного объема и природа объемного сенсора

Для объяснения феномена объемной регуляции была предложена концепция *сенсора клеточного объема* – одной или нескольких гипотетических структур, способных чувствовать изменения, происходящие при набухании и сжатии клеток. В этом разделе мы пытаемся кратко обсудить какие физико-химические сигналы генерируются при изменении объема и какова возможная природа объемного сенсора.

2.1.3.1 Ионная сила

Осмотическое набухание и сжатие изменяет цитоплазматическую концентрацию неорганических ионов и ионную силу внутриклеточного содержимого. Несколько экспериментальных работ показали, что уменьшение ионной силы в цитоплазме может являться сигналом для активации анионных каналов и/или модулировать состояние объемного сенсора (Nilius et al. 1998; Voets et al. 1999). Расчеты Нилиуса с коллегами показали, что активация анионных каналов теснее связана с изменениями

ионной силы, чем с изменениями клеточного объема (Voets et al. 1999). Следует однако отметить, что эта концепция не может объяснить механизм активации ионных транспортеров при изоосмотическом изменении объема клеток. Так, например, набухание астроцитов, вызванное изотоническим увеличением внеклеточного K^+ , ведет к сходной по амплитуде активации анионных каналов как и гипотоническое набухание, хотя в первом случае внутриклеточная ионная сила увеличивается, а во втором – уменьшается (Mongin et al. 1999).

2.1.3.2 Внутриклеточная концентрация хлора ($[Cl^-]_i$)

Как обсуждалось выше, концентрация Cl^-_i поддерживается на низком уровне, чтобы сбалансировать осмотическое давление, вызываемое внутриклеточными органическими анионами. При анизосмотическом набухании или сжатии, $[Cl^-]_i$ реципрокно уменьшается или увеличивается. Напротив, *in vivo* при изоосмотическом набухании, связанном с повышенным захватом органических субстратов, а также и при изоосмотическом сжатии, связанном с активацией ионных каналов, $[Cl^-]_i$ как правило, уменьшается. Понижение $[Cl^-]_i$ необходимо для полной активации сжатием как $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта так и Na^+/H^+ -обмена (Lang et al. 1998a; O'Neill 1999). Предполагают, что понижение $[Cl^-]_i$ также необходимо для активации объем-чувствительных анионных каналов (Jackson et al. 1996), однако в электрофизиологических экспериментах замена Cl^- на непроникающие органические или дивалентные анионы также сопровождается понижением ионной силы раствора, что само по себе может активировать анионные каналы (Cannon et al. 1998; Voets et al. 1999). Сравнительно недавно была обнаружена целая группа ферментов, чувствительных к концентрации Cl^- (см. (Orlov and Hamet 2006)). Рассматривая эти данные можно заключить, что разница в модуляции $[Cl^-]_i$

позволяет объяснить, почему некоторые клетки не способны к RVI после гипертонического сжатия, но эффективно регулируют свой объем при изотоническом сжатии (O'Neill 1999). Модуляции $[Cl^-]_i$, однако, не может рассматриваться в качестве универсального начального триггера объем-зависимых реакций. В самом деле, анионные каналы в астроцитах активируются, как в гипотонических условиях (понижение $[Cl^-]_i$), так и при высококалийном набухании (повышение $[Cl^-]_i$) (Mongin et al. 1999).

2.1.3.3 Выброс АТФ

Было установлено, что набухание гепатоцитов (Wang et al. 1996), как и других изученных на это предмет клеток (Boudreault and Grygorczyk 2002; Tatur et al. 2007), приводит к массивному выбросу АТФ, который активирует набор пуринорецепторов, рассмотренный в разделе ????, что сопровождается активацией анионных каналов, вовлеченных в RVD. В подтверждение этой гипотезы авторы продемонстрировали блокаду активации анионных каналов и RVD при добавлении фермента, гидролизующего внеклеточный АТФ, и антагонистов P_{2U} -рецепторов (Wang et al. 1996). Этот аутокринный механизм объемной регуляции был проверен в нескольких других типах клеток. В эпителиальных клетках (Hazama et al. 1999) и астроцитах (Mongin and Kimelberg 2003) объемная регуляция не блокируется ни гидролизом внеклеточного АТФ, ни блокадой P_{2U} -рецепторов. Следовательно, аутокринное освобождение АТФ не является универсальным механизмом для передачи объемного сигнала, но может служить мощным фактором, модулирующим объемную регуляцию. В самом деле, Монгиным и сотрудниками было установлено что активация P_{2U} -рецепторов резко увеличивает чувствительность анионных каналов астроцитов к гипоосмотическому набуханию (Mongin and Kimelberg 2002; Mongin and Kimelberg 2005b).

2.1.3.4. Натяжение плазматической мембраны

Согласно одной из гипотез, мембранная архитектура ионных транспортеров, рассмотренных в двух предыдущих разделах, включает домены, изменяющие свою коформацию в ответ на механическое растяжение или сжатие плазматической мембраны, что и является непосредственной причиной модификации транспортной функции. В самом деле, во многих клетках были обнаружены механочувствительные каналы, активирующиеся при механическом растяжении или сжатии мембраны. Согласно этой гипотезе, активация неселективных катионных каналов при набухании ведет к увеличению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} и вторичной активации Ca^{2+} -чувствительных калиевых и хлорных каналов, обеспечивающих отток электролитов (Pedersen and Nilius 2007; Hoffmann et al. 2009). Помимо ионных каналов перестройки в липидном бислое регулируют активность фосфолипазы A_2 , которая контролирует активность многочисленных систем внутриклеточной сигнализации (Lehtonen and Kinnunen 1995). Однако, в силу складчатости мембраны животной клетки маловероятно, что набухание или сжатие сопровождаются существенными механическими напряжениями. Рассмотрим этот вопрос более подробно.

Обычно, в моделях, контроль клеточного объёма животных осуществляется потоками воды, обусловленными потоками растворённых веществ через плазматическую мембрану. (Macknight and Leaf 1977). В соответствии с этой моделью, предполагаемое гидростатическое давление на плазматической мембране считается по закону ванн Гоффа как $\Delta P = RT\Delta c$, где Δ это градиент концентрации осмолита на 2-х сторонах мембраны, а $RT = 24,4$ Атм/М при $25^\circ C$. Закон Лапласа предсказывает, что плазматическая мембрана у шарообразных набухших клеток будет подвергаться напряжению $T = \Delta P r / 2$, где r это радиус клетки и

уменьшение внеклеточной концентрации NaCl на 5 мМ (~ 10 мОсм) приводит к увеличению поверхности $S=4\pi r^2$ на ~5%. Важно, что липидный бислой может выдержать только 3% увеличение S до разрыва {Kinnunen, 2002, 2005 /id}. Эта модель предполагает, что плазматическая мембрана у набухших клеток растянется, в свою очередь, приводя к конформационным изменениям в ионных каналах и других потенциально находящихся в мембране объёмных сенсорах.

Многочисленные исследования показали, что механическая чувствительность ионных каналов это свойство, такое же общее, как и чувствительность напряжения. (Sachs 2010). Кроме того, Callies с коллегами показали, что деполяризация мембраны может быть опосредована изменённой жесткостью мембраны. (Callies et al. 2011). Среди механочувствительных каналов, участвующих в движении осмолитов, наиболее заметными являются бактериальные каналы MscL и MscS и члены подсемейства транзиторных ваниллоидных рецепторов, обнаруженных в большинстве исследованных на этот предмет тканей, включая эндотелиальные и эпителиальные клетки (O'Neil and Heller 2005; Pedersen and Nilius 2007). Следует отметить, однако, что в отличие от бактериальных каналов, чья механочувствительность была продемонстрирована *in vivo*, активация каналов млекопитающих натяжением наблюдалась в пэтч-клямп экспериментах, использовавших вырезанные фрагменты, выдержанные при комнатной температуре. (Martinac 2011). Более того, активация TRPV4 каналов, зарегистрированная этим методом не была выявлена измерениями ионных потоков в экспериментах пэтч-клямп на целой клетке. (Strotmann et al. 2000).

Каноническая модель, рассмотренная выше, предполагает, что из-за растяжения плазматическая мембрана в набухших клетках становится более жёсткой. (Strange 2004). Однако, используя атомносиловую

микроскопию (АСМ), Spagnoli с коллегами показал, что в процессе осмотического набухания клетки млекопитающих становятся более мягкими, а не более жёсткими (Spagnoli et al. 2008). Эти данные показывают, что 2-х мерная механика закона Лапласа не может быть применима к нативным клеткам. Эти результаты также предполагают, что осмотический стресс оказывает влияние на 3-х мерный цитоплазматический гидрогель, физико-химические свойства которого напоминают пропитанную водой губку (для деталей, см. секцию 2.1.3.7).

Несколько фармакологических методов используются для оценки роли растяжения мембраны в передаче сигнала. Все типы изученных на данный момент механочувствительных ионных каналов ингибируются ионами Gd^{3+} . (Oberleithner and de Wardener 2011). Однако, вместе с ингибированием каналов, Gd^{3+} и другие лантаноиды сдавливают липидный бислой и проявляют высокоафинное связывание со всеми изученными на этот предмет белками. Таким, например, Boudreault с коллегами наблюдал, что при концентрациях 10-100 мкМ Gd^{3+} блокирует люциферазную активность. (Boudreault and Grygorczyk 2002). Sachs с коллегами сообщил, что активность механочувствительных каналов может ингибироваться GsMTx4, пептидом изолированным из яда тарантула. Этот компонент ингибировал RVD в клетках почек крыс, но не действовал на первичные крысиные астроциты и клетки эпителия почек собаки (Madin-Darby canine kidney - MDCK) (Hua et al. 2010).

Рассматривая 2-х мерную модель восприятия клеточного объёма через изменения натяжения плазматической мембраны, важно заметить, что из-за большого количества инвагинаций плазматической мембраны в ядерных клетках, создание значительной механической силы в процессе набухания или сжатия представляется маловероятным. В самом деле, электрофизиологические эксперименты не зарегистрировали изменений в ёмкости мембран (параметр, связанный с полной площадью мембраны)

даже при 2-х кратном увеличении клеточного объёма. (Bezanilla 2008). Для изучения роли мембранных резервов в изменениях объема клеток, был использован метод реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (Double Image Surface Reconstruction - DISUR) (Boudreault and Grygorczyk 2004;Fels et al. 2009;Groulx et al. 2006). Этот метод позволяет точно и быстро измерить высоту клетки, полную поверхность и объём с временным разрешением ~100 мс у одиночных прикрепленных к подложке клеток и рассмотрен нами в разделе 3.3. В этом исследовании, используя этот метод Гру с соавторами показали, что 3 вида ядерных клеток млекопитающих при помещении их в гипотоническую среду увеличивали их поверхность и объём до разрыва мембраны в ~3 и 10-раз соответственно (Groulx et al. 2006). Важно, что увеличение объёма клеток до 2-х кратного идёт за счёт изменения формы и разворачивания мембраны клетки, в то время как значительное включение эндомембранных структур происходит при экстремальном набухании. Это заключение согласуется с раскрытием мембранных впячиваний в процессе умеренного гипотонического набухания в опухолевых клетках Эрлиха и человеческих эритроцитах, выявленных сканирующей электронной микроскопией и АСМ, соответственно. (Hoffmann 2000) (Parshina et al. 2013). В этой связи необходимо отметить, что у эритроцитов млекопитающих, лишенных внутриклеточных мембран, разрыв плазматической мембраны происходит при умеренном (~70%) увеличении объёма (Kageyama et al. 1989).

Следует подчеркнуть, что данные, рассмотренные выше, не исключают возможное появление механического натяжения у высокоспециализированных клеток или в мембранных сегментах. Таким образом, например, клетки волос состоят из сотен стереоцил, заполненных актином, которые образуют ряды увеличением длины. В этих клетках, даже малейшее механическое отклонение пучка резко увеличивает механическое напряжение и растягивает мембранный компартмент,

ограниченный в пространстве, изобилующий ионными каналами (Gillespie and Walker 2001). У прикрепленных к субстрату клеток, лимитированная пространством плазматическая мембрана, изобилующая гетеродимерами α/β интегрин может быть рассмотрена как ещё один кандидат, где стресс натяжения может быть запущен набуханием клетки. Действительно, ингибирование интегрин/src киназного сигнала блокирует RVD в гепатоцитах. (vom Dahl et al. 2003; Schliess and Haussinger 2007). В миоцитах, интегриновый сигнал активирует объём регулируемые анионные каналы, в то время как в эпителиальных клетках почек он вовлечён в экспрессию отвечающего на напряжение усиливающего связи белка (TonEBP), запускаемого гиперосмотическим окружением. (Browe and Baumgarten 2004) (Moeckel et al. 2013).

Кавеолы, это специализированные впячивания плазматической мембраны с диаметром около 50 нм, находимые в большинстве животных клеток изученных на данный момент. В зависимости от типа клеток, они состоят из 4 изоформ специализированных белков, кавеолином и содержат большую концентрацию холестерина (Sowa 2012). Недавно показали, что кавеолы выступают в роли мембранного резерва, отвечая на механический стресс быстрым распадом. (Kozera et al. 2009) (Sihna et al. 2011). Trouet с коллегами сообщили, что доминантный негативный кавеолин-1 ингибирует объём-чувствительные анионные каналы в эндотелиальных клетках (Trouet et al. 2001). В отличие от этого, Eduarsen et al. Увидели, что целостность кавеол не нужна для регуляции клеточного объёма в адипоцитах. Таким образом, дополнительные эксперименты должны быть проведены для того, чтобы изучить роль кавеол в восприятии клеточного объёма. (Eduardsen et al. 2011)

2.1.3.5.Трёхмерный цитоскелет

Архитектура ядерных клеток поддерживается трёхмерным внутриклеточным цитоскелетом, состоящим из актиновых микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов (**Рис. 4а**). Несколько исследовательских команд отдали ключевую роль в ощущении клеточного объёма реорганизации сети цитоскелета (для обзора, см. Lang et al. 1998a;Hoffmann and Simonsen 1989;Hoffmann et al. 2009). В соответствии с этой гипотезой, изменения клеточного объёма, приводят к реорганизации сети цитоскелета, что в свою очередь воздействует на конформацию и функциональную активность различных белков, связанных с цитоскелетом. Эта гипотеза поддерживается двумя важнейшими наблюдениями. Первое, были найдены актиновые микрофиламенты в деполимеризованном и полимеризованном состоянии в различных не прикреплённых набухших и сжатых клетках, соответственно. Второе, в нескольких типах клеток, добавление агентов, разрушающих F-актин (цитохалазин, латрункулин) и агентов деполимеризующих микротрубочки (колхицин, винбластин) подавило RVI/RVD или другие объём зависимые клеточные ответы (для обзора см. (Papakonstanti et al. 2000;Di Ciano-Oliveira et al. 2006;Jakab et al. 2002;Hoffmann et al. 2009)). В наших недавних экспериментах, проведенных с помощью техники DISUR, не было замечено сколько-нибудь значительное действие винбластина и цитохалазина на RVD A549 клеток. (Platonova et al. 2013). Следует также отметить, что ионные потоки, связанные с объёмом были обнаружены в эритроцитах млекопитающих, в которых нет трёхмерного цитоскелета. (Parker 1993;Orlov et al. 1993).

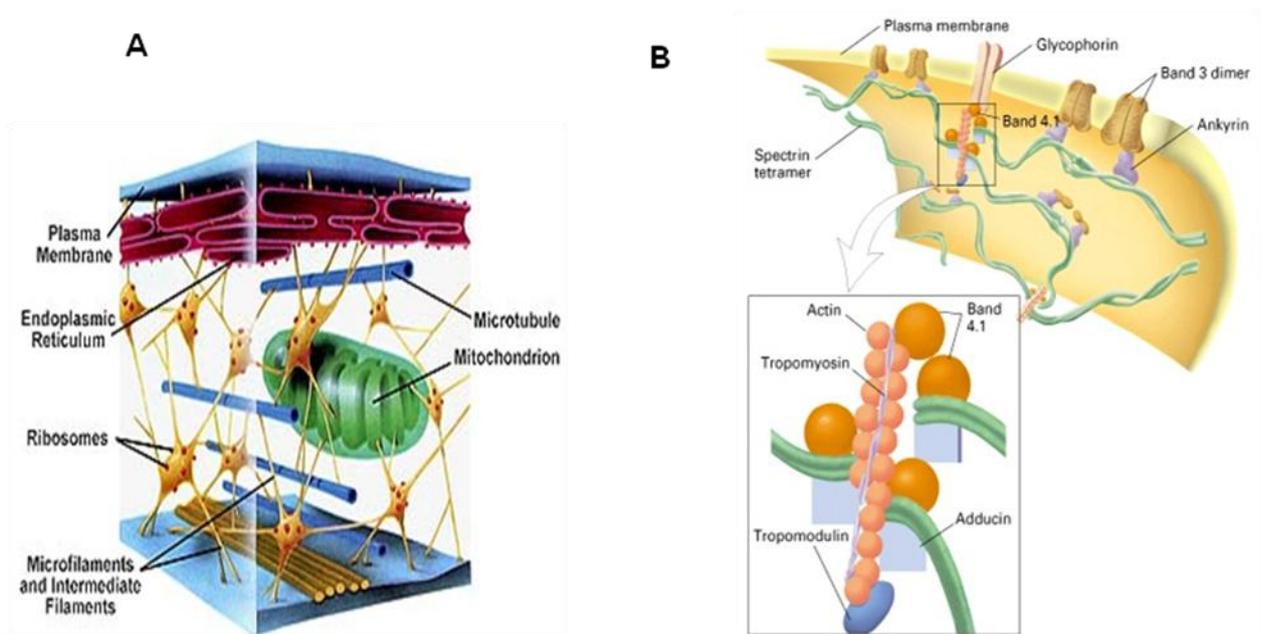


Рис. 4. Основные компоненты 3-х мерного цитоскелета (А) и 2-х мерного цитоскелета (мембранного каркаса) (В)

2.1.3.6. Двумерный цитоскелет (мембранный каркас) и полифосфоинозитиды

Архитектура плазматической мембраны поддерживается двумерной (2D) сеткой цитоскелета, которая находится прямо под плазматической мембраной и называется кортикальным цитоскелетом. Эта структура состоит из спектриновых гетеродимеров, актиновых волокон и белков, участвующих в регуляции спектрин-актиновых взаимодействий и закоривающих данную сеть к интегральным белкам мембраны и кислым фосфолипидам, включая полифосфоинозитиды. (Рис. 4В).

Безъядерные эритроциты млекопитающих, у которых нет типичного трёхмерного цитоскелета, зачастую используются для функционального анализа примембранной кортикальной сети цитоскелета. Фармакологические методы исследования мембранного каркаса пока не разработаны. Было показано, однако, что повышение температуры до 49-50°C приводит к необратимому плавлению спектриновых гетеродимеров в

человеческих и крысиных телях эритроцитов. (Brandts et al. 1978) (Shnyrov et al. 1990) (Brandts et al. 1978;Shnyrov et al. 1990;Gulak et al. 1984). В нашей лаборатории было установлено, что 10-минутная преинкубация крысиных эритроцитов при 49 °С убирает объём-зависимую регуляцию $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ и K^+, Cl^- котранспортёров (Orlov et al. 1993). На основании этих данных было предположена роль мембранного каркаса как сенсора изменений клеточного объёма.

В противоположность красным кровяным клеткам крысы, гиперосмотическое сжатие очень слабо действует на активность $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в эритроцитах человека. (Orlov et al. 1989). Учитывая это обстоятельство в экспериментах на эритроцитах человека изучалась активность K^+, Cl^- котранспорта. Было установлено, что 10-ти минутная преинкубация человеческих эритроцитов при 49 °С увеличивало базовую активность этого переносчика и резко снижало его активацию в ответ на гипоосмотическое набухание. (Orlov et al. 1997;Sachs 1998). Для дальнейшего изучения роли 2D кортикального цитоскелета в восприятии объёма, Паршина и сотрудники использовали АСМ. Этот метод выявил складчатый мембранный рельеф фиксированных человеческих эритроцитов со средней высотой волны 3-5 нм, покрытой глобулярными структурами с диаметром 40-50 нм и средней высотой 1-2 нм. Набухание эритроцитов из-за уменьшения осмолярности среды уменьшает высоту мембранных волн на 40% и увеличивает K^+, Cl^- котранспорт примерно в 6 раз. Как объём чувствительные изменения мембранного рельефа, так и активность K^+, Cl^- котранспорта отсутствовали после 10-ти минутной инкубации при 50 °С (Parshina et al. 2013). Эти результаты также предполагают, что объём-зависимая реорганизация 2D спектрин-актиновой сети участвует в регуляции активности объём-чувствительных ионных транспортёров.

Содержание фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP₂), находящегося на внутренней поверхности плазматической мембраны является главным регулятором полимеризации актиновых филаментов (Janmey and Lindberg 2004). Больше, чем 20 лет назад, Орлов с сотрудниками обнаружили, что гиперосмотическое сжатие резко увеличивает содержание PIP₂ в плазматической мембране эритроцитов крыс (Orlov et al. 1989). Позднее этот феномен был также обнаружен в ядерных клетках млекопитающих (Nasuhoglu et al. 2002; Yamamoto et al. 2006; Nielsen et al. 2007). Эти данные, дали возможность предположить центральную роль PIP₂ в реорганизации актиновых микрофиламентов при сжатии клеток (Yamamoto et al. 2006). Нельсен с коллегами предположили, что аккумуляция PIP₂ при сжатии клеток происходит из-за увеличения ионной силы цитоплазмы, а не из-за изменений клеточного объёма *per se*. (Nielsen et al. 2007). В этой связи необходимо отметить, что не смотря на одинаковое увеличение ионной силы, запускаемой гиперосмотическим сжатием, аккумуляцией PIP₂ которые и активация Na⁺,K⁺,2Cl⁻ котранспортёра и Na⁺/H⁺ обменника были обнаружены в эритроцитах крысы, но не человека (Orlov et al. 1989). Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих различий, остаются не исследованными.

Фосфорилирование фосфатидилинозитол 4-фосфата до PIP₂ катализируется PIP₂-киназой. Используя siRNA, Ямамото с коллегами показали, что и увеличение PIP₂ и реорганизация актинового цитоскелета в сжатых HeLa клетках приводит к отсутствию фосфатидилинозитолкиназы изоформы PIP₅K1B. Они также показали, что активация этой киназы исчезает при добавлении каликулина А – ингибиторе Ser/Thr фосфатазы 1. (Yamamoto et al. 2006). PIP₂ может быть далее фосфорилирован фосфатидил инозитол 3-киназой (PI-3K), в результате чего образуется фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат (PIP₃). Browe и Baumgarten показали, что ингибирование PI-3K вортманнином и LY294002 приводит к

исчезновению активации тока хлорида, запускаемого интегрин-зависимым натяжением кардиомиоцитов (Browe and Baumgarten 2006). Роль PI-3K в сигналинге, запускаемом клеточным набуханием, остается не изученной.

2.1.3.7. Концентрация макромолекул: цитоплазма как биогель

В 80-х, начале 90-х годов несколько групп предложили, что общая концентрация макромолекул в цитоплазме (т.н. macromolecular crowding) регулирует функции цитоплазматических белков (Minton 1981; Fulton 1982) и может служить сенсором клеточного объема (Minton et al. 1992; Parker 1993). Согласно концепции macromolecular crowding, изменение белок-белковых взаимодействий при набухании и сжатию активирует/ингибирует неидентифицированную серин-треониновую киназу, которая контролирует активность объем-зависимых транспортеров. Эта гипотеза получила экспериментальные подтверждения в эритроцитах, где манипуляции с цитоплазматической концентрацией белка регулируют чувствительность K^+ , Cl^- -котранспорта к набуханию и Na^+/H^+ -обмена к сжатию (Colclasure and Parker 1991; Colclasure and Parker 1992; Minton et al. 1992; Parker 1993). К сожалению, гипотеза macromolecular crowding не была проверена в ядерных клетках, где физико-химические свойства и общая концентрация белков в цитоплазме сильно отличаются от эритроцитов.

Высокая концентрация макромолекул, связанных сетью белков цитоскелета, определяют функционирование цитоплазмы как гидрогеля. Этот вывод был в начале поддержан данными, показывающими, что аксоплазма гигантского аксона после ее выдавливания в раствор с высоким содержанием K^+ удерживает цилиндрическую структуру (Brown and Lasek 1993). Недавно, Fels с соавторами показал, что пермеабиллизация плазматической мембраны со средними концентрациями дигитонина или амфотерицина В приводит к диссипации Доннановского равновесия и

набуханию клетки, но не воздействует на целостность ядерных клеток млекопитающих. (Fels et al. 2009). Неожиданно, они обнаружили, что пермеабелизованные клетки набухают и сжимаются в гипо- и гиперосмотических растворах, соответственно (**Рис. 5А**). Примечательно, запускаемые осмолярностью изменения объема были в несколько раз больше, чем те, что наблюдались у нативных клеток (**Рис. 5В**), что согласовывалось с высокой способностью биогеля цитоплазмы связывать воду. Связывание или отдача большого количества воды может привести к быстрому изменению физико-химических свойств биогеля, что позволяет рассматривать его как основной компонент осмосенсора.

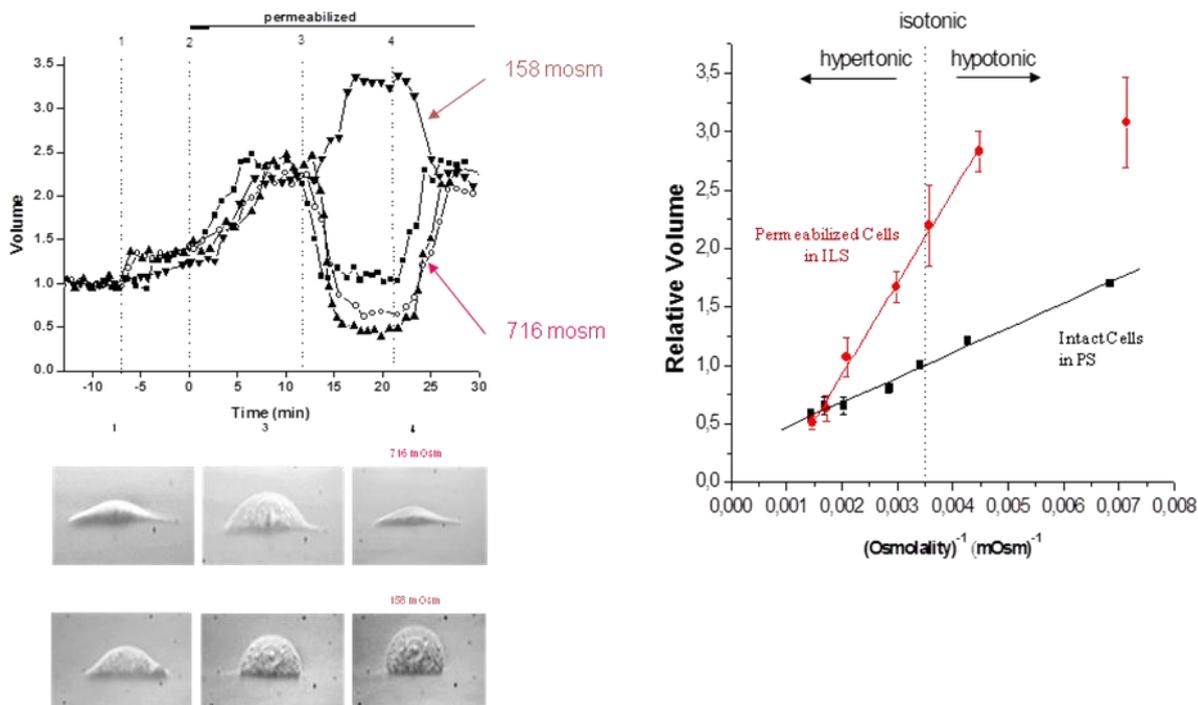


Рис. 5. А. Кинетика изменения объема пермеабелизованных A549 клеток после их перемещения в анизосмотические среды, полученная с помощью метода DISUR В. Зависимость объема интактных и пермеабелизованных A549 клеток в координатах Вант-Гоффа (Fels et al., 2009).

2.1.4. Внутриклеточная сигнализация, связанная с изменением объема клеток

Литература, посвященная объем-зависимым сигнальным системам необъятна. Например, обзор Ланга и коллег (Lang et al. 1998a) включает более 1400 *избранных* цитат. Вероятно, не существует ни одного классического каскада внутриклеточной сигнализации, который не был бы предложен на роль трансдуктора объемного сигнала. В этой связи важно отделить те внутриклеточные пути, которые участвуют в переносе объемного сигнала к исполнительным транспортерам, от тех каскадов, активность которых к этому прямого отношения не имеет. Данные по этому вопросу ввиду ограничения объема суммированы в **Таблице 2**. Для детального знакомства с этим вопросом мы рекомендуем обзоры (Mongin and Orlov 2001; Lang et al. 1998a; Hoffmann et al. 2009; Strange et al. 2006; Kahle et al. 2005).

Таблица 2. Основные системы внутриклеточной сигнализации, участвующие в трансдукции объемного сигнала (Mongin and Orlov 2001)

Внутриклеточный мессенджер или сигнальный каскад	Доказательства в пользу	Доводы против
<i>Внутриклеточный Ca²⁺</i>	В ряде клеток, осмотическое набухание вызывает увеличение [Ca ²⁺] _i . Безкальциевые среды и хелаторы Ca ²⁺ блокируют RVD и активацию ионных каналов.	В большинстве клеток RVD и активация ионных каналов, не требует увеличения [Ca ²⁺] _i .
<i>Кальмодулин (КМ)</i>	Антагонисты КМ блокируют: - RVD и активацию анионных каналов при набухании - RVI и активацию Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ котранспортера и Na ⁺ /H ⁺ -обменника при сжатии	Антагонисты КМ эффективны и в тех случаях, когда [Ca ²⁺] _i поддерживается на уровне ниже пороговой концентрации для активации КМ.
<i>Протеинкиназа С (ПКС)</i>	Ингибиторы ПКС устраняют RVD, влияние сжатия на анионные каналы и набухания на Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ котранспорт и Na ⁺ /H ⁺ -обмен	Влияние сжатия на ПКС не обнаружено. В большинстве клеток ПКС модулирует базальную активность объем-чувствительных транспортеров

<i>Киназа легких цепей миозина (MLCK)</i>	Активация при модуляции клеточного объема. Ингибиторы MLCK подавляют активацию Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорта при сжатию и анионных каналов при набухании	Только фармакологические доказательства участия; ингибиторы MLCK не обладают достаточно высокой специфичностью
<i>Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая киназа II КМ-ПК</i>	RVI – Ингибиторы КМ-ПК блокируют активацию Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорта	Недостаточно данных, чтобы судить об универсальности участия КМ-ПК в RVI. Не ясно может ли этот путь активироваться без увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$.
<i>Тирозиновые киназы (ТК)</i>	Активация ТК при набухании клеток. Во многих типах клеток RVD подавляется ингибиторами ТК. В лимфоцитах Src-киназа необходима для объемной регуляции анионных каналов	Ряд данных об активации каналов для органических осмотиков свидетельствуют в пользу того, что ТК не передают объемный сигнал, а модулируют объемную чувствительность.
<i>Фосфолипаза А (ФЛА)</i>	Ингибиторы ФЛА блокируют объемную регуляцию и активацию анионных каналов в тромбоцитах и асцитных клетках	Только фармакологические доказательства участия; ингибиторы ФЛА не обладают достаточно высокой специфичностью
<i>Эйкозаноиды (простагландины и лейкотриены)</i>	Эйкозаноиды высвобождаются при набухании клеток и активируют катионные и анионные каналы.	Недостаточно данных, чтобы судить об универсальности этого механизма, вероятно, этот путь не имеет функционального значения при сжатию

2.2. Физиологическое и патофизиологическое значение изменения объема клеток

Изменение объема оказывает влияние на целый ряд физиологических и патофизиологических реакций клетки, включая синтез и катаболизм гликогена, высвобождение гормонов и нейротрансмиттеров, процессы транскрипции и трансляции, генерацию активных форм кислорода, пролиферацию и миграцию клеток. Литература по этому вопросу огромна и проанализирована в целом ряде обзоров (Haussinger and Lang 1991a; Haussinger 1996; Lang et al. 1998a; Hoffmann et al. 2009; Mongin and Kimelberg 2005a; Dubois and Rouzaire-Dubois 2012). В этом разделе мы

рассмотрим данные о регуляции объема клеток гормонами и нейротрансмиттерами и о роли изменений объема в гибели клеток, имеющим непосредственное отношение к задачам нашей работы.

2.2.1. Изменение объема клеток при действии гормонов и нейротрансмиттеров

Рецептор-опосредованные механизмы регуляции объема клеток можно условно разделить на две группы. Лиганд-зависимые ионные каналы, активирующиеся при связывании лиганда непосредственно с каналом (Egan et al. 2006). Рецепторы, напрямую не связанные с каналами. Среди них наиболее изучены GPCR – рецепторы, сопряженные с GTP-связывающими G-белками (G-protein coupled receptor). Выделяют четыре подкласса G-белков: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$ и $G_{\alpha 12/13}$ (Lefkowitz 2007; Lefkowitz 2007). Сигнализация через GPCRs контролируется по принципу негативной обратной связи: если GPCRs подвергается длительной или повторяющейся стимуляции, то он подвергается десенситизации, приводящей к снижению способности рецептора активировать соответствующий G-белок и инициировать внутриклеточные сигнальные каскады. Этот процесс контролируется серин/треонин киназами GRKs (GPCR kinases), которые фосфорилируют GPCRs. GRK фосфорилирование увеличивает сродство GPCR к белкам класса аррестинов. Связывание аррестина в свою очередь предотвращает GPCR от связывания с G-белком и таким образом снижает функциональную активность сигнального пути до 80% (Lefkowitz 2007).

Как отмечалось выше, при нормальных физиологических условиях, осмолярность внеклеточной жидкости млекопитающих за исключением отделов, граничащих с эпителием почечных канальцев, поддерживается на постоянном уровне и клеточный объем определяется прежде всего

осмолярностью цитоплазмы, изменения которой может, обусловлено за счет нейрональной, гормональной и аутокринной активации транспортеров, обеспечивающих трансмембранный перенос одновалентных ионов и органических осмолитиков. Так, например, инсулин увеличивает объем клеток печени, активируя Na^+/H^+ обмен, $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ котранспорт и Na^+/K^+ -АТФазу (Schliess and Haussinger 2000). Синхронное действие этих транспортёров должно приводить к накоплению в клетке калия и впоследствии к набуханию. Запускаемый инсулином каскад является необходимой частью для генерации антипротеолитического ответа. Было установлено, что клеточное набухание, запускаемое инсулином, опосредуемо PI-3K и участвует в активации MAP-киназ. Условия, при которых мишени инсулина находятся в дегидратируемом состоянии, такие как гиперосмолярность или недостаток аминокислот, часто ассоциируются с устойчивостью к инсулину. В печени, гиперосмолярность нарушает PI-3K зависимое поглощение K^+ и клеточное набухание в ответ на инсулин, приводя к устойчивости MAP-киназ и протеолизу после регуляции инсулином (Schliess and Haussinger 2000). В противоположность инсулину, глюкагон уменьшает размер гепатоцитов, предположительно активируя ионные каналы (Haussinger and Lang 1991b; Hallbrucker et al. 1991). В самом деле, глюкагон активирует Na^+/K^+ -АТФазу, но одновременно уменьшает количество внутриклеточного K^+ , возможно в связи с одновременным открытием K^+ каналов, ингибируемых Ba^{2+} и хинидином (Haussinger 1996). Эффект увеличения объёма инсулина связывается с его антипротеолитическим действием. Наоборот, сжатие гепатоцитов глюкагоном приводит к его протеолитическому эффекту (Hallbrucker et al. 1991). Нужно подчеркнуть, что полумаксимальные эффекты инсулина и глюкагона на гидратацию клеток печени обнаружены при концентрации гормонов в крови воротной вены, т.е. 1.0 и 0.1 нМ соответственно

(Haussinger 1996). Блокирование изменения клеточного объёма в ответ на инсулин может быть общим знаменателем в устойчивости к инсулину, вызванной дегидратацией, наблюдаемых в клинических условиях при сепсисе, ожогах и сахарном диабете (Schliess and Haussinger 2000).

Факторы роста увеличивают клеточный объём стимулируя Na^+/H^+ обмен и частично НКСС котранспорт. Предполагается, что происходящее при этом увеличение клеточного объёма является предпосылкой для стимуляции клеточной пролиферации (Ritter and Woll 1996;Kapus et al. 1994;Orlowski and Grinstein 2004).

Несколько возбуждающих нейротрансмиттеров, такие как глутамин, активируют Na^+ каналы или неселективные катионные каналы с последующим входом натрия, деполяризацией, входом хлора и увеличением клетки. Некоторые нейротрансмиттеры, такие как гамма-аминобутиловая кислота (ГАБА), активируют калиевые каналы, приводя к гиперполяризации, выходу хлора и тем самым к уменьшению объёма (Lang et al. 1998a;El-Gharbawy et al. 2001). В нейронах симпатического ганглия крыс ГАБА активирует Cl^- каналы. Деполяризация из-за выхода Cl^- запускает выход K^+ через K^+ каналы. Клеточная потеря KCl приводит к сжатию клетки. Это, возможно, является сигналом для стимуляции $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ котранспорта. Переносчик не только возвращает клеточный объём, но также поддерживает внутриклеточную концентрацию Cl^- . Таким образом, деполяризация поддерживается в присутствии ГАБА. Если ГАБА действует вместе с ингибитором $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ котранспорта фуросемидом, то деполяризация временна из-за диссипации внутриклеточной активности Cl^- . Вероятно, что NaCl-KCl симпорт модифицирует эффект медиаторов у нескольких других нейронов и может играть роль в захвате внеклеточного K^+ клетками глии (Mongin and Kimelberg 2005a;Mongin 2007).

2.2.1.1. Пуриnergические рецепторы как регуляторы ионного транспорта

Данные приведенные выше и детально рассмотренные в обзорах (Vazquez-Juarez et al. 2008; Fisher et al. 2008; Franco et al. 2008)

указывают на ключевую роль рецепторов, связанных с G-белками, в регуляции объема клеток. В нашей работе мы обратили особое внимание на пуриnergические рецепторы (P2), которые активируются АТФ, УТФ и несколькими другими пуриновыми нуклеотидами (Burnstock 2007a). P2 рецепторы подразделяются на 2 больших группы P2X – рецептор-управляемые ионные каналы и P2Y – рецепторы, сопряженные с G белками (Рис. 6). На настоящий момент клонировано и функционально охарактеризовано 7 подтипов P2X (P2X₁₋₇) и 8 подтипов P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ и P2Y₁₄) рецепторов (Burnstock 2007a). Основные характеристики этих рецепторов представлены в Таблице 3.

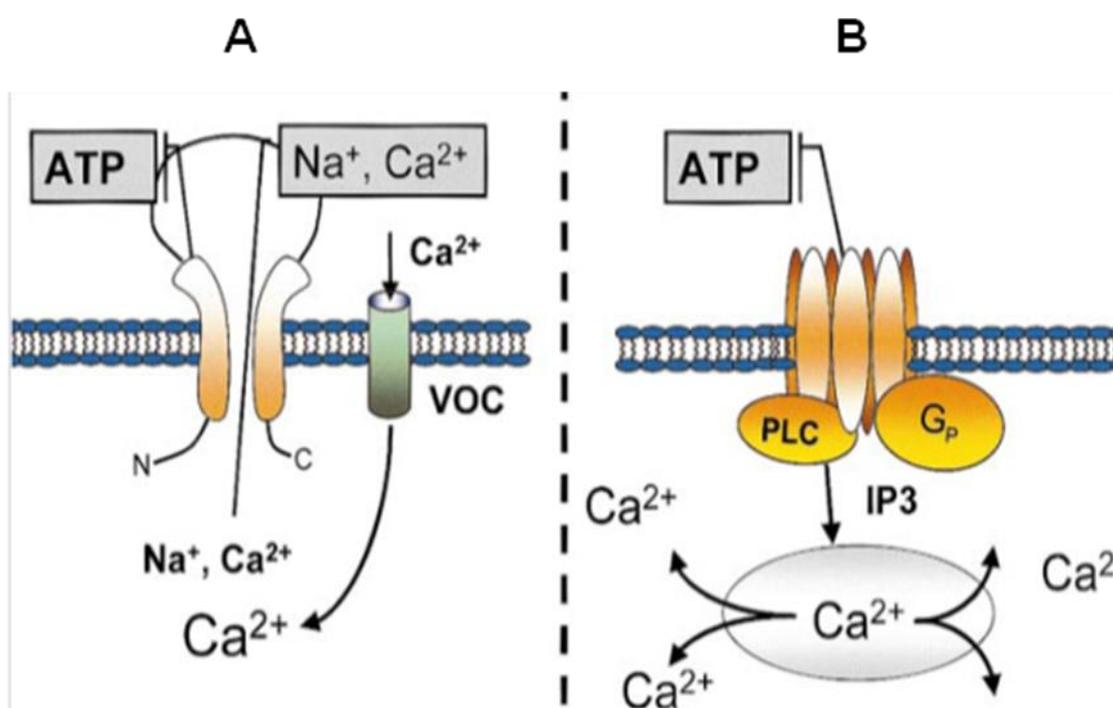


Рис 6. Схема, иллюстрирующая принцип работы P2X (A) и P2Y (B) рецепторов. Подробности см. в тексте.

Таблица 3. Основные характеристики P2 рецепторов (Burnstock 2007a; Burnstock 2007b; Rayment et al. 2007)

Рецептор	Локализация	Активаторы*	Ингибиторы*	Механизм трансдукции
P2X ₁	гладкие мышцы, тромбоциты, нейроны задних рогов спинного мозга	α, β -meATP=ATP=2-MeSATP, L- β, γ -meATP	TNP-ATP, IP5I, NF023 , NF449	катионный канал (Ca ²⁺ и Na ⁺)
P2X ₂	гладкие мышцы, ЦНС, сетчатка, хромоаффинные клетки, сенсорные и вегетативные ганглии	ATP \geq ATP γ S \geq 2MeSATP $\gg \alpha, \beta$ -meATP	сурамин , isoPPADS , RB2, NF770, NF279	ионный канал (главным образом Ca ²⁺)
P2X ₃	сенсорные нейроны, ядро одиночного пути, некоторые симпатические нейроны	2-MeSATP \geq ATP $\geq \alpha, \beta$ -meATP \geq Ap ₄ A	TNP-ATP, PPADS , A317491, NF110, Ip ₅ I, phenol red	катионный канал
P2X ₄	ЦНС, семенники, толстая кишка, гладкие мышцы	ATP $\gg \alpha, \beta$ -meATP, CTP	TNP-ATP (слабый), BBG (слабый), фенолфталеин	ионный канал (особенно Ca ²⁺)
P2X ₅	пролиферирующие клетки кожи, пищеварительный тракт, мочевого пузырь, тимус, спинной мозг, гладкие мышцы	ATP $\gg \alpha, \beta$ -meATP, ATP γ S	сурамин , PPADS , BBG	ионный канал
P2X ₆	ЦНС, двигательные нейроны спинного мозга	-	-	ионный канал
P2X ₇	клетки иммунной системы, кожи, поджелудочной железы	BzATP \gg ATP \geq 2-MeSATP $\gg \alpha, \beta$ -meATP	KN62, KN04, MRS2427, OATP кумасси бриллиантовый	катионный канал и большая пора с пролонгированной активацией
P2Y ₁	эпителиальные и эндотелиальные клетки, тромбоциты, клетки иммунной системы,	2-MeSADP=ADP β S \gg 2-MeSATP=ADP \gg AT	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT	активация G _{aq} ; PLC- β
P2Y ₂	иммунные клетки, эпителиальные и эндотелиальные клетки, почечные каналцы,	UTP=ATP , UTP γ S, INS 37217, INS365	сурамин \gg RB2, ARC126313	активация G _{aq} и возможно G _{ai/o} ; PLC- β

P2Y ₄	эндотелиальные клетки, гладкие мышцы	UTP \geq ATP, UTP γ S, INS 37217	RB2 > сурамин	активация G _{aq} и возможно G _{ai/o} ; PLC- β
P2Y ₆	некоторые эпителиальные клетки, плацента, Т-клетки,	UDP>UTP>>ATP, UDP β S, IDP	MRS2578	активация G _{aq} ; PLC- β
P2Y ₁₁	селезенка, кишечник, гранулоциты	ARC67085MX> BzATP \geq ATP γ S>ATP	сурамин>RB2, NF157, 5'- AMPS	активация G _{aq} и G _{as} ; PLC- β
P2Y ₁₂	тромбоциты, глиальные клетки	2- MeSADP \geq ADP>>ATP	CT50547, ARC69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096,	G _{ai/o} ; ингибирование аденилатциклазы
P2Y ₁₃	селезенка, головной мозг, костный мозг, лимфатические узлы	ADP=2- MeSADP>>ATP=2- MeSATP	MRS2211, 2- MeSAMP	G _{ai/o}
P2Y ₁₄	плацента, жировая ткань, желудок, кишечник, отдельные участки мозга	UDP glucose = UDP-galactose	-	G _{aq}

* Сокращения: BBG - Brilliant Blue Green, BzATP - 2'-&3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP, CTP - cytosine triphosphate, Ip5I - di-inosine pentaphosphate, 2-Me-SADP - 2-methylthio ADP, 2-MeSATP - 2-methylthio ATP, PLC - фосфолипаза C, RB2 - reactive blue 2. Выделены соединения, использованы в нашей работе.

Кроме специфических рецепторов обязательным условием проведения внеклеточного сигнала является наличие систем, приводящих к быстрой нормализации локальной концентрации агонисты. В случае пуринергической системы гидролиз АТФ до АМФ и аденозина осуществляют нуклеозид трифосфат дифосфогидролазы (NTPDases 1, 2, 3 и 8), нуклеотид пирофосфатазы (NPP 1, 2 и 3), алкалин фосфатазу и 5'-нуклеотидазу (Zimmermann 2006), которые относятся к суперсемейству экто-АТФаз, впервые обнаруженных в лаборатории В.А. Энгельгардта (Wenkstern and Engelhardt 1959; Orlov 2007; Orlov 2007). Пуринергическая сигнализация включает высвобождение АТФ совместно с такими «классическими» нейротрансмиттерами, как норадреналин и ацетилхолин

в различных типах нейронов периферической и центральной нервной системы, а также экзо- и эндокринное высвобождение пуринов из нейрональных клеток. АТР, высвобождающийся как котрансмиттер из различных нервных окончаний, может активировать различные рецепторы. Так, например, АТР высвобождающийся с норадреналином и нейропептидом Y из периваскулярных симпатических нервов действует на P2X и P2Y рецепторы гладкомышечных клеток (ГМК), вызывая их сокращение, тогда как АТР высвобождающийся совместно с кальцийтоном генсвязанным пептидом (calcitonin gene-related peptide), субстанцией P и нейрокинином A из сенсорно-моторных нервов во время “аксон-рефлекса” действует на P2Y рецепторы и приводит либо к расслаблению, либо к сокращению ГМК. АТР и УТР, высвобождающийся из эндотелиальных клеток во время напряжения сдвига (shear stress) и гипоксии, приводит к аутокринной активации P2Y рецепторов, образованию оксида азота (NO) и последующей вазодилатации. Высвобождающийся из агрегирующих тромбоцитов АТФ вместе с АДФ так же действует на эндотелиальные рецепторы (Burnstock 2006a; Burnstock 2006b).

Специальная роль в регуляции клеточного объёма предположительно принадлежит пуринергическим рецепторам, связанным с G белкам из семейства P2Y, которые активируются АТФ, УТФ и УТП и несколькими другими пуриновыми (Таблица 3). Например, в двух клеточных линиях Madin-Darby canine kidney (MDCK), C7 и C11, которые соответственно представляют собой главные и вставочные клетки собирательных трубочек, АТФ вызывает транзиторную активацию объем-чувствительного $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспортёра NKCC1. В C11-MDCK клетках, за первоначальной пуринергической активацией NKCC1 следует полное ингибирование этого переносчика (Akimova et al. 2006a). В глиальных клетках мозга, астроцитах, АТФ потенцировано модулирует

открытие объём-регулируемых анионных каналов (VRAC) и, таким образом, контролируется выброс из глии нейротрансмиттера глутамата (Mongin and Kimelberg 2005b). В гепатоцитах, аутокринный выброс АТФ и активация P2Y рецепторов по всей видимости являются обязательным условием активации VRAC и последующего RVD (Wang et al. 1996).

В отличие от большего количества данных, показывающих ключевую роль пуриnergических рецепторов в регуляции ионного транспорта, систематическое исследование их роли в регуляции объема до сих пор не проводилось, что отчасти связано с методическими ограничениями, рассмотренными в разделе 2.3. В нашей работе мы использовали преимущества техники, DISUR, рассмотренной в Разделе 3.3, для исследования роли P2 рецепторов в регуляции объема C11-MDCK клеток.

2.2.2. Изменение объема клеток при действии факторов, приводящих к гибели клеток

Клеточная смерть сопровождается диссипацией электрохимического градиента моновалентных ионов через плазматическую мембрану, что в свою очередь, может быть достаточным условием изменения клеточного объема (Lang et al. 1998a; Lang et al. 2005; Hoffmann et al. 2009; Haussinger and Reinehr 2011). До последнего времени, считалось твердо установленным, что сжатие и набухание клеток является обязательными признаками, двух морфологически различных форм клеточной смерти, апоптоза и некроза, соответственно, и что изменения клеточного объема является непосредственной причиной запуска и/или развития клеточной смерти. В этом разделе мы рассматриваем литературу, посвященную этим вопросам биофизики клетки.

2.2.2.1 Изменение клеточного объёма как подход для классификации клеточной смерти

Два морфологически-различные типа клеточной смерти были зарегистрированы в исследованиях образцов тканей. Смерть группы соседних клеток, вызванная гипоксией, гипертермией, вирусной или бактериальной инфекцией или присутствием токсинов и ядов известна как *некроз*, термин введённый более ста лет назад Вирховым. Некротические стимулы приводят к набуханию клетки, разрыву плазматической мембраны, выбросу лизосомальных энзимов, образованию очага воспаления и поглощению разрушенных клеток макрофагами (Duvall and Wyllie 1986; Jordan and Harrison 1999; Cotter et al. 1990). В противоположность некрозу, клеточная смерть единичных клеток без воспаления называется *апоптозом*. Этот вариант клеточной смерти сопровождается сжатием клетки и конденсацией ядра, изменением формы плазматической мембраны (инвагинацией с образованием пузырьков, получивших в англоязычной литературе название “membrane blebbing”), фрагментацией ядра и формированием апоптотических телец. На начальных этапах, апоптоз происходит без разрыва плазматической мембраны и утечки компонентов цитоплазмы, лежащего в основе воспалительного ответа тканей. Апоптоз может запускаться как *внутренними так и или внешними* стимулами. К внутренним стимулам относится стауроспорин (неселективный ингибитор протеин киназы C), тапсигаргин (ингибитор Ca^{2+} насоса саркоплазматического ретикулума), этопозид (ингибитор топоизомеразы II ДНК), дексаметазон и некоторые другие стероидные соединения, а также радиация, взаимодействующая с ДНК и другими внутриклеточными мишенями. Воздействие этих факторов сопровождается выходом из митохондрии цитохрома c, который вместе с апоптотическим протеаз-активирующим фактором, стимулирует прокаспазу-9, относящуюся к семейству цистеиновых протеаз со

специфичностью к остаткам аспартата. К внешним стимулам апоптоза относятся Fas-лиганд (Fas-L) и члены семейства фактора некроза опухоли (TNF), взаимодействующие с рецептором CD95, который в свою очередь рекрутирует прокаспазу-8. Как «внутренний» так и «внешний» завершаются активацией каспазы-3 (Duvall and Wyllie 1986; Bortner and Cidlowski 2011).

Множество биохимических изменений, таких как выход цитохрома с из митохондрии, активация каспаз, экспозиция фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны, разрушение хроматина и деградация ДНК с появлением множества фрагментов 180- 200 парных фрагментов (так называемых DNA laddering), были описаны как универсальные маркеры апоптотических клеток (Duvall and Wyllie 1986). Следует однако отметить, что выброс цитохрома наблюдался в клетках Jurkat, претерпевающих смерть клеток морфологически идентичную некрозу (Heiden et al. 1997), и ингибиторы каспаз замедляют развитие клеточной смерти, вызванной гипоксией и токсинами, т.е. классическими стимулами некроза (Shimizu et al. 1996). Более того, активация каспазы-3 является обязательным условием активации T клеточного рецептора и описана в интактных лимфоцитах (Alam et al. 1990). В свою очередь, имеются примеры смерти клеток, морфологически идентичной апоптозу, которая происходит в отсутствие межнуклеосомального расщепления ДНК и образования фрагментов хроматина (Columbano 1995), в то время как оба эти процесса обнаружены во время некротической смерти клеток (Columbano 1995). Транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны происходит из-за увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и активации скрамблазы (Zhou et al. 1997), то есть процессов, отмеченных в ходе различных физиологических и патофизиологических реакций клетки, включая активацию тромбоцитов (Gyulhandanyan et al.

2012) и гемолиз эритроцитов, вызванный гипотоническим набуханием (Williamson et al. 1985).

Уже в первых работах, посвященных описанию апоптоза в клетках иммунной системы, уменьшенный клеточный объём воспринимался как отличительный признак этого вида клеточной смерти, получившей название «некроз, опосредованный сжатием» (Kerr et al. 1972). Позднее, различия изменения объема умирающих клеткок было классифицировано Окада с сотрудниками как *necrotic volume increase* (NVI) и *apoptotic volume decrease* (AVD) (Okada et al. 2001). Данные приведённые ниже показывают, что однонаправленные изменения активности ионных транспортёров оказывают тканеспецифическое влияние на объем клеток, что в свою очередь подразумевает тканеспецифический нежели универсальный характер вовлечения изменений клеточного объема на запуск и развитие клеточной смерти.

2.2.2.2 Термодинамическая модель вовлечения мембранных транспортеров в изменения клеточного объёма

Термодинамические модели предсказывают, что окончательное действие стимула клеточной смерти на клеточный объём зависит от различных параметров, включая электрохимический потенциал мембраны (E_m), относительную проводимость моновалентных катионов (P_{Na} , P_K , P_{Cl}) идвигающую силу, предсказанную из их электрохимического градиента. Так, например, в электрически-возбудимых клетках с $E_m \sim E_K$, $[K^+]_i = [K^+]_{iN}$ и $[Cl^-]_i > [Cl^-]_{iN}$, активация K^+ каналов не воздействует на клеточный объём. Здесь, $[K^+]_{iN}$ и $[Cl^-]_{iN}$ означают внутриклеточную концентрацию K^+ и Cl^- в условиях равновесия Нернста. В этом типе клеток, сжатие клеток может запускаться стимуляцией Cl^- каналов которые, в свою очередь, могут привести к деполяризации мембраны и выходу K^+ (Рис. 7А). Напротив, в

эритроцитах млекопитающих и других клетках с $E_m \sim E_{Cl}$, $[K^+]_i > [K^+]_{iN}$, $[Cl^-]_i \sim [Cl^-]_{iN}$ и $P_{Cl} \gg P_K$ активация K^+ каналов приводит к гиперполяризации и выходу Cl^- и осмотически-связанной воды (Рис. 7В). Этот случай суицидальной клеточной смерти, опосредуемый увеличением $[Ca^{2+}]_i$ и активацией Ca^{2+} -регулируемых K^+ каналов со средней проводимостью (IK_{Ca}) детально исследован в лаборатории д-ра Ланга и получил название эриптоза (Lang et al. 2003b; Schneider et al. 2007; Lang et al. 2003a). В клетках с $E_K \sim E_{Cl} \sim E_m$, активация K^+ или Cl^- каналов приводит к противоположным эффектам на Cl^- и K^+ потоки, минимизируя или даже противодействуя их вовлечению в регуляции объема клеток. Так, например, в клетках Jurkat проходящих апоптоз в присутствии Fas-L или керамидов, активность потенциал зависимых K^+ каналов ($K_V1.3$) уменьшается, а не увеличивается (Szabo et al. 1996; Gulbins et al. 1997a).

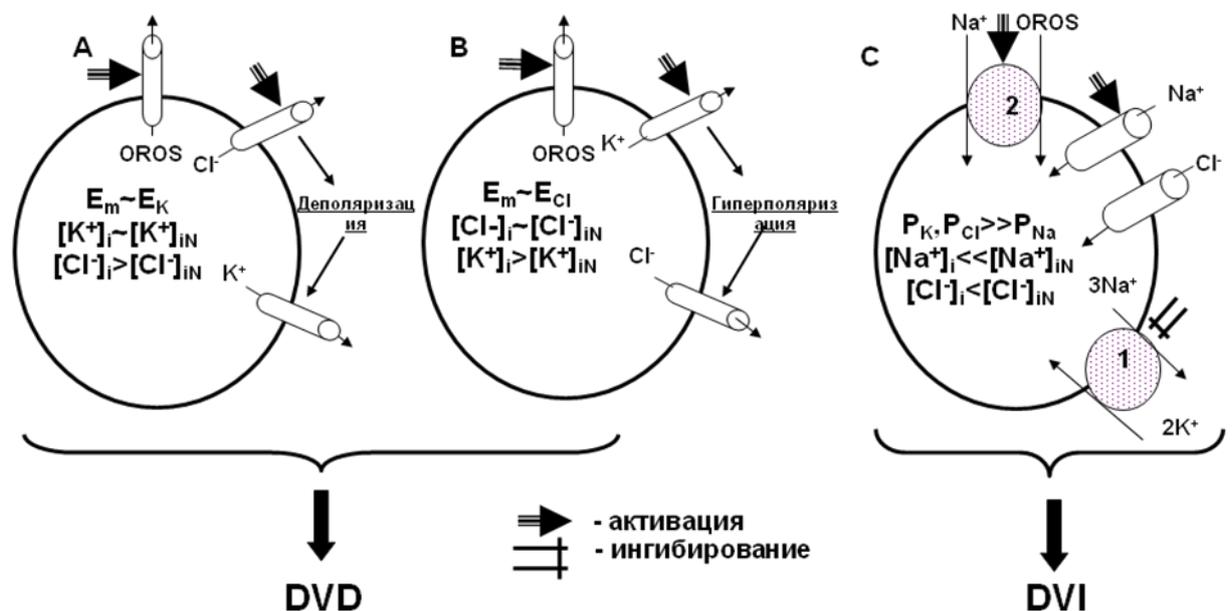


Рис. 7. Термодинамическая модель путей ионного транспорта, участвующих в уменьшение (DVD) и в увеличение (DVI) объёма умирающей клетки. Рисунки А и В иллюстрируют перекрёстное влияние K^+ и Cl^- каналов, запускающих DVD в клетках с разным мембранным потенциалом (E_m) и внутриклеточными K^+ ($[K^+]_i$) и Cl^- ($[Cl^-]_i$) концентрациями. Рисунок С показывает ионные транспортёры, участвующие в DVI. 1 – Na^+,K^+ -ATPase; 2 – Na^+ -связанный транспорт органических осмолитов (OROS). Для расшифровок других аббревиатур, см. текст.

В отличие от AVD, NVI может быть опосредовано активацией Na^+/H^+ обменника и других направленных внутрь, Na^+ -связанных транспортеров, включая $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$, $\text{Na}^+,\text{HCO}_3^-$ и Na^+,P_i котранспортеры, или симпортом Na^+ и низкомолекулярных органических осмолитов. В самом деле, рядом исследователей было показано, что развитие апоптоза связано с ингибированием Na^+/H^+ обменника (для обзора, см (Lang and Hoffmann 2011)). Однако, насколько нам известно, никто не показал объем-зависимое участие этого переносчика в некротическом варианте клеточной смерти. Альтернативная модель предлагает, что NVI запускается накоплением Na^+ через активацию неселективных катионных каналов (Nielsen et al. 2007) (**Рис. 7С**). Увеличенная проходимость для Na^+ , в свою очередь, приводит к диссипации Гиббс-Доннановского равновесия, которое заканчивается деполяризацией мембраны и аккумуляцией Cl^- и осмотически связанной воды (Carini et al. 1999). Диссипация Гиббс-Доннановского равновесия также ускоряется недостатком энергии, происходящим из-за активации Na^+,K^+ -АТФ-азы в надежде нормализовать $[\text{Na}^+]_i$ в ущерб высокому потреблению АТФ. Данные, подтверждающие эту модель, были в основном получены на ишемических гепатоцитах (Carini et al. 1995).

Вместе с увеличением накопления Na^+ , вызванного активацией входящих потоков этого катиона, NVI может быть запущен продолжительным ингибированием Na^+,K^+ -АТФ-азы (**Рис. 7С**). Необходимо отметить, что эта модель применима к клеткам с $P_{\text{K}} < P_{\text{Cl}}$ и $P_{\text{Cl}} > P_{\text{Na}}$, $[\text{Cl}^-]_i < [\text{Cl}^-]_{iN}$ и $[\text{Na}^+]_i < [\text{Na}^+]_{iN}$, и время развития NVI зависит от скорости входа Na^+ (Macknight and Leaf 1977). Но и в данном случае имеются существенные тканеспецифические различия. Так, например, продолжительное ингибирование Na^+,K^+ -АТФ-азы не изменило объема,

измеряемого как пространство, доступное для [^{14}C]-мочевины, в клетках Jurkat (Nobel et al. 2000) и клетках гладкой мускулатуры (VSMC) аорты крыс (Taurin et al. 2002a), и уменьшало, а не увеличивало объём кардиомиоцитов (Smith et al. 1993). Последний феномен возможно обусловлен выходом K^+ через Ca^{2+} -активированные каналы и из-за недостатка притока Na^+ в силу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника, обнаруженного в этих клетках (Blaustein and Lederer 1999). В самом деле, в безкальциевой среде ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азы убаином сопровождалось набуханием, а не сжатием кардиомиоцитов (Smith et al. 1993).

2.2.2.3. Изменения объёма, запускаемые стимулами клеточной смерти

Анализ изменений объёма в клетках, подверженных влиянию апоптотических стимулов зафиксировал 2 стадии AVD. Первая стадия наблюдается в отсутствии морфологических маркёров и связана с 10-30% уменьшением клеточного объёма. Вторая стадия представляет собой 50-70% уменьшение клеточного объёма и развивается параллельно с пузырением плазматической мембраны, также как и с накоплением апоптотических телец (Beauvais et al. 1995; Bortner and Cidlowski 2011). Этот вывод, однако, противоречит сообщениям об отсутствии первичного AVD в клетках, претерпевающих морфологически идентичный апоптоз (Hortelano et al. 2002).

Эти данные, равно как и термодинамический анализ последствий изменения активности ионных транспортеров предполагают, что клеточное сжатие не может быть принято как универсальный маркёр апоптоза. В этой связи можно предположить, что апоптоз должен быть далее классифицирован в соответствии с особенностями поведения клеточного объёма. Однако такая классификация кажется преждевременной. В самом деле, учитывая отсутствие каких-либо

количественных биохимических маркёров апоптоза, Kroemer с коллегами полагают, что «классификация типов клеточной смерти – задача более важная для судебного отдела полиции, чем для научного сообщества, исследующего биохимические и биофизические механизмы клеточной смерти» (Kroemer et al. 2005). Иными словами, является ли классификация клеточной смерти на апоптоз, некроз и т.д. в отсутствие однозначных биохимических маркеров хоть сколько-то полезной? Имея эту неопределённость ввиду Номенклатурный комитет клеточной смерти предложил заменить привлекательные греческие слова апоптоз и некроз на выражения, такие как «клеточная смерть, запускаемая осмотическим шоком», «клеточная смерть, запускаемая устранением ростовых факторов», и т.д. (Kroemer et al. 2005). В этой связи мы предложили исключить термины AVD и NVI (Orlov et al. 2013), оставляя DVD (dying cell volume decrease (уменьшение объёма умирающей клетки)) и DVI (dying cell volume increase (увеличение объёма умирающей клетки)) для описания процессов сжатия и набухания, регистрируемых в умирающих клетках.

Наряду с концептуальными проблемами, противоречивость данных об изменении объема при действии факторов, приводящих к смерти клеток, объясняется методическими ограничениями, рассмотренными в заключительной главе обзора литературы. Учитывая это обстоятельство, мы использовали для исследования изменений объема умирающих клеток методику DISUR, которая позволила нам одновременно измерять клеточную высоту, всю площадь поверхности и объём нетронутой, прикрепленной к субстрату клетки с временным разрешением ~100 мс (Boudreault and Grygorczyk 2004).

2.2.2.4. Является ли сжатие достаточным стимулом для смерти клеток?

Несколько независимых подходов использовались для ответа на этот вопрос. Эти данные кратко суммированы ниже. Для более подробного обзора, см. (Gulbins et al. 2001; Bortner and Cidlowski 1998; Bortner and Cidlowski 2007; Lang et al. 2004; Lang and Hoffmann 2011).

DVD кинетика. Сопоставление кинетики DVD и появления биохимических и морфологических маркеров клеточной смерти, указывает на то, что их временные различия определяются как типом исследованных клеток, так и природой стимула, вызывающих их гибель. Так, в клетках U973, KB, NG108-15, HeLa и человеческих Т лимфоцитах, обработанных стауроспорином, уменьшение объема наблюдалось за 2-5 часов до того апоптотических изменений ядра и было устойчиво к набору ингибиторов каспаз (Wesselborg and Kabelitz 1993). Напротив, уменьшение объема Jurkat клеток, обработанных Fas-лигандом, был выявлен только в популяции клеток, обладающих нарушенной целостностью ДНК, потерей митохондриального потенциала и активированной каспазой-3 (Bortner and Cidlowski 1996; Bortner et al. 1997; Bortner and Cidlowski 1999; Thompson et al. 2001; Bortner et al. 2008). В этом случае сжатие клеток подавлялась ингибитором каспазы zVAD.fmk (Nobel et al. 2000). Таким образом, в этом случае DVD может участвовать в развитии механизма клеточной смерти на этапе ниже активации каспазы. Первичное DVD тоже не было замечено в клетках HeLa, облученных УФ-светом, и в тимоцитах крысы, облученных жесткой гамма-радиацией (Ohyama et al. 1981).

Эффект гипер- и изоосмотического сжатия. Гиперосмотическое сжатие, запускаемое приростом осмоляльности от 300 до 600-700 мОсм, приводит к смерти клеток иммунной системы (Bortner and Cidlowski 1996; Orlov et al. 1999с), эндотелиальных клеток сосудов (Malek et al.

1998; Alfieri et al. 2002; Kim et al. 2002), mIMCD3 почечных эпителиальных клеток (Michea et al. 2000), HeLa клеток (Bilney and Murray 1998) и D54-MG клеток глиомы человека (Ernest et al. 2008). Во всех цитированных исследованиях, умирающие клетки обладали маркерами «классического» апоптоза, таких как деградация ДНК, расщепление хроматина, появление фосфатидилсерина и активация каспаз. Должно быть замечено, однако, что похожее увеличение осмоляльности среды лишь частично увеличило апоптоз в клетках нейробластомы SH-SY5Y (Matthew and Feldman 1996) и не действовало на клетки MDCK (Orlov et al. 1996a), Cos-7, GH₃ и HeLa клетки (Bortner and Cidlowski 1996). Более того, Lang с коллегами наблюдали, что 20-30% увеличение осмоляльности ингибировало, а не запустило апоптоз в Jurkat клетках, обработанных Fas-лигандом (Gulbins et al. 1997b).

Различная чувствительность клеток млекопитающих к гипертоническому окружению была подтверждена сравнительным анализом дозовых зависимостей увеличения осмоляльности на выживание клеток (Orlov et al. 2004a). Эти эксперименты показали, что добавление 300 мМ маннитола увеличивает фрагментацию хроматина в Jurkat и эндотелиальных клетках свиной аорты (РАЕС) в ~10- и 2-раза, соответственно, но не влияет на разрушение хроматина в MDCK клетках. Самая низкая чувствительность к осмоляльности среды была обнаружена в клетках гладкой мускулатуры аорты крысы (VSMC). В этих клетках, разрушение хроматина даже в присутствии 500 мМ маннитола не превышало 10% от общего содержания [³H]-меченой ДНК (**Рис. 8А**). Высокая сопротивляемость апоптозу была также выявлена в хондроцитах, подвергнутых гиперосмотическому действию. (Lewis et al. 2013). Было установлено, что вне зависимости от происхождения клетки, добавление 400 мМ маннитола уменьшало объём клеток, измеренный по объёму пространства, доступного для [¹⁴C]-мочевины, на ~40% (**Рис. 8В**),

Необходимо отметить, что это в 2 раза больше значений уменьшения объема клеток, обнаруженных до проявления первых маркеров клеточной смерти (см. выше).

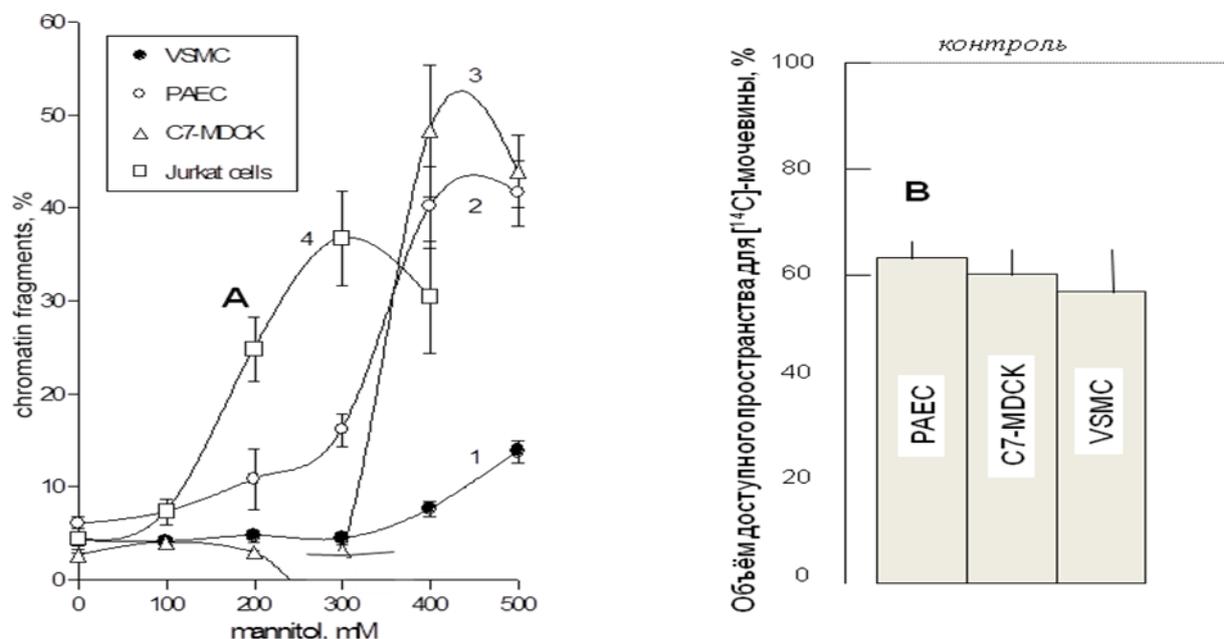


Рис. 8. Эффект гипертоничности на апоптоз и клеточный объём. **А.** Доза зависимое действие маннитола на разрушение хроматина в гладкомышечных клетках сосудов из аорты крысы (VSMC), в эндотелиальных клетках аорты свиньи (PAEC), эпителиальных клетках Мадин-Дарби почек собак (C7-MDCK) и Юркат клетках. **В.** Объём доступного места для [14C]-мочевины в VSMC, PAEC и C7-MDCK клетках с 30-мин инкубацией в присутствии 400 мМ маннитола (Orlov *et al.*, 2004).

Физиологические последствия гиперосмотического и изоосмотического сжатия могут существенно различаться (Koltsova *et al.* 2012a). Действительно, гиперосмотическое сжатие увеличивает внутриклеточную ионную силу, в то время как изоосмотическое сжатие, опосредуется потерей внутриклеточных осмолитов. В этой связи было использовано несколько независимых подходов для изучения роли изменения клеточного объёма в генерации сигналов, приводящих к клеточной смерти. Известно, что большинство клеток подверженных действию гипотонического раствора проходят быстрое RVD,

происходящее из-за выхода внутриклеточных осмолитов, и нормализации осмоляльности среды, приводит к сжатию клеток (Lang et al. 1998a). Мы наблюдали, что этот т.н. “post-RVD” протокол уменьшал объём гладкомышечных клеток, трансфицированных E1A аденовирусом (E1A-VSMC клетки) в ~2-раза, но не снижал их выживаемость (Orlov et al. 2004a). Для сравнения, ~20-30% изменение клеточного объёма, запускаемое изотонической заменой Cl⁻ на глюконат или аспартат или Na⁺ на N-метил-D-глутамин, приводит к смерти HeLa и U937 клеток, с каноническими маркерами апоптоза (Nukui et al. 2006; Maeno et al. 2006a). В этой связи следует отметить, что наряду с сжатием клеток, обеднение среды Na⁺- и Cl⁻ влияет на концентрацию моновалентных ионов внутри клетки, что в свою очередь может модифицировать развитие клеточной смерти через регуляцию экспрессии набора генов, в том числе генов вовлеченных в процессы пролиферации и смерти клеток (Koltsova et al. 2012b; Orlov et al. 2013).

Эффект среды с высоким содержанием K⁺. В большом количестве клеточных линий, DVD опосредован потерей K⁺, основного внутриклеточного неорганического осмолита. Так, в тимоцитах, подвергнутых обработке дексаметазоном, концентрация K_i⁺ —, измеренная методом плазменной масс-спектрометрии и ⁸⁶Rb как радиоактивного аналога K⁺, уменьшалась в 2-3-раза (Hughes et al. 1997; Gomez-Angelats et al. 2000). Активация апоптоза в клетках SEM-C7A, обработанных дексаметазоном, сопровождалось ~40% потерей K⁺, измеренной методом плазменной фотометрией (Benson et al. 1996). Похожее уменьшение K_i⁺ наблюдалось в мышечных L клетках, претерпевающих апоптоз в присутствии ингибиторов клеточного цикла (Barbiero et al. 1995). Две фазы изменений внутриклеточного содержания моновалентных ионов были показаны в клетках U937 при действии стауроспорина. Ранняя фаза, при которой происходит уменьшение K_i⁺ и Cl_i⁻, соответствует клеточному

сжатию и предшествует активации каспазы 3, в то время как следующая фаза, начинающаяся с активации каспазы 3, была характеризуется накоплением Na^+ (Arrebola et al. 2005). В Jurkat клетках, обработанных Fas-L, увеличение входа ^{86}Rb в 2 раза было полностью блокировано ингибитором пан каспазы zVAD.fmk (Nobel et al. 2000), предполагая, что эти события являются следствием, а не механизмом апоптоза для больших деталей см. (Lang and Hoffmann 2011).

Термодинамическая модель предсказывает, что диссипация трансмембранного градиента K^+ в среде с высоким содержанием K^+ будет подавлять DVD-опосредуемую клеточную смерть (Рис. 7). В самом деле, Cidlowski с коллегами наблюдал, что увеличение $[\text{K}^+]_o$ от 5 до 100 мМ замедляло смерть Jurkat клеткок, обработанных Fas-L (Bortner et al. 1997; Gomez-Angelats et al. 2000). Умеренное ингибирование каспазы 3 средой с высоким содержанием $[\text{K}^+]_o$ было также описано для тимоцитов, подвергшихся обработке дексаметазоном, тапсигаргином и стауропоорином (Hughes et al. 1997), VSMC, подвергнувшихся действию протонофора FCCP (Krick et al. 2001) и нейрональных клеток под действием амилоида (Colom et al. 1998). Добавление 200 мМ KCl полностью блокировало смерть HeLa клеток, запускаемую гиперосмотической средой (400 мМ sorbitol) (Smith et al. 1988). Следует, однако, отметить, что похожая защита наблюдалась также при эквимолярной замене KCl на NaCl. Эти данные предполагают, что как минимум в нескольких типов клеток, антиапоптотическое действие среды с высоким содержанием K^+ опосредовано увеличением ионной силы, а не ингибированием DVD, опосредованного утечкой K^+ . Следует также отметить, что независимо от подавления потери K^+ и DVD, прирост $[\text{K}^+]_o$ значительно влияет на электрический потенциал плазматической мембраны и активность потенциал-чувствительных мембраносвязанных белков. Имея это ввиду, в нашей лаборатории были исследованы клетки

E1A-VSMC, претерпевающие быстрый апоптоз в отсутствии ростовых факторов. В этих экспериментах не было обнаружено защиты E1A-VSMC клеток от апоптоза при увеличении $[K^+]_o$ от 5 до 126 мМ (Orlov et al. 2004a).

Эффект модуляторов ион-транспортирующих систем. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано, что в ходе развития смерти клеток изменяется активность ион-транспортирующих систем, принимающих участие в регуляции объема клеток. Этот список включает потенциал зависимые K^+ каналы ($K_v1.3$, $K_v1.1$, K_v4), Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы, K_{ATP} , не селективные катионные каналы, потенциал-регулируемые анионные каналы и потенциал-зависимые анионные каналы (для обзоров, см. (Lang and Hoffmann 2011; Hoffmann 2011; Prevarskaya et al. 2007)). Эти данные и термодинамические модели, рассмотренные нами ранее (Рис. 7), предсказывают, что модуляторы ионного транспорта будут воздействовать на DVD-зависимую клеточную смерть. Действительно, Maeno с коллегами показали, что в клеточных линиях HeLa, U937, PC12 и NG108-15 не селективные ингибиторы анионных каналов (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB), phloretin) и K^+ канал (5 мМ Ba^{2+}) полностью блокировали DVD, запускаемый 2-мя различными индукторами апоптоза, и увеличивали выживаемость клеток (Maeno et al. 2000). Трансфекция мутационно-инактивированных анионных каналов, вовлеченных в патогенез муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane regulator anion channels) подавляла смерть эпителиальных клеток, подвергнутых воздействию этопозида (Gottlieb and Dosanjih 2001), в то время как нарушение потенциал-зависимых хлорных каналов CIC-3 уменьшило апоптоз в миокарде мышей подверженных ишемической реперфузии (Bozeat et al. 2011). Wei с коллегами сообщили, что DIDS и NPPB ингибировали DVD но не влияли на активацию каспазы-3 и

фрагментацию ДНК в обработанных стауроспорином кортикальных нейронах (Wei et al. 2012). Ингибитор IK_{Ca} клотримазол блокировал DVD и смерть клеток глиобластомы, подверженных действию стауроспорина, но не клеток подверженных действию TRAIL, индуцирующего апоптоз через взаимодействие со специализированным рецептором (McFerrin et al. 2012). Очень слабое ингибирование или отсутствие каких-либо защищающих действий блокаторов K^+ каналов было описано в других исследованиях (Krick et al. 2001; Szabo et al. 1998; Gottlieb and Dosanjih 2001; Colom et al. 1998; Tremblay et al. 2001; Hu and Heikka 2000; Beauvais et al. 1995; Ernest et al. 2008; Krumschnabel et al. 2007).

Следует отметить, что у блокаторов каналов, использовавшихся в выше цитируемых работах, есть различные побочные эффекты. Так, например, блокатор K^+ каналов Ba^{2+} подавлял активность $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта (Orlov et al. 1996b), флоретин значительно уменьшал количество внутриклеточного АТФ (Skriabin et al. 2000), в то время как блокатор объём-чувствительных анионных каналов, 4-(2-Butyl-6,7-dichloro-2cyclopentyl-inden-1-on-5-yl) кетомасляная кислота, потенциально ингибировала коннексиновые гемиканалы и транспортёр глутамата GLT-1 (Bowens et al. 2013). Используя карибдотоксин, более селективный ингибитор IK_{Ca} и Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы высокой проводимости (BK_{Ca}), Elliot и Higgins показали изменение DVD и апоптоза в тимоцитах, происходящего при добавлении Ca^{2+} ионофора (Elliott and Higgins 2003). Напротив, ни карибдотоксин, ни апамин, ингибитор Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов малой проводимости (SK_{Ca}), не оказали воздействия на апоптоз в Jurkat клетках, подверженных действию Fas-L (Nobel et al. 2000).

2.2.2.5. Является ли набухание достаточным стимулом для смерти клеток?

Несколько исследовательских групп, предположили, что смерть клеток, определяемая морфологами как некроз, происходит из-за разрыва плазматической мембраны, вызванного набуханием клетки (Barros et al. 2001; Carini et al. 1999; Okada et al. 2001). Данные, подтверждающие эту гипотезу были большей частью получены на гепатоцитах, подвергнутых энергетическому голоданию. Было показано, что набухание и смерть АТФ-истощённых гепатоцитов уменьшалась в безнатриевой среде и увеличивалась, когда выход K^+ ингибировался $BaCl_2$ (Carini et al. 1995; Carini et al. 1999; Piper and Large 2003). Та же исследовательская группа показала, что объём набухания гепатоцитов при энергетическом голодании частично компенсировался за счёт RVD (Barros et al. 2001; Carini et al. 1999). Это наблюдение представляется нам маловероятным так как ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы происходит и диссипация электрохимического K^+ градиента, а потому резко уменьшает эффективность RVD.

Действие гипотонической среды на выживаемость клеток было изучено для того, чтобы проверить хемиосмотическую модель некроза. Malek с коллегами показали, что уменьшение осмоляльности среды в 2 раза только незначительно уменьшает выживаемость эндотелиальных клеток, изолированных из аорты быка (Malek et al. 1998). Снижение осмоляльности среды от 290 до 150 мОсм также не влияло на жизнеспособность гепатоцитов, (Carini et al. 1999). Более того было обнаружено, что умеренное набухание при 200 мОсм способствовало улучшению жизнеспособности гепатоцитов в условиях гипоксии, что связывалось с выбросом АТФ и активацией P2Y рецепторов (Carini et al. 2006).

Groulx с коллегами использовал DISUR для оценки площади поверхности и объёма одиночных, прикрепленных к субстрату A549, 16HBE14o-, CHO и NIH 3T3 клеток, подвергавшихся значительному (6 мОсм) гипотоническому стрессу (Groulx et al. 2006). Это исследование показало, что у всех клеточных линий имеются большие мембранные запасы, которые позволяют увеличивать площадь поверхности и объём клеток в 4- и 10-раз, соответственно, в основном за счёт изменения формы клеток, а также дополнительного внутриклеточного мембранного резерва. Большие мембранные резервы препятствуют разрыву плазматической мембраны в ответ умеренное увеличение объёма клеток, отмеченного как DVI. Действительно, даже после пермеабилзации плазматической мембраны и полного разрушения Гиббс-Доннановского равновесия, объём всех ядерных клеток, изученных на данный момент, увеличился менее чем в 2 раза (Fels et al. 2009). Это значение примерно в 5 раз меньше, чем порог приращения клеточного объёма, который приводит к разрыву плазматической мембраны в ядерных клетках (Groulx et al. 2006). Мы продолжили исследование этого вопроса, используя технику DISUR в клетки, подвергнутые долгосрочному ингибированию Na^+, K^+ -АТФазы (см. раздел 4.1)

2.3. Методы, используемые для измерения объема клеток: преимущества и недостатки

На данный момент существуют 2 группы методик измерения клеточного объёма. С помощью первой группы определяется относительное изменение клеточного объёма, с помощью второй группы методов измеряются абсолютные величины клеточного объёма.

Одним из основных способов анализа измерения относительного объёма клеток, является метод гашения флуоресценции зондов. При

высоких концентрациях, флуоресценция некоторые флуорофоров (например кальцеин-АМ) резко уменьшается (т.н. эффект внутреннего фильтра), что может быть использовано для анализа изменений объёма клетки. В культуре пигментных эпителиальных клетках сетчатки, флуоресценция кальцеина и внеклеточная осмолярность были линейно связаны. Сравнимые результаты были достигнуты при возбуждении ВСЕСФ (2',7'-би-(2-карбокситил)-5-(и-6)-карбокситилфлуоресцеин) в его изобестической точке (430 нм) (Hamann et al. 2002a).

Вторая группа подходов исследования клеточного объёма позволяет измерять абсолютный объём клеток. Объём не прикрепленных к подложке клеток может быть оценен с помощью обычного светового микроскопа, если допустить что они принимают сферическую форму. Также, для этого широко используются полное электрическое сопротивление (импеданс). С помощью этого оборудования (т.н. Coulter Counter) можно быстро оценить объём большого количества суспендированных клеток (Nakahari et al. 1990). В проточном цитометре используется метод измерения светорассеяния (**Рис. 9**). В этой системе плавающие клетки проходят через сужающуюся камеру под давлением. Окружающий этот центральный поток канал содержит раствор, который из-за геометрии камеры находится под более низким давлением, но движется быстрее чем центральный образец. Этот окружающий поток создаёт тянущий эффект. Это вытягивание приводит к тому, что клетки в центральном канале выстраиваются в цепочку перед выходом, такой эффект называется гидродинамическим фокусированием. Как только клетки выстраиваются в ряд, окружной поток и образец параллельно выходят из цитометра. В точке, где образец гидродинамически сфокусирован и находится в ламинарном потоке один или несколько световых ресурсов направлены на поток для регистрации сигнала. Световым ресурсом зачастую является лазер или дуговая лампа. В то время как клетка проходит через пучок

света, он рассеивается во всех направлениях. Регистратор ловит свет, который рассеян до 20° градусов от излучаемого пучка света, что находится в соответствии с размером клетки (Mullaney and Dean 1970).

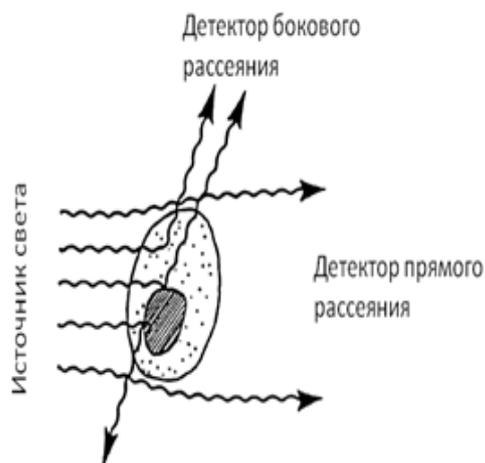


Рис. 9. Схема метода светорассеяния в проточном цитометре для определения клеточного объема. Объяснения в тексте

Другой метод, предложенный J.Gregg с коллегами заключается в том, что локальная толщина клетки выражается через интенсивность изображения (**Рис. 10**). Покровное стекло с выращенными на нём клетками помещаются в очень не глубокую камеру, которая по своей глубине чуть больше высоты клеток. Среда, в которой находятся клетки, содержит яркий краситель не проникаемый для мембраны blue 9 (AB9). Изображение получается при максимальном поглощении красителем (630 нм). Проходя через камеру, свет поглощается соответственно с путем, пройденным через краситель. В тех областях, где клетки толще, а слой красителя тоньше, конечная картинка получается светлее (Gregg et al. 2010). Важным аспектом является то, что красители должны быть не токсичными по отношению к клеткам и не выцветать в ходе длительного эксперимента. Ещё один метод, для измерения объёма предложил William Grover с соавторами (**Рис. 11**) (Grover et al. 2011). Для измерения массы, объёма и плотности клеток измеряют силу Архимеда, действующую на клетки в 2-х различных по плотности растворах, но одинаковых по тоничности.

$$m_b = m \left(1 - \frac{\rho_2}{\rho} \right),$$

где m – это масса клетки, ρ_f – это плотность более густой жидкости, ρ – плотность менее густой жидкости. В данном случае используется микропотоковая система для измерения плотности одиночной клетки. В качестве «весов» для взвешивания клеток в 2-х различных жидкостях используется погружной микроканальный резонатор (ПМР), изготовленный микротехнологическими методами микроструйный сенсор массы. Как показано на рисунке 9 ПМР состоит из силиконового кантилевера с вырезанным микроканалом. Кантилевер осциллирует пропорционально своей массе и клетка, проходящая через канал изменяет резонансную частоту кантилевера пропорционально подъёмной массе клетки. Для измерения плотности одиночной клетки с помощью ПМР, его сначала заполняли двумя жидкостями: первая содержала интересующие клетки в буфере или среде (красная), другая с такой же тоничностью как и первая, но более плотная (синяя). Плотность красного раствора определялась по резонансной частоте кантилевера, пока он был наполнен красной жидкостью (шаг 1). Подъёмная сила клетки в красной жидкости считалась далее по высоте пика резонансной частоты, в то время как клетка проходила через кантилевер (шаг 2). Далее клетка попадала в синий раствор, где более быстрый поток быстро сменяет красную жидкость на синюю вокруг клетки. Замена жидкости вокруг клетки проходит очень быстро, примерно за 1 сек. Направление движения затем меняется на противоположное, голубая жидкость наполняет кантилевер (шаг 3). Далее клетка проходит через кантилевер во второй раз, для того, чтобы измерить её подъёмную силу в синей жидкости (шаг 4). С помощью этого метода можно измерять массу, объём и плотность примерно 500 клеток в час с точностью до 0.01г/мл. Ими было замечено, что различия между здоровыми клетками в плотности примерно в 100 раз меньше их вариаций

в объёме и массе. Таким образом, этим методом можно измерять изменения в клеточной плотности, которые было невозможно зарегистрировать с помощью измерения массы и объёма.

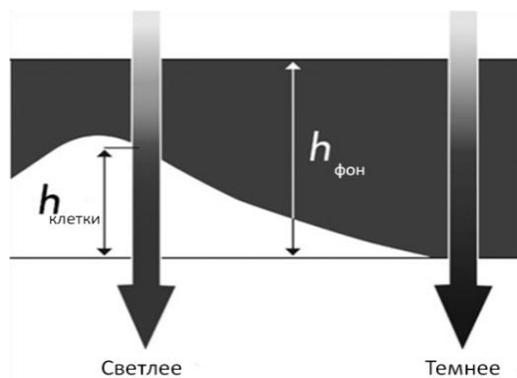


Рис. 10 Метод определения клеточного объёма с помощью локальной интенсивности изображения

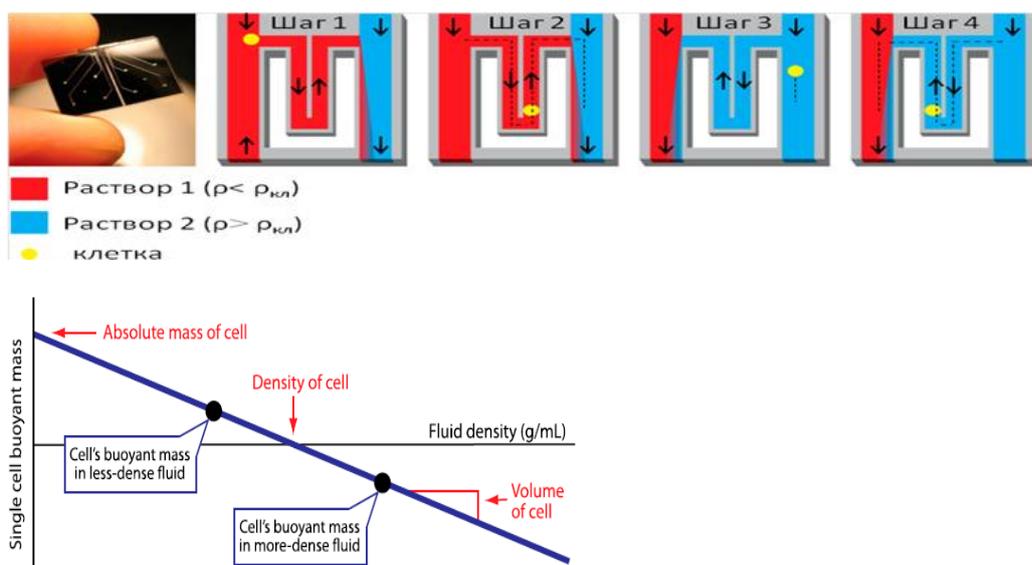


Рис. 11. Принцип вычисления объёма клетки с помощью измерения силы Архимеда. Для пояснений см. текст.

Корчев с коллегами предложили метод сканирующей ион проводящей микроскопии (СИПМ) (Рис. 12) определения объёма живых клеток, который позволяет характеризовать количественно и с высоким разрешением динамические изменения клеточного объёма на функционирующих клетках (Korchev et al. 2000). Чувствительным зондом для СИПМ является стеклянная микропипетка, наполненная электролитом,

которая подключена к высокому сопротивлению, усилителю тока и смонтирована на 3D подвижной управляемой компьютером платформе. Контролирующая электроника отслеживает движение платформы для сканирования образца под стеклянным зондом. Положение зонда, по отношению к поверхности клетки, сильно действует на поток ионов через пипетку - поток ионов уменьшается при приближении клетки к кончику зонда. Поток ионов даёт сигнал в цепи с обратной связью, которая контролирует вертикальное положение оси позиционной системы и обеспечивает не соприкосновение образца и зонда. Изображение клеток СИПМ включает в себя сканирование растра. СИПМ картинка состоит из трехмерной карты поверхности с ограниченным количеством точек, n , где каждая растровая точка представляет собой высоту клетки. До оценки клеточного объёма с помощью СИПМ, нужно измерить вертикальное положение (Z_{ref}) кончика зонда на субстрате, где были выращены клетки (**Рис. 12А**). Это позволит рассчитать настоящую высоту клетки $z(x,y)$ вычитая Z_{ref} из измеренного значения высоты ($Z_{(x,y)}$). Это особо важно, когда производится исследования кластера клеток и полученная картинка не содержит сравнительную точку субстрата. Предполагая, что базальная клеточная мембрана плотно прилегает к субстрату (например, стеклянному предметному стеклу, мембране) объём клетки (V_{cell}) может быть оценён с помощью формулы

$$V_{cell} = \sum_1^n z(x,y) \times dz \times dy, \quad (1)$$

где n – количество сканированных точек на клетку, $z(x,y)$ высота клетки в каждой точке растра, dx и dy инкременты скана (размеры пикселя) в направлении x и y . СИПМ имеет разрешение 10 нм по вертикали и 50 нм по горизонтальным направлениям. С помощью этой техники можно измерять широкий диапазон объёмов от 10^{-19} до 10^{-9} литров. Клеточный объём, также как и объём различных клеточных структур, таких как ламеллоподия, дендриты или микроворсинки может быть измерен с

точностью до $2.5 \cdot 10^{-20}$ л. Образец не требует предварительного приготовления перед измерением объёма. Значения $z(x,y)$ и V_{cell} могут быть оценены с ошибкой меньше чем 0,2% (Korchev et al. 2000).

Следует, однако, отметить, что все перечисленные выше методы имеют существенные ограничения. Так, светорассеяние, рефрактометрия и техника Coulter Counter применима только к клеткам, находящимся в суспензии и сравнительно простой (как правило, сферической) формы. Применение этих методов для клеток более сложной формы затруднено в связи с тем, что они не могут зачастую различить изменения объема и формы. Следует также отметить, что перевод прикрепленных к подложке клеток в суспензию путем трипсинизации существенно влияет на их объем и форму и может также провоцировать смерть клеток (т.н. anoikis) (Akimova et al. 2008). Измерение объема внутриклеточной воды с помощью проникающих через мембрану и не метаболизирующих в цитоплазме соединений, как например $[^{14}\text{C}]$ -мочевина и метил-D- $[^{14}\text{C}]$ -глюкоза, требует длительных времен инкубации для установления их стационарного распределения и интенсивной промывки клеток от меток, локализованных во внеклеточном пространстве. Более того, данные полученные этим методом могут быть искажены за счет изменения гидрофильности внутриклеточного содержимого при действии стимулов, приводящих к смерти клеток (Hortelano et al. 2001). Трехмерная реконструкция изображения клетки с помощью лазерной интерференционной или голографической микроскопии (Poulsen et al. 2010) не может быть использована для регистрации объемных изменений так как рефрактерный индекс цитоплазмы зависит от объема клетки (Yusipovich et al. 2011). Техника измерения тушения флуоресценции красителей предполагает их равномерное распределение в цитоплазме (Solenov et al. 2004). Конфокальная и атомно-силовая микроскопия требует сравнительно длительных времен инкубации (2-3 мин), в течение которых

могут развиваться нежелательные фотодинамические эффекты (Kunz and Stark 1997).

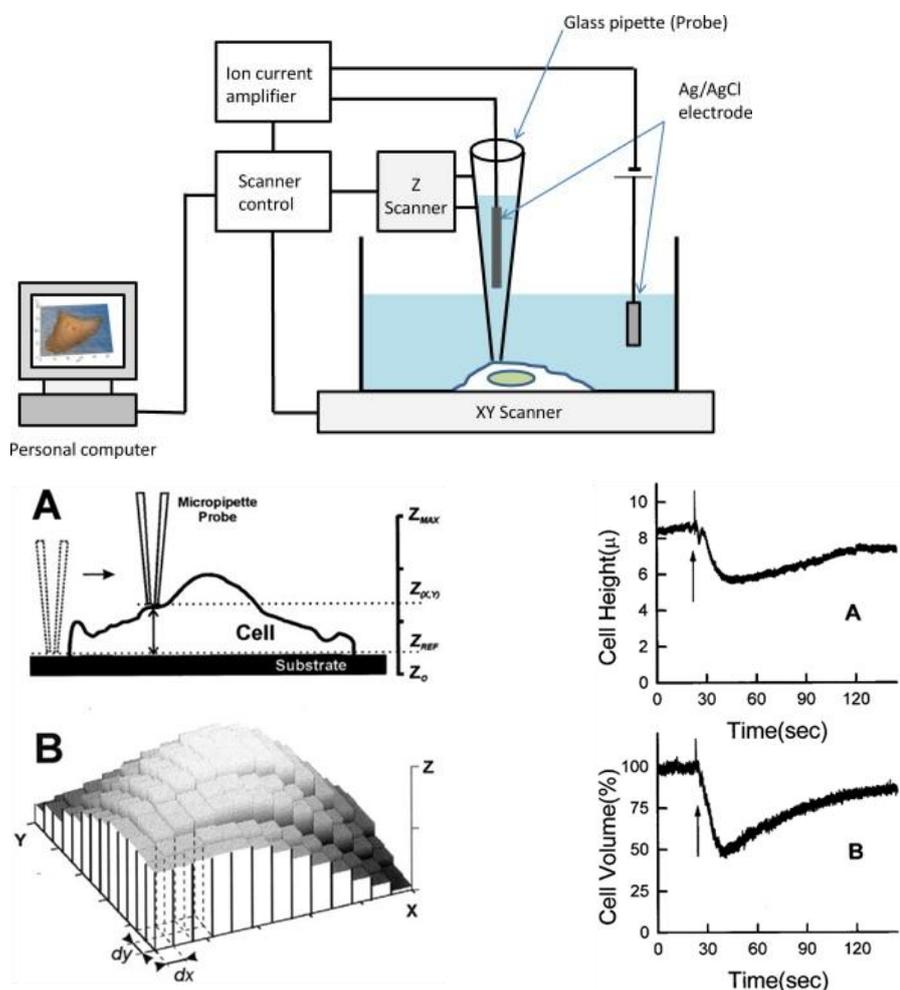


Рис. 12. Принцип работы сканирующей ион проводящей микроскопии

Учитывая эти ограничения, Boudreault и Grygorczyk разработали метод dual surface reconstruction technique (DISUR), основанный на фазовоконтрастной микроскопии в двух направлениях (Boudreault and Grygorczyk 2004). Этот метод, позволяющий одновременно измерять высоту, площадь поверхности и объем одиночных клеток, прикрепленных к подложке, с временным разрешением ~ 100 ms, рассмотрен нами в Разделе 3.3.

3. Материалы и методы

3.1. Гладкомышечные клетки

Измерение ионных потоков в полосках сосудов затруднено ввиду большого и труднопромываемого внеклеточного пространства, а также существенной гетерогенности клеток. В этой связи мы использовали культуру ГМК WKY-7, которые были получены из аорты крыс линии Wistar-Kyoto (WKY) и подвергнуты фенотипическому и биохимическому скринингу в посевах низкой плотности (Davis et al. 2003). Эта клеточная линия обладает выраженным сократительным фенотипом, который характеризуется экспрессией специфичных для гладких мышц белков: α -актина, белка SM22, киназы легких цепей миозина, а так же высокой чувствительностью к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренной по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеин киназы Erk1/2 (Davis et al. 2003). Клетки WKY-7 растили в модифицированной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 2 мМ глутамина, 10% бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Среда менялась каждые два дня. Клетки, достигшие 80% конфлюэнтности, использовали в дальнейших экспериментах. Для синхронизации культуры и прекращения пролиферативной активности, перед экспериментами клетки инкубировали в течение 48 часов в присутствии 0.2% телячьей сыворотки.

3.2. Клетки C11-MDCK

C11-MDCK - эта клеточная линия субклонирована из MDCK клеток с помощью метода посева клеток после их многократного разведения (low density seeding strategy). Полученные в результате этого подхода C11-MDCK клетки поддерживают рН_i на уровне 7.16, обладают высокой

проводимостью для Cl^- и H^+ и обладают низким трансэпителиальным электрическим сопротивлением при их посеве на проницаемые подложки. По этим свойствам, а также по содержанию белков-маркеров они напоминают интеркалированные клетки собирательных трубочек, основной задачей которых является регуляция кислотно-щелочного равновесия (Gekle et al. 1994). C11-MDCK клетки выращивали среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), в которую были добавлены 10% эмбриональная телячья сыворотка, 2 мМ глутамин, 100 U/мл пенициллин, и 100 мкг/мл стрептомицин, и использовались при посадках от 60 до 80 (Akimova et al. 2006a).

3.3. Измерения клеточного объёма

Для трехмерной реконструкции топографии клеточной поверхности, в лаборатории др. Григорчик был разработан метод, основанный на 2-х изображениях клетки, взятых в 2-х перпендикулярных плоскостях (**Рис. 13**). Этот метод получил название метода реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (Double Image Surface Reconstruction Technique, DISUR) (Boudreault and Grygorczyk 2004). Конечным результатом процедуры DISUR является пачка изображений, похожая на пачку изображений, получаемых при конфокальной микроскопии. Наружный контур клеточной основы, наблюдаемый близко от поверхности прикрепления к стеклу, служит шаблоном для генерирования пачки клеточных срезов. По мере того, как мы продвигаемся от основания клетки к её верхушке, наружный контур неуклонно сжимается, в пропорции, задаваемой профилем клетки, видимым сбоку. Клеточный объём, поверхность и высота были посчитаны из таких реконструированных клеточных моделей. Все подсчёты были реализованы с помощью excel (Microsoft, Redmond, WA).

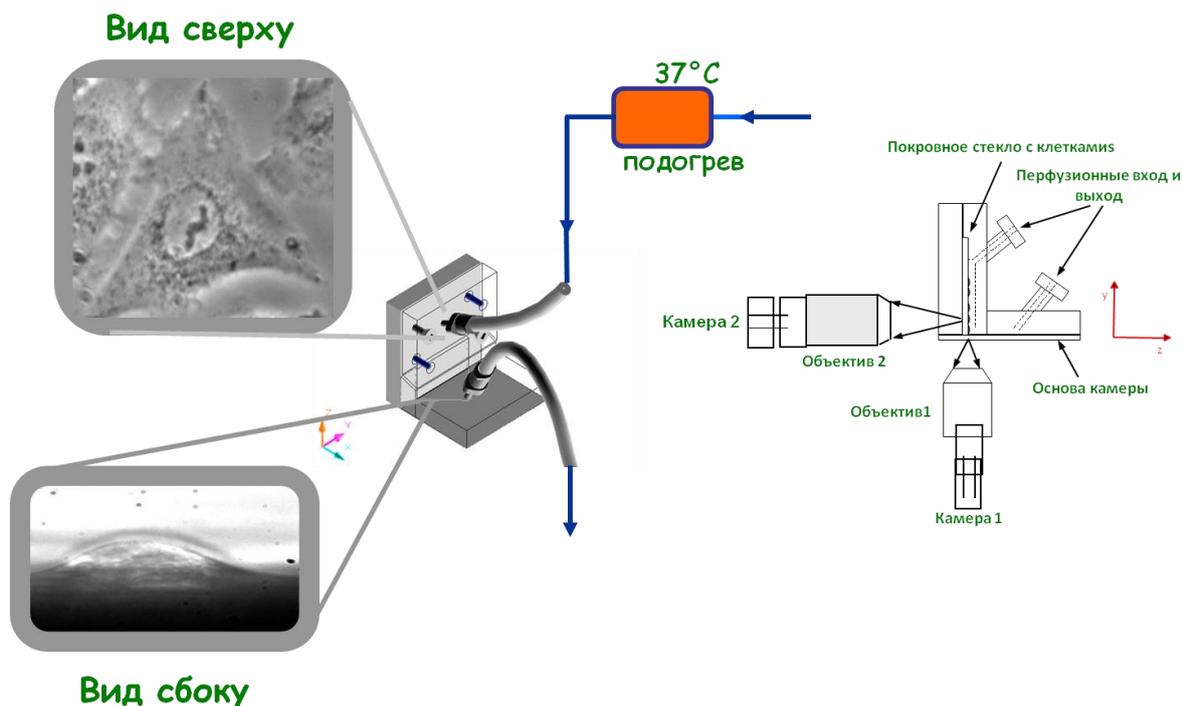


Рис. 13. Блок-схема установки, используемой для измерения объема клеток с помощью метода DISUR.

Для визуализации реконструированной клеточной модели в 3D, данные, полученные с помощью методики DISUR или с помощью CLSM, были использованы для генерации матрицы 2D, содержащей примерные z-координаты точек поверхности клеточной мембраны. 3D перспектива клеточной модели затем строится с помощью ORIGIN (Microcal Software, Northampton, MA). Мы предположили (*предположение 1*), что из-за того, что объём ядра в ядерных клетках велик, их вершина будет находиться над геометрическим центром ядра, форма, похожая на жареное яйцо в виде глазуньи. Как было подтверждено конфокальной микроскопией, полная 3D форма клетки может быть реконструирована, до достаточной точности, с помощью только 2-х изображений, на одном из которых будет изображена клетка сбоку с фокусировкой на вершине, на другой должен быть изображен наружный контур клеточной основы, изображение должно быть сфокусировано около поверхности покровного стекла. Поверхности, соответствующие данным изображениям, являются

взаимноперпендикулярными и пересекаются между собой по линии LL' (Рис.14 А). Мы предположили (предположение 2) что линия LL' проходит через точку nc' (проекция центра ядра nc) и пересекает базу клеточного профиля в точках А и С.

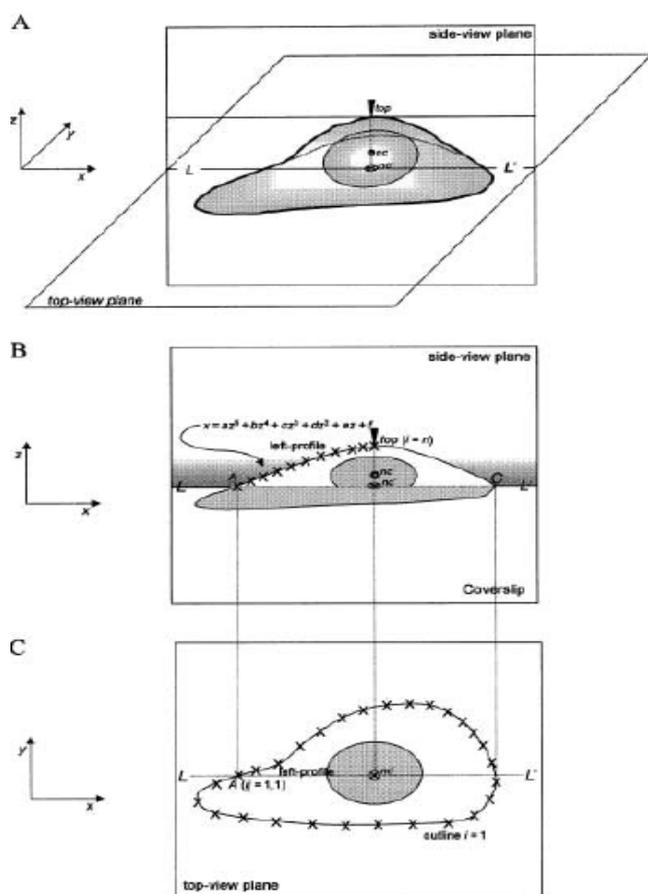


Рис. 14. Принцип реконструкции трехмерного изображения клетки с помощью метода DISUR. Расшифровка обозначений приведена в тексте.

При выборе клеток для анализа и реконструкции, мы не брали клетки, которые были слишком близки к краю покровного стекла, так как в большом количестве случаев они были повреждены в процессе установки покровного стекла в микроскоп. Это также могло быть следствием интенсивных капиллярных сил на краю стекла. Однако, при фокусировке на клетках, далеких от края покровного стекла, мы не могли чётко различить поверхность субстрата (что соответствует LL') вследствие

частиц, находящихся вне фокуса, но всё равно смазывающих изображение. Всё же, точное нахождение можно было зафиксировать с помощью изображения сверху. В этом изображении, положение линии LL' легко находится, так как она должна быть горизонтальна и пересекать точку nc' (**Рис. 14 С**). Линия LL' также пересекается с контуром клетки в точках А и С. Положение на оси-х любой из этих точек, является достаточным для локализации LL' на виде поверхности сбоку. Здесь, мы выбрали точку левее nc' (подписанную как А).

Вертикальная ось, проходящая через центр ядра (nc -ось, **Рис. 14 В**) делит профиль клетки на 2 половины. Обычно мы наблюдали, что каждая половинка профиля может быть превращена в другую половинку с удовлетворительной точностью с помощью симметричного отображения на 180° и изменяя размер соответственно с изменением расположения края клетки от этой оси. Таким образом, для того, чтобы избежать ненужной информации, мы оцифровывали только левый профиль клетки. Точки, показывающие контур полупрофиля бокового вида клетки (между линией LL' и клеточной вершиной) были выбраны в ручную с помощью программного обеспечения MetaView (Universal Imaging, West Chester, PA) как описано на **Рис. 14В** и их координаты были занесены в excel. Оцифрованный полупрофиль далее сглаживался с помощью полинома 5-ой степени (методом наименьших квадратов). Это уравнение было в дальнейшем использовано для генерации набора из n равноудалённых точек вдоль оси z , в среднем 20-25, в зависимости от требуемого разрешения. Эти точки, в дальнейшем, генерировали пачку клеточных срезов.

После оцифровки клеточных профилей и внешнего контура основы, происходит оцифровка всего набора $n-1$ клеточных срезов с контуром основы, принятым за шаблон. Целью было генерировать срезы, которые бы совпадали с поперечными сечениями плазматической мембраны клетки

вдоль оси z . Изначальные координаты каждого из слоёв были заданы точками из полупрофиля (см. оцифровка клеточного профиля); $m-1$ точка были соответственно экстраполированы от этой изначальной точки для того, чтобы закончить один срез. Для наглядного представления всей процедуры, мы изображаем, на **Рис. 15**, вычисление первой экстраполированной точки B' в срезе $(i+1)$. Её положение определяется в соответствии с методом, основанном на паре параллельных векторов. На **Рис 15 (А)** (верх) есть вектор $A \rightarrow A'$, обозначенный двумя соседними точками в контуре, которые служат ссылкой для вектора $B \rightarrow B'$, лежащего в следующей поверхности сверху (**Рис 15А**, низ). Начальная точка вектора $B \rightarrow B'$ известна; координаты точки B рассчитываются из левого профиля клетки, но его величина и направление не известны и требуют два дополнительных предположения для решения этого вопроса. Мы постулируем (предположение 3) что, с макроскопической точки зрения, клеточная поверхность является непрерывной, гладкая, или, скажем иначе, там нет изгиба. В таком случае векторы $A \rightarrow A'$ и $B \rightarrow B'$ параллельны друг другу. Также, предположено (предположение 4), что вектор $B \rightarrow B'$ ($v(i+1)_i$) пропорционален по модулю вектору $A \rightarrow A'$ (v_{ij}) в соответствии с его расстоянием от оси nc (Рис.). Это расстояние D измеряется между концами векторов (точка A и B) и осью nc (см также Рис., низ). Каждый из векторов соответствует стороне косоугольного треугольника. У одного треугольника вершинами являются точки B , B' и nc' и он вписан в другой треугольник A , A' и nc' . В этой ситуации, отношение амплитуд вектора v_{ij} к $v(i+1)_j$ пропорционально отношению длины стороны треугольника D_{ij} к $D(i+1)_j$ как определено Уравнением. (1).

$$\frac{|v_{ij}|}{|v_{(i+1)j}|} = D_{ij}/D_{(i+1)j} \quad (1)$$

С того момента как размер $v_{(i+1)j}$ или $B \rightarrow B'$ посчитан, положение B' легко находится. Описанный здесь процесс повторяется шаг за шагом до того момента как новый слой, состоящий из m точек завершён.

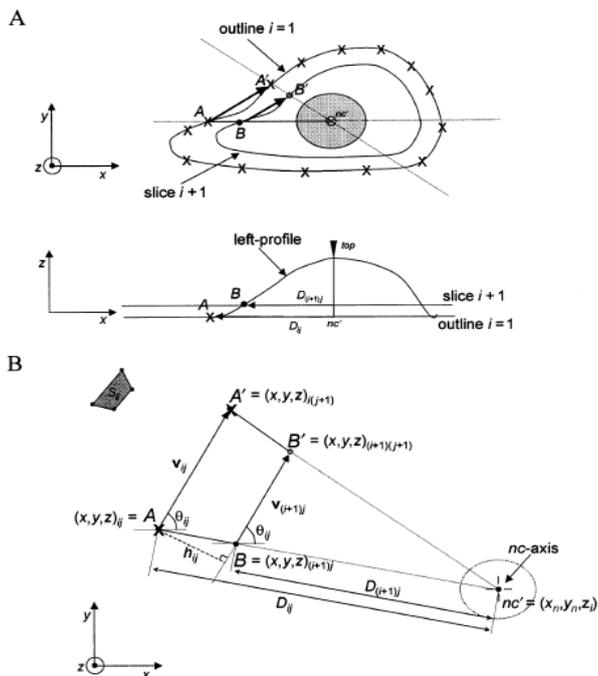


Рис. 15. Принцип оцифровки клеточных профилей и внешнего контура основы с помощью метода DISUR. Расшифровка обозначений приведена в тексте.

Для определения параметров клетки из 3D модели использовали следующие подходы.

Высота. Высота клетки соответствует z -координате клеточной верхушки, определённой по фотографиям бокового вида

Объём. Клеточный объём аппроксимируется суммой $n-1$ элементарных значений V_i , как описано в Рис. 16А. Каждый элементарный объём V_i является аппроксимацией пространства, находящегося между двумя прилегающими плоскостями и ограниченного клеточной поверхностью. Оно генерируется (образуется) путём экстрюзии цилиндра Δz высоты из поверхности усреднения двух площадей поперечного сечения int_i и int_{i+1} . Уравнение (2) служит для оценки

клеточного поперечного сечения int_i . Объём всей клетки рассчитываемый с помощью уравнения (4) соответствует суммированию всех индивидуальных V_i элементов, как определено Уравнением (3).

$$int_i = \sum_{j=1}^m \frac{(x_{i(j+1)} - x_{ji})(y_{ij} + y_{i(j+1)})}{2} \quad (2)$$

$$V_i = \frac{\Delta z(int_i + int_{i+1})}{2} \quad (3)$$

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} V_i \quad (4)$$

Площадь поверхности. Техника, основанная на трапеции, была более не применима для оценки полной поверхности клетки из CLSM-полученных изображений из-за отсутствия порядка во вручную оцифрованных изображениях. Немного менее точный, но всё ещё надёжный приём был использован для клеток с аксиальной симметрией. На **Рис. 16В** ассиметричные поперечные сечения (int_i и int_{i+1}) превращены в 2 круга с соответствующей поверхностью с радиусами r_i и r_{i+1} , соответственно, которые высчитываются из уравнения (7). Симметричная фигура, которая получается в результате такого преобразования, является усечённым конусом. Боковая поверхность (SFC_i) этой фигуры (уравнение 8) представляет собой сумму поверхностей срезов. Сумма $n-1$ боковых поверхностей SFC_i , при высоте Δz плюс поверхность прикрепления к покровному стеклу int_i , соответствует клеточной поверхности, как описано Уравнением (9). Этот метод был также использован для оценки клеточной поверхности клеток, реконструированных с помощью DISUR только в проверочных экспериментах.

$$r_i = \left(\frac{int_i}{\pi} \right)^{1/2} \quad (7)$$

$$SFC_i = \pi(r_i + r_{i+1})((r_i - r_{i+1})^2 + \Delta z^2)^{1/2} \quad (8)$$

$$S_{approx} = int_1 + \sum_{i=1}^{n-1} SFC_i \quad (9)$$

Используя этот подход, были впервые определены размеры резерва плазматической мембраны при набухании клеток (Groulx et al. 2006), роль цитоплазматического гидрогеля в осмо- и рН-чувствительности клеток (Fels et al. 2009). В данной работе мы использовали этот метод для исследований изменений объема при активации пуриnergических рецепторов и при действии факторов, приводящих к смерти клеток. В наших работах клеточный объем измерялся у прикрепленных к субстрату клеток с помощью улучшенной версии метода реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (DISUR), как описано в деталях выше (Fels et al. 2009; Groulx et al. 2006). Клетки были слегка трипсинизированы, посажены с низкой плотностью на покровное стекло и они восстанавливались в среде, содержащей сыворотку в течение 12-24 часов. Покровные стекла затем устанавливались в 2-х мл. проточную камеру, перфузируемую со скоростью 1.3 мл/мин изотонической средой А, забуференную HEPES при 37°C. Состав среды А был следующим (в мМ): 135 NaCl, 3.8 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.3 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 10 D-глюкоза, 10 HEPES (pH=7.4, отрегулированный NaOH). В некоторых экспериментах, осмолярность среды была понижена до ≤30% уменьшая [NaCl] до 85 мМ, или увеличена на ~50% добавлением до 150 мМ маннитола. В без-Ca²⁺-среде, CaCl₂ был пропущен и добавлен 0.2 мМ EGTA. Клеточные изображения сбоку и сверху записываются каждые 100 мс с помощью 0.40NA и 0.25NA объективов, 2 независимых, миниатюрных камер (Moticam 350, Motic Instruments Inc., Richmond, BC, Canada) и Motic программным обеспечением при 0.14 μм/пиксель и 0.18 μм/пиксель разрешении для вида сбоку и сверху, соответственно. Эти

изображения нужны для генерации набора топографических кривых клеточной поверхности из оцифрованного профиля вида клетки сбоку и контура основы. Клеточный объём и поверхность рассчитывались из реконструированной модели клеточной топографии. Все вычисления производились с помощью MATLAB (Math Works, Inc., Natick, MA).

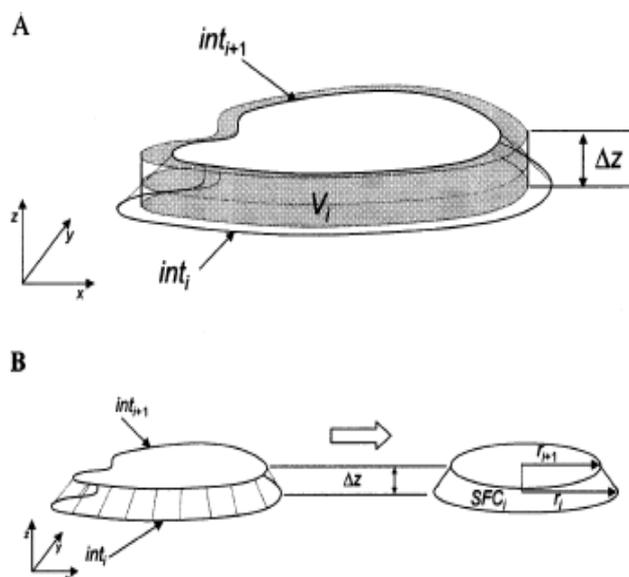


Рис. 16. Принцип расчета объема (А) и поверхности клетки (В) с помощью метода DISUR. Расшифровка обозначений приведена в тексте.

3.4. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Эти эксперименты проводились в соответствии с ранее описанным методом (Taurin et al. 2002a). Кратко, C11-MDCK клетки, выращенные на стеклянных покровных стёклах, инкубировались в течение 30-40 мин в среде А, включающую в себя 5-10 мкМ fura 2-AM. Далее, клетки отмывались, вставлялись в диагональную позицию custom-made 1x1-см кюветы, перфузировались со скоростью 1.3 мл/мин, и флуоресценция измерялась при постоянном перемешивании при 37°C ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ и 380 нм, slit 4 nm; $\lambda_{\text{em}} = 510$ нм, slit 12 nm), в спектрофлуорометре SPEX FluoroMax (Edison, NJ). Свободный $[\text{Ca}^{2+}]_i$ был посчитан как $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(R -$

$R_{min})/(R_{max} - R)$, где K_d это константа диссоциации Ca^{2+} -fura 2 комплекса (224 нМ при 37°C), и $R = F_{340}/F_{380}$ отношения флуоресценции при $\lambda_{ex} = 340$ и 380 нм. Для того чтобы определить F_{max} , клетки подвергались воздействию 0.5 мкМ иономицина в присутствии 1 мМ CaCl_2 . Для определения F_{min} , MnCl_2 добавлялся, до окончательной концентрации 2 мМ.

3.5. Внутриклеточный состав моновалентных ионов

C11-MDCK клетки высевались на 12-ти луночные плашки и выращивались до конfluence в DMEM, содержащей сыворотку, как описано выше. Клетки промывались физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS), инкубировались 2 ч в 2 мл среды А, включающей 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$ ^{86}Rb , 2-3 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$ ^{22}Na или 1-2 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$ ^{36}Cl . В ряде случаев клетки инкубировали до 1 часа в присутствии 100 μM АТФ и ингибиторов ион-транспортирующих систем. Для того чтобы избежать быстрой деградации АТФ ecto-АТРазами в этих экспериментах, а также в опытах по изучению экспрессии c-Fos, проведенных в отсутствие проточной камеры, добавляли ингибитор этого фермента 100 μM ARL 67156. В предыдущих исследованиях было установлено, что это соединение снижает скорость деградации АТФ C11-MDCK клетками в 8-10 раз (Akimova et al. 2006a). Клетки переносили на лед, промывали 4 раза 4 мл холодной среды, содержащей 100 mM MgCl_2 и 10 mM HEPES-tris (pH 7.4), после чего их лизировали 1 ml раствора, содержащего 1% SDS и 4 mM EDTA. Радиоактивность клеточного лизата измеряли на жидкостном сцинтилляционном анализаторе и содержание внутриклеточного обмениваемого K^+ , Na^+ и Cl^- рассчитывали как $V=A/am$, где A – радиоактивность образца (срм), a – специфическая радиоактивность ^{86}Rb

(K⁺), ³⁶Cl и ²²Na (срм/nmol) в среде инкубации и *m* – содержание белка в образце (mg).

3.6. Тест на образование фрагментов хроматина

В этом исследовании использовалась ранее описанная методика (Orlov et al. 1996a) с незначительными изменениями, описанными ниже. Клетки, выращивались в Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) в 24-луночных плашках, с содержанием сыворотки и 0.1 мкКю/мл [³H]-тимидина. После 24 часов, они промывались 2x2 мл DMEM и инкубировались 48 часов в DMEM с сывороткой и соединениями, указанными на рисунках и таблицах. Далее, среда собиралась и центрифугировалась при 900 об/мин в течение 10 мин, после чего собирался супернатант, а клетки в осадке и оставшиеся на подложке лизировались добавлением раствора, содержащего 10 mM EDTA, 10 mM трис-HCl и 0.5% тритон X100 (pH 8.0). Далее, клеточные лизаты соединялись, осаждались 12,000 об/мин., 10 мин и супернатант переносился для измерения радиоактивности (фракция F_1). Оставшаяся радиоактивность из плашек и лунок экстрагировалась с помощью раствора, содержащего 1% SDS и 4 mM EDTA (фракция F_2). Относительный состав внутриклеточных хроматиновых фрагментов рассчитывался как процент от общего [³H]-меченного ДНК: $F_1/(F_1+F_2) \times 100\%$.

3.7. Активность каспазы-3

Клетки, выращенные на 6-ти луночных плашках, переносились на лёд, соскабливались с подложки, осаждались при 5,000 об/мин в течение 10 мин при 4°C и промывались дважды 3 ml ледяным PBS. Далее, осадок смешивался с 150 µл среды, содержащей 0.32 M сахарозы, 5 mM EDTA, 10

мМ трис-НСl (рН 8.0), 1% тритона X100, 2 мМ дитиотреитола, 1 мМ PMSF, 10 $\mu\text{г/мл}$ пепстатина А и 10 $\mu\text{г/мл}$ апротина. Образцы центрифугировались (14,000 об/мин, 10 мин, 4°C), и 100 $\mu\text{л}$ супернатанта замораживались жидким азотом и хранились при -80°C. Для измерения активности фермента, 20- $\mu\text{л}$ образцы переносились в 400 $\mu\text{л}$ буфера, содержащего 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 50 мМ трис-НСl (рН 7.0), 0.1% CHAPS, 1 мМ дитиотриэтола, 40 $\mu\text{М}$ DEVD-АМС (N-ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-7-амино-4-метилкумарин) с или без 2 $\mu\text{М}$ ингибитора каспазы-3 Ас-DEVD-СНО. После 2-3 часов инкубации при 37°C реакция останавливалась добавлением 1 мл 0.5 М глицин-NaOH буфера (рН 10.0). Образцы разводились водой, и флуоресценция измерялась с помощью SPEX FluoroMax спектрофлуориметра при $\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 465$ нм (щели 4 and 20 nm, соответственно). Сигнал флуоресценции калибровался АМС в диапазоне концентрации от 0.01 до 0.3 $\mu\text{М}$. Активность каспазы-3 рассчитывалась как разница активности DEVDазы в отсутствии и в присутствии Ас-DEVD-СНО. Для больших подробностей см. (Orlov et al. 1999b).

3.8. Выброс цитохрома С

Экстракты цельных клеток отмывались охлажденным на льду PBS и обрабатывались буфером, используемым для выделения митохондрий (Pierce, Rockford, IL). Лизаты смешивались с буфером, включающим в себя 10 мМ KCl, 250 мМ сахарозы, 2 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 1 мМ дитиотреитола и коктейль ингибиторов протеаз, указанный в разделе 3.7. Митохондрии седиментировались и супернатант, содержащий 30-40 мг белка был разделен с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии 6-12.5% градиента концентраций додецилсульфата натрия. Белки переносились на поливинильную мембрану и блокировались 5%

сухим молоком. Мембраны инкубировались всю ночь с антителами против цитохрома с (Cell Signalling, Hornsby, ON) и обрабатывались вторичными антителами в соответствии с инструкцией изготовителя (Cell Signalling, Hornsby, ON).

3.9. Высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH)

Для измерения активности LDH, 0.5 мл инкубационной среды смешивалось с таким же объёмом 1% тритона X100, и прикреплённые клетки откреплялись с помощью 0.5% тритона X-100. Далее, 300 μ л образцов переносились в 2 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7.4), 50 мМ KCl, 0.075 мМ NADH (восстановленный β -никотинамид-аденин динуклеотид) и 1 мМ пирувата натрия. Кинетика деградации NADH отслеживалась с помощью SPEX FluoroMax спектрофлуориметра при $\lambda_{ex} = 349$ нм и $\lambda_{em} = 420$ нм (slits 4 и 20 нм, соответственно). Высвобождение LDH рассчитывалось как процент от общей активности фермента.

3.10. Определение количества клеток, прикрепленных к подложке

Для определения количества клеток, прикреплённых к подложке, клетки выращивались в 24-х луночных плашках в присутствии или отсутствии уабаина, промывались 4 раза PBS, и количества белка в клетках, прикреплённых к подложке, измерялось с помощью модифицированного метода Лоури (см. раздел 3.11).

3.11. Измерение содержания белка модифицированным методом Лоури

В большинстве случаев, содержания белка определяли с помощью модифицированного метода Лоури (Hartee 1972). Для этого в четыре лунки каждой плашки добавляли по 1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора А (10% Na_2CO_3 , 0,5 М NaOH , 0,2% нитрат натрия). Далее клетки соскребали и клеточный лизат переносили в пробирки и инкубировали в течение 10 минут при 50°C. Затем добавляли 0,1 мл раствора Б, содержащий 1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2% нитрат натрия и 1 М NaOH , и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации добавляли 3 мл 0,125 N раствора Фолина-Чокальтеу, инкубировали 10 минут при 50°C и измеряли оптическую плотность проб с помощью спектрофотометра при длине волны 595 нм (Ultrospec 3100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, UK). Для построения калибровочного графика использовали маточный раствор сывороточного альбумина быка (БСА) с концентрацией 1 мг/мл.

3.12. Измерение содержания белка методом Бредфорда

Учитывая то, что клеточный лизат, предназначенный для проведения электрофореза, содержит додецилсульфат натрия (SDS), несовместимый с методом Лоури, концентрацию белка в этом случае определяли по методу Бредфорда с использованием готового реактива компании Bio-Rad (изготовитель). Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре при длине волны 595 нм. Для построения калибровочного графика использовали маточный раствор БСА с концентрацией 0,1 мг/мл.

3.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Разделение белков в образцах тканевого лизата БА проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли в присутствии 10% SDS. Для проведения электрофореза использовали 4%-ный концентрирующий гель и 10% разделяющий гель. Белковые пробы перед нанесением на гель инкубировали в течение 10 минут при 95°C в буфере для образцов. Электрофорез проводили при напряжении 70V в концентрирующем геле, а в разделяющем геле напряжение составляло 140V.

3.14. Вестерн-блот

Разделение белков проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану ("Mini Trans-Blot", Bio-Rad) в буфере для переноса (25 mM трис - 192 mM глицин (pH 8,3), 20% метанол) в течение 1,5 часов при токе 400 mA. Для проверки качества переноса белков мембрану окрашивали красителем Ponceau (0,02%), а затем краситель удаляли промыванием мембраны раствором PBS и проводили блокировку 0.5%-ым обезжиренным молоком, приготовленным на растворе 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) при комнатной температуре в течение часа при постоянном перемешивании, после чего образцы инкубировали с первичными поликлональными антителами (0,12 мкг антител на 1 мл раствора PBS-Tween, содержащего 0.5%-ое обезжиренное молоко) в течение ночи при 4°C на качалке. После трехкратного промывания по 15 минут раствором Tween-PBS к нитроцеллюлозной мембране добавляли вторичные антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (титр 1:5000) и инкубировали 1 час при комнатной температуре при перемешивании. Нитроцеллюлозу промывали 3 раза раствором Tween-PBS в течение 15

мин, после чего белки визуализировали с помощью набора хемилюминесценции (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) и экспонировали на фотобумагу (Kodak) с последующим проявлением (Kodak X-Omat 2000A).

Реактивы

Буметанид, АТФ, УТР, форсколин, карибдотоксин, паксиллин, клотримазол, 6,N,N'-диэтил-β,γ-дибромометилден-Д-аденозин-5-трифосфат (ARL 67156), сурамин, 2'-деокси-N⁶-метиладенозин-3',5'-дифосфат (MRS2179), ибериотоксин были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); ВАРТА-АМ, fura 2-АМ, иономицин, 4β-форбол 12-миристат 13-ацетат (4β-РМА), 4α-форбол-12,13-дидеканоат (4α-PDD) и 5-нитро-2-(3-фенилпропиламинобензойная кислота (NPPB) – EMD-Calbiochem (La Jolla, CA); N,N''-1,4-бутанедиил-bis[N'-(3-изотиоцианафенил)]тио мочевины (MRS2578) – Tocris Chemicals, Ellisville, MO. D-глюкоза, соли и буферы были получены от Sigma-Aldrich или Anachemia (Montreal, PQ). Метил-[³H]-тимидин, ⁸⁶RbCl, H³⁶Cl и ²²NaCl были произведены CN Biomedicals, Inc. (Irvine, CA). Поликлональные антитела на c-Fos были получены от Santa Cruz Biotechnology. DEVD-АМС, DEVD-СНО и z-VAD.fmk – BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). Остальные реагенты были получены от Gibco-BRL (Gaithersburg, MO), Calbiochem (La Jolla, CA), Sigma (St. Louis, MO) и Anachemia (Montreal, QC).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2003. При проведении сравнительного анализа подсчитывали среднее арифметическое (M) и значения стандартной ошибки (m). Для оценки

достоверности различий между группами применяли параметрический t-критерий Стьюдента. Результаты считались достоверными при значении доверительной вероятности (риск ошибки, p) менее 0.05.

4. Результаты

4.1. Изменения клеточного объёма, вызванные ингибированием Na^+, K^+ -АТФазы и смерть C11-MDCK клеток

Na^+, K^+ -АТФаза- это гетеродимер, состоящий из каталитических α - и регуляторных β -субъединиц, играет ключевую роль в поддержании электрохимического градиента моновалентных катионов во всех изученных на данный момент ядерных клетках животного происхождения. Многочисленные исследования показали, что убаин и другие кардиотонические стероиды (CTS) резко понижают трансмембранные градиенты Na^+ и K^+ через ингибирование каталитических $\alpha 1$ - $\alpha 4$ изоформ. В свою очередь, диссипация ионных градиентов приводит к изменению различных Na^+, K^+ -зависимых клеточных функций, такие как электрический мембранный потенциал, клеточный объём, трансэпителиальное движение солей и осмотически связанной воды, симпорт Na^+ с глюкозой, аминокислотами, нуклеотидами, и т.д. (Scheiner-Bobis 2002).

В отличие от универсального воздействия на описанные выше клеточные функции, длительная инкубация с CTS влияет на выживаемость клеток тканеспецифичным образом. Так, например, CTS не влиял на жизнеспособность эпителиальных клеток почек обезьяны (Contreras et al. 1995; Contreras et al. 1999; Contreras et al. 1999; Contreras et al. 1999; Contreras et al. 1999), лимфоцитов человека (Falciola et al. 1994), гладкомышечных клеток сосудов крыс (VSMC) (Orlov et al. 1999c; Orlov et al. 2001; Orlov et al. 2001; Orlov et al. 2001; Orlov et al. 2001), крысиных астроцитов (Akimova et al. 2006b) и Jurkat клеток (Panayiotidis et al. 2010), но приводил к массовой гибели MDCK клеток (Ledbetter et al. 1986; Bolivar et al. 1987; Bolivar et al.

1987;Bolivar et al. 1987) и эндотелиальных клеток, изолированных из аорты свиньи (Orlov et al. 2004b).

Смерть эпителиальных и эндотелиальных клеток, вызванная добавкой CTS, несёт в себе комбинированные признаки канонического некроза (умеренное клеточное набухание, незначительная маркировка ДНК в присутствии терминальной трансферазы, окраска ядра не проникающими через мембрану красителями, таких как пропидиум иодид) и апоптоза (ядерная конденсация в клетках, окрашенных с помощью красок, проходящих в клетку, таких как Hoechst 33342, расщепление хроматина, активация каспазы-3). Однако, в отличие от классического апоптоза, смерть MDCK клеток, обработанных убаином, не чувствительна к ингибитору пан-каспазы z-VAD.fmk (Contreras et al. 1999;Pchejetski et al. 2003;Orlov et al. 2004b;Pchejetski et al. 2003;Orlov et al. 2004b).

В соответствии с хемиосмотической моделью (Armstrong 2003), клеточное набухание, происходящее из-за диссипации Гиббс-Доннановского равновесия, может быть достаточным для разрыва плазматической мембраны (Okada et al. 2001;Carini et al. 1999). Для изучения этой гипотезы, мы использовали методику DISUR для сравнения кинетик клеточного объёма при действии убаина и гипотонического шока на CTS-чувствительных C11-MDCK клетки и CTS-устойчивые VSMC.

4.1.1 Действия убаина и безкальевой среды на внутриклеточный состав катионов и жизнеспособность клеток

Ранее было установлено, что добавление 3 μM убаина полностью блокирует Na^+, K^+ -АТФазу в C11-MDCK клетках (Akimova et al. 2005a; Akimova et al. 2005a). В **таблице 4** показано, что 5-час инкубация C11-MDCK клетках с 3 μM убаином приводит к ~13-кратному увеличению Na^+_i и 9-ти кратному уменьшению K^+_i . Твердо установлено, что средство

универсальной изоформы $\alpha 1\text{-Na}^+, \text{K}^+\text{-АТФазы}$ к CTS у крысы, мышцы и некоторых других грызунов в ~ 1000 раз меньше, чем у других млекопитающих (Lingrel et al. 2007). Учитывая это обстоятельство, в экспериментах с VSMC крысы, мы увеличивали концентрацию убаина до $3,000 \mu\text{M}$. В этой концентрации убаин вызывал в VSMC ~ 14 -кратное увеличение Na^+_i и 11-кратное падение K^+_i (Таблица 4). Сравнение Таблицы 4 и Рисунка 17 показывает что в обоих типах клеток полная инверсия соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ происходит через 2 часа после добавления убаина. Как и следовало ожидать, ~ 10 -кратное увеличение $[\text{Na}^+]_i$ было также обнаружено через 5 часов инкубации клеток в безкальевой среде. В этом случае, добавление убаина увеличивало содержание $[\text{Na}^+]_i$ менее чем на 30% (Таблица 4).

Таблица 4. Действие убаина и безкальевой среды на внутриклеточное содержание Na^+_i и K^+_i в клетках эпителия почечных канальцев (C11-MDCK) и гладкой мускулатуры сосудов (VSMC)

Среда	C11-MDCK		VSMC	
	Na^+_i , нмоль на мг белка	K^+_i , нмоль на мг белка	Na^+_i , нмоль на мг белка	K^+_i , нмоль на мг белка
Контроль (вред А)	72 ± 13	834 ± 89	64 ± 21	896 ± 97
Среда А + убаин*	$933 \pm 103^\#$	$91 \pm 21^\#$	$895 \pm 120^\#$	$80 \pm 19^\#$
Без- K^+ среда	789 ± 89	ND	786 ± 99	ND
Без- K^+ среда + убаин*	$1,004 \pm 156$	ND	962 ± 78	ND

Содержание Na^+_i и K^+_i были измерены после 5-ти часовой инкубации клеток в контрольной или без- K^+ средах. *В экспериментах с C11-MDCK клетками и VSMC, убаин добавлялся в концентрациях 3 и $3,000 \mu\text{M}$, соответственно. Показаны средние значения $\pm \text{S.E.}$, которые получены в экспериментах, проведённых 4 раза. $^\#p < 0.001$ в сравнении с контролем. ND – значения не измерялись.

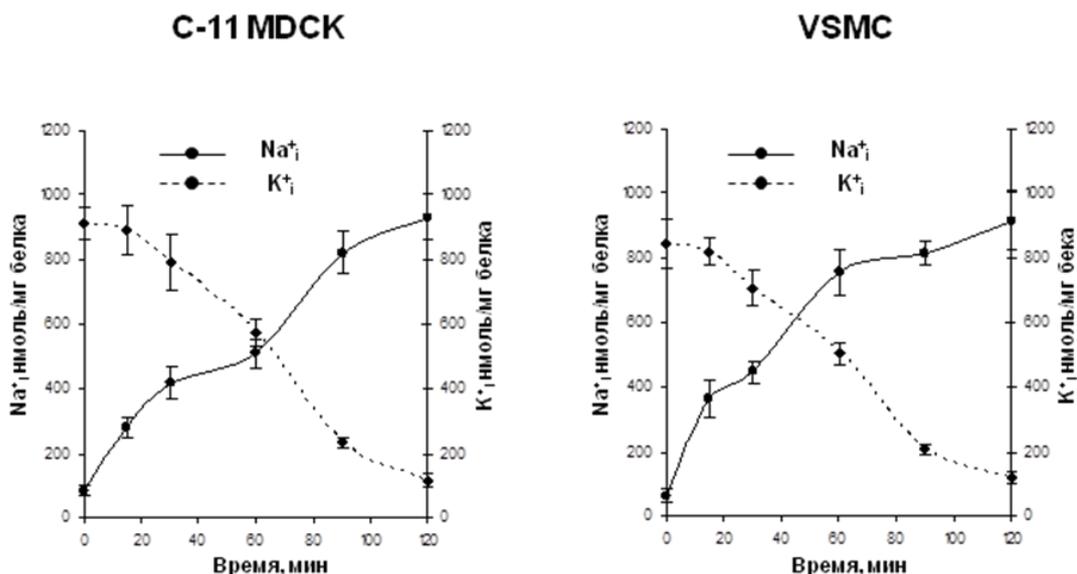


Рис. 17. Кинетики изменения внутриклеточного содержания Na^+ и K^+ в присутствии убаина в эпителиальных клетках почек (C11-MDCK) и гладкомышечных клетках сосудов (VSMC). В C11-MDCK клетки и VSMC, убаин был добавлен в концентрации 3 и 3,000 мМ, соответственно. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка.

В соответствии с ранее опубликованными данными (Pchejetski et al. 2003), мы обнаружили, что 24-час ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы с убаином приводила к накоплению плавающих округлых C11-MDCK клеток (Рис. 18) и появлению таких маркеров клеточной смерти, как фрагментация хроматина и высвобождение LDH (Таблица 5). В отличие от C11-MDCK клеток 24-час инкубация с убаином не влияла на морфологию и выживаемость VSMC. В отличие от убаина, ни выживаемость C11-MDCK, ни VSMC клеток изменялась при ингибировании Na^+, K^+ -АТФазы в безкальциевой среде. В безкальциевой среде убаин вызывал смерть C11-MDCK клеток, но не влиял на жизнеспособность (Рис. 18, Таблица 5).

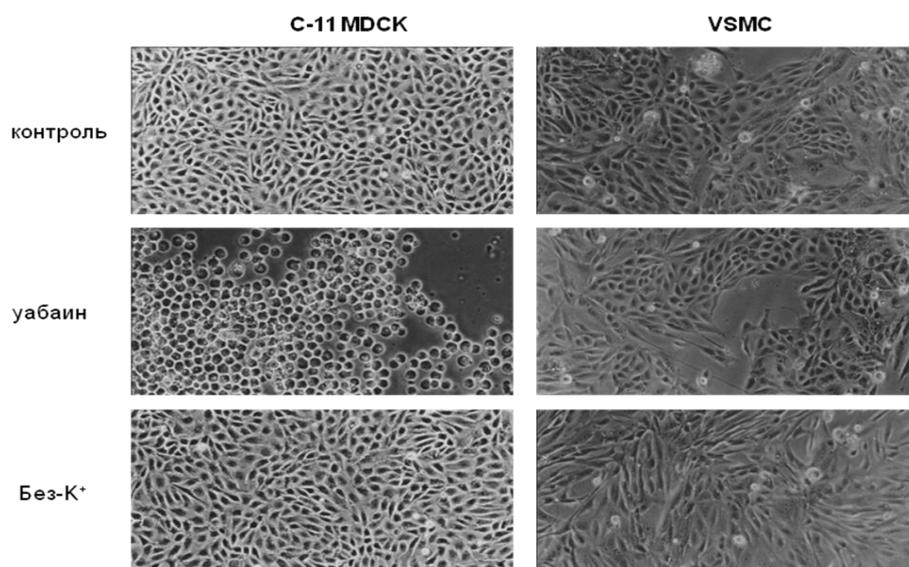


Рис. 18. Фазово-контрастная микроскопия эпителиальных клеток почек (C11-MDCK) и гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) подверженных 24 ч. Инкубации с уабаином и в безкальциевой среде (K⁺-free medium). Уабаин добавлялся в концентрациях 3 и 3,000 мМ к C11-MDCK клеткам и VSMC, соответственно.

Таблица 5. Действие уабаина и безкальциевой среды на отрыв от подложки, распад хроматина и высвобождение LDH из клеток эпителия почечных канальцев (C11-MDCK) и гладкой мускулатуры сосудов (VSMC)

Среда	C11-MDCK			VSMC		
	Оторвавшиеся клетки, %	Распад хроматина, %	Выброс с LDH, %	Оторвавшиеся клетки, %	Распад хроматина, %	Выброс LDH, %
1. Контроль (Среда А)	6±3	5±2	7±3	4±1	3±1	9±4
2. Среда А + уабаин*	78±9	27±4	89±7	5±3	3±2	6±2
3. без-K ⁺ среда	5±4	4±4	9±6	7±4	6±4	10±5
4. без-K ⁺ среда + уабаин*	88±11	33±6	93±5	3±2	5±3	7±4
P _{1,2}	<0.001	<0.01	<0.001	NS	NS	NS
P _{3,4}	<0.001	<0.02	<0.001	NS	NS	NS

Клеточное прикрепление, распад хроматина и выброс LDH измерялись после 24 ч. Инкубации клеток в контрольной или без- K⁺ среде ± уабаин. *В экспериментах с C11-MDCK клетками и VSMC, уабаин добавлялся в концентрациях 3 и 3,000 μМ, соответственно. Общее количество клеток, общее количество LDH и [³H]-тимидин-меченного DNA принималось за

100%. Показаны средние значения \pm SE, полученные в 4 экспериментах (прикрепление клеток) или в 3-х экспериментах (разрушение хроматина и выброс LDH). NS - недостоверно.

4.1.2 Воздействие убаина и безкальевой среды на объём клеток

Учитывая, что 2-х часовая инкубация с убаином приводит к полномасштабной потере K^+_i и накоплению Na^+_i (Рис. 18), мы измеряли изменения клеточного объёма после 3-х часового ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы. Таблица 6 показывает, что подавление Na^+, K^+ -АТФазной активности убаином и в среде, свободной от K^+ , увеличило объём C11-MDCK клеток на 20% и 13%, соответственно. Незначительное набухание было также замечено в подверженных действию убаина VSMC клетках. Добавление убаина к безкальевой среде увеличило объём C11-MDCK клеток на 25-30%; однако эта разница не была статистически значимой.

Таблица 6. Объём клеток эпителия почек (C11-MDCK) и гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) через 3 ч. Инкубации с убаином или в без- K^+ среде

Среда	Клеточный объём, %	
	C11-MDCK	VSMC
Контроль (среда А)	104 \pm 5 (n=4)	101 \pm 3 (n=4)
Среда А + убаин	120 \pm 6 (n=7)	113 \pm 7 (n=5)
Без- K^+ среда	113 \pm 3 (n=4)	ND
Без- K^+ среда + убаин	145 \pm 25 (n=4)	ND

*В экспериментах на C11-MDCK клетках и VSMC, убаин добавлялся в концентрациях 3 и 3,000 μ M, соответственно. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в независимых экспериментах. ND – значения не измерялись.

Ранее, мы видели, что смерть MDCK клеток при действии убаина может быть зарегистрирована по их отрыву от подложки через 5 часов с максимальным возрастанием расщепления хроматина и активацией каспазы-3 в течение 10-12 часов после добавления убаина (Pchejetski et al.

2003; Akimova et al. 2009; Akimova et al. 2009; Akimova et al. 2009). Имея это в виду, в дополнительных экспериментах, мы увеличили время экспериментов до 7 часов и измеряли клеточный объём за несколько минут до клеточной смерти. Мы заметили, что за 5-10 минут до отделения обработанных убаином C11-MDCK клеток от подложки их объём увеличивался на ~30-40% (Рис.19, Таблица 7). Эти данные согласуются с ~30% увеличением пространства, доступного для ^{14}C -мочевины, задокументированного в C7-MDCK клетках через 6 часов после добавления убаина (Pchejetski et al. 2003).

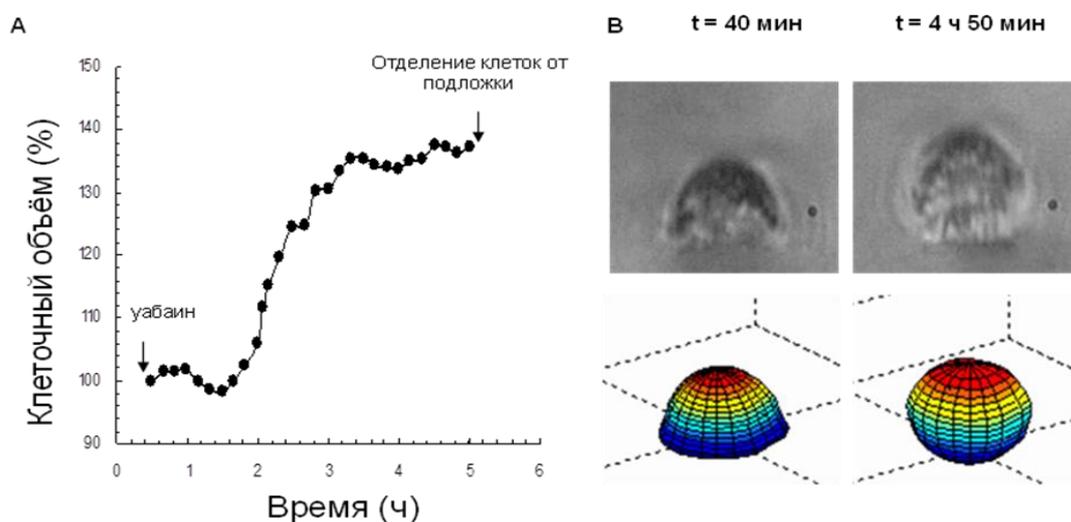


Рис. 19. А Репрезентативная кинетика изменения объёма 3 мМ убаином в C11-MDCK клетках. Времена добавления убаина и отрыва клеток показаны стрелками. В. *Верх*: Вид клетки сбоку через 40 мин и 4 ч. 50 мин. После добавления убаина. *Низ*: 3D модели, соответствующие этим же клеткам через 40 мин. и 4 ч. 50 мин. после добавления убаина, которые были сделаны с помощью метода DISUR

Таблица 7. Объём обработанных убаином C11-MDCK клеток за несколько минут до их открепления от подложки

	Клеточный объём (%)	Время измерения объёма (мин)	Время открепления клетки (мин)
<i>Эксперимент 1.</i>	141	260	265
<i>Эксперимент 2</i>	134	345	348
<i>Эксперимент. 3</i>	156	313	321
<i>Эксперимент. 4</i>	138	422	425
<i>Эксперимент. 5</i>	129	307	311
Средние \pm S.E.	140 \pm 9	329 \pm 54	334 \pm 53

Данные получены в 5 независимых экспериментах. Для больших деталей, см. Рис. 3.

4.1.3. Клеточный объём и освобождение LDH в гипотонической среде

Для того чтобы изучить является ли достаточным, умеренное набухание, зафиксированное при действии убаина в C11-MDCK клетках (Рис. 19, Таблицы 6 и 7), для разрыва плазматической мембраны, мы сравнили кинетику увеличения объёма и выброса LDH в клетках, находящихся под действием сильного гипотонического шока. **Рисунок 20** показывает, что увеличение в 2-3-раза объёма C11-MDCK клеток достигалось через ~2-3 минуты, в то время как максимальное возрастание (~5-раз) было задокументировано через ~10 минут после уменьшения осмолярности среды от ~310 до 15 мОсм. В параллельных экспериментах, мы измерили выброс LDH через 3- и 10-мин действия гипотонической среды на C11-MDCK. Мы обнаружили крайне малый и статистически недостоверный выброс LDH через 3 мин, что контрастировало с полномасштабным выбросом LDH через 10 мин после гипотонического шока (Таблица 8).

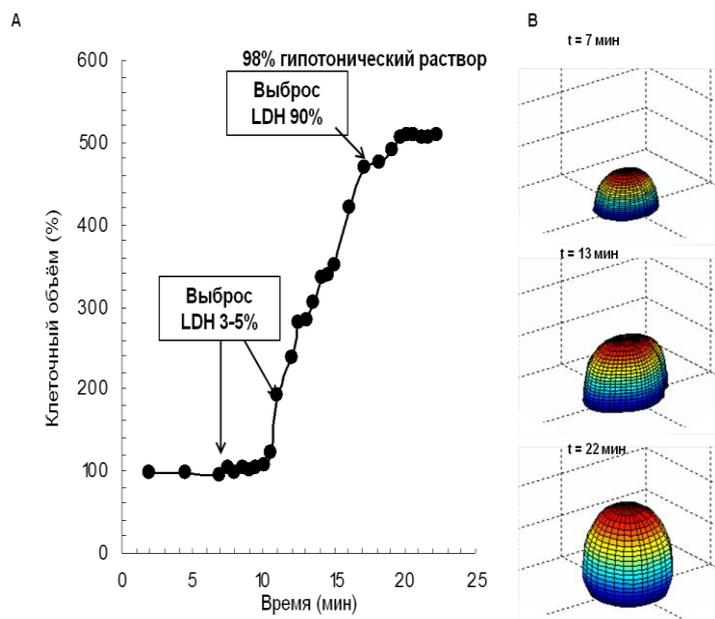


Рис. 20. А. Репрезентативные кинетики изменения клеточного объема в C11-MDCK клетках при действии гипотонической среды, содержащей 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ и 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4). **В.** 3D модели, соответствующие временные точки отмечены стрелками (~7, 13 и 22 мин), которые были получены с помощью метода DISUR.

Таблица 8. Клеточный объем и выброс LDH в C11-MDCK клетках, подвергшихся действию гипоосмотической среды

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

Гипоосмотическая среда содержала 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ и 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4). Изначальный клеточный объем и полное содержание LDH в клетках были приняты за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные из n независимых экспериментов. NS- различия статистически не достоверны.

4.1.4. Изменения клеточного объёма, вызванные пермеабиллизацией плазматической мембраны

Недавно в нашей лаборатории было установлено, что клетки млекопитающих с пермеабиллизированной плазматической мембраной ведут себя как осмометры, указывая на важный вклад цитоплазматического гидрогеля в феномен осмочувствительности (Fels et al. 2009). Используя динамическое молекулярное моделирование и измерения проводимости, Vrbka с коллегами показали, существенное различие в скорости связывания с белками Na^+ и K^+ (Vrbka et al. 2006). Для проверки влияния возможного изменения свойств гидрогеля цитоплазмы при вызванном убаином увеличении соотношения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ , мы использовали клетки, пермеабиллизированных по протоколу показанному на **рисунке 21**. Как и предполагалось, частичная диссипация Гиббс-Доннановского равновесия, происходящая из-за замены внеклеточного Na^+ на K^+ привела к набуханию C11-MDCK и VSMC клеток на 14% и 30%, соответственно (**Таблица 9**). В обоих типах клеток, набухание в дальнейшем увеличивалось при пермеабиллизации клеточной мембраны дигитонином. Эти данные согласуются с предыдущими результатами, полученными при изучении действия дигитонина на A549, 16HBE14o и HI-60 клетки (Fels et al. 2009). Мы не наблюдали какого-то сильного воздействия замены K^+ на Na^+ на объём пермеабиллизированных VSMC и C11-MDCK клеток (**Таблица 9**).

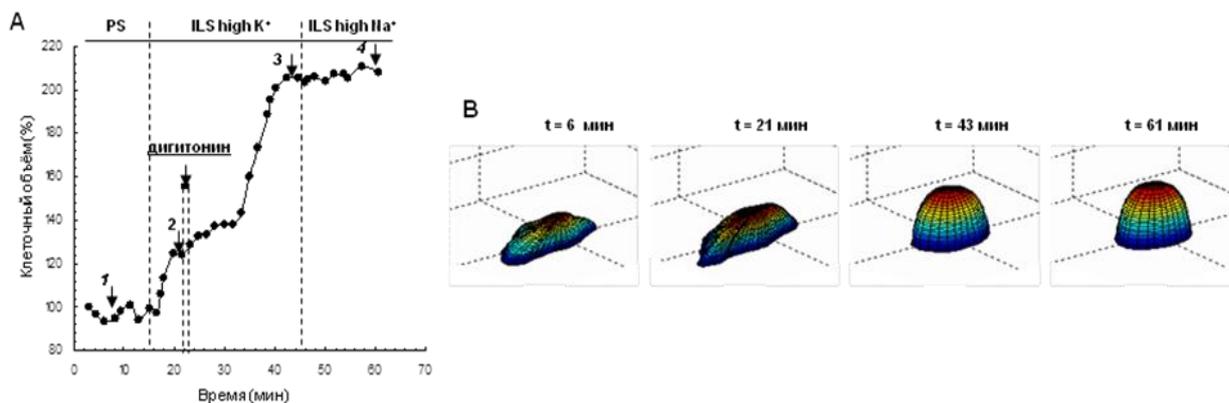


Рис. 21. А. Репрезентативная кинетика изменения объёма C11-MDCK клеток после пермеабилзации с дигитонином и инверсии $[Na^+]/[K^+]$ соотношения. ILS содержит 1,200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 11 mM дитиотреитол, 25 mM имидазол, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.1). 5 мг/мл дигитонина добавлялось на 5 мин. В high-Na ILS, KCl заменялся на эквимолярное количество NaCl. Номера у стрелочек (**1-4**) соответствуют моментам измерения клеточного объёма, показанным в таблице 6. **В.** Вид 3D моделей клетки, соответствующих временным точкам, указанным стрелками (~6, 21, 43 и 61 мин), которые были получены с помощью методики DISUR.

Таблица 9. Влияние инверсии внеклеточного соотношения $[Na^+]/[K^+]$ и пермеабиллизации на объём эпителиальных клеток почек (C11-MDCK) и клеток гладкой мускулатуры сосудов (VSMC)

Среда	Клеточный объём (%)	
	C11-MDCK (n=6)	VSMC (n=4)
1.Контроль (среда А)	97±6	103±9
2.Раствор, напоминающий внутриклеточный (ILS)	114±16	130±19
3.ILS + дигитонин	156±31	213±32
4. ILS с высоким содержанием Na	157±31	261±47
P _{1,3}	NS	<0.02
P _{3,4}	NS	NS

ILS содержит 120 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 11 мМ дитиотриэтол, 25 мМ имидазола, 10 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7.1). 5 мкг/мл дигитонина добавлялось на протяжении 5 мин. В ILS с высоким содержанием Na, KCl был заменён эквимолярным количеством NaCl. Номера, показанные *италиком* в левой колонке, соответствуют номерам стрелок на Рисунке 28, показывающим время измерения клеточного объёма. Изначальный клеточный объём был принят за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные из независимых экспериментов. NS - различия статистически не достоверны.

4.2. Изменение объема гладкомышечных клеток сосудов при действии индукторов апоптоза

4.2.1. Динамика апоптоза в E1A-VSMC: ингибирование убаином и форсколином

В соответствии с ранее опубликованными данными (Orlov et al. 1999c; Orlov et al. 1999b) через 4-5 ч часов после помещения E1A-VSMC клеткок в среду, лишенную ростовых факторов, приводило к 10-ти кратной активации активности каспазы-3 и 15-ти кратному увеличению накопления фрагментации хроматина, считающихся каноническими маркерами апоптоза (Рис. 22). Этот вывод был подтвержден с помощью фазовоконтрастной микроскопии, которая показала массивное накопление маленьких, плавающих апоптотических тел (Рис. 23), содержащих пикнотичные остатки ядер клеток (Рис. 24). Согласно с ранее опубликованными данными (Orlov et al. 1999c; Orlov et al. 1999b), микроскопические исследования показали, что как ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы убаином, так и активация аденилатциклазы форсколином резко подавляло апоптоз E1A-VSMC клеток, вызванный отсутствием ростовых факторов (Рис. 23 и 24). Этот вывод был подтвержден измерениями активности каспазы-3, накоплением фрагментов хроматина и выбросом цитохрома с из митохондрий (Рис. 25).

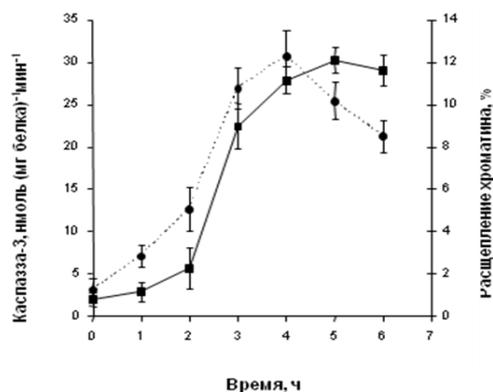


Рис. 22. Кинетика активации каспазы-3 (1) и расщепления хроматина (2) в E1A-VSMC, запускаемые сывороточным голоданием. В точке, взятой за 0, клетки были промыты PBS и был добавлен без сывороточный-DMEM. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в 3 (каспаза-3) и 4-х экспериментах (расщепление хроматина).

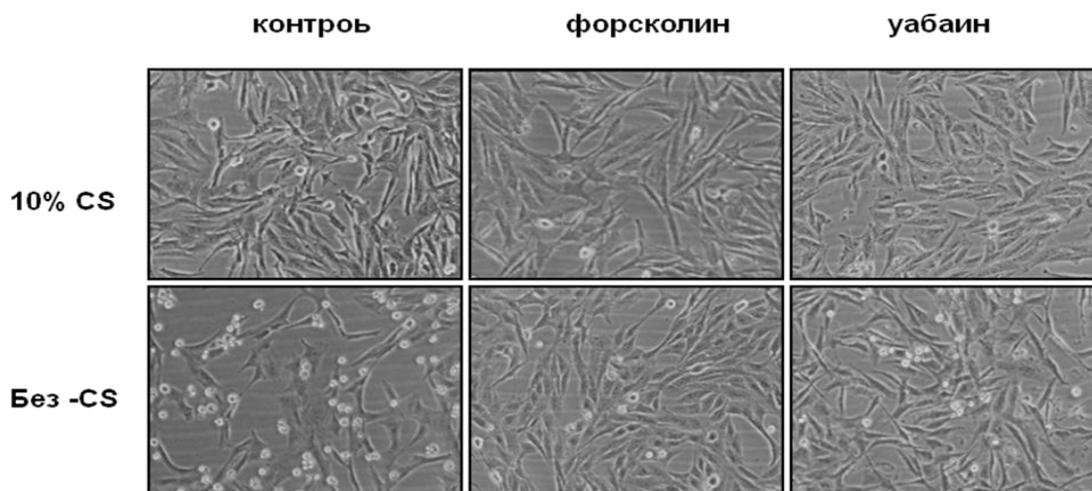


Рис. 23. Микрофотографии E1A-VSMC клеток, после 3-х часовой инкубации в присутствии 10% телячьей сыворотки (CS) или в без CS в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) с или без 1 мМ убаина и 10 мМ форсколина. Убаин добавляли за 2 часа до удаления сыворотки.

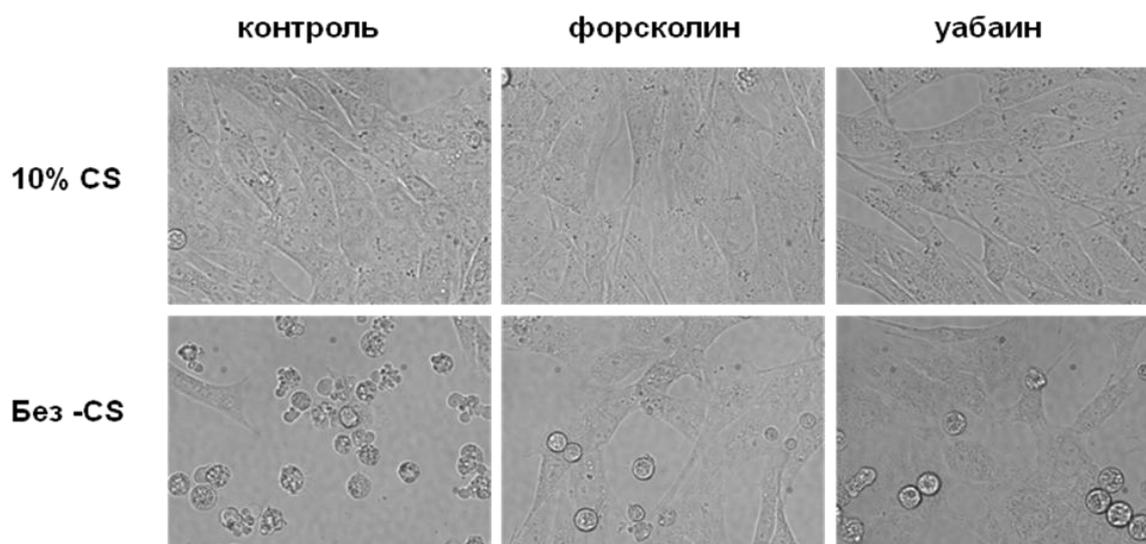


Рис. 24. Микрофотографии E1A-VSMC клеток, после 6-ти часовой инкубации в присутствии 10% телячьей сыворотки (CS) или в безсывороточной (CS-free) DMEM с или без 1 мМ убаина и 10 мМ форсколина. Убаин был добавлен за 2 часа до замены раствора на безсывороточный.

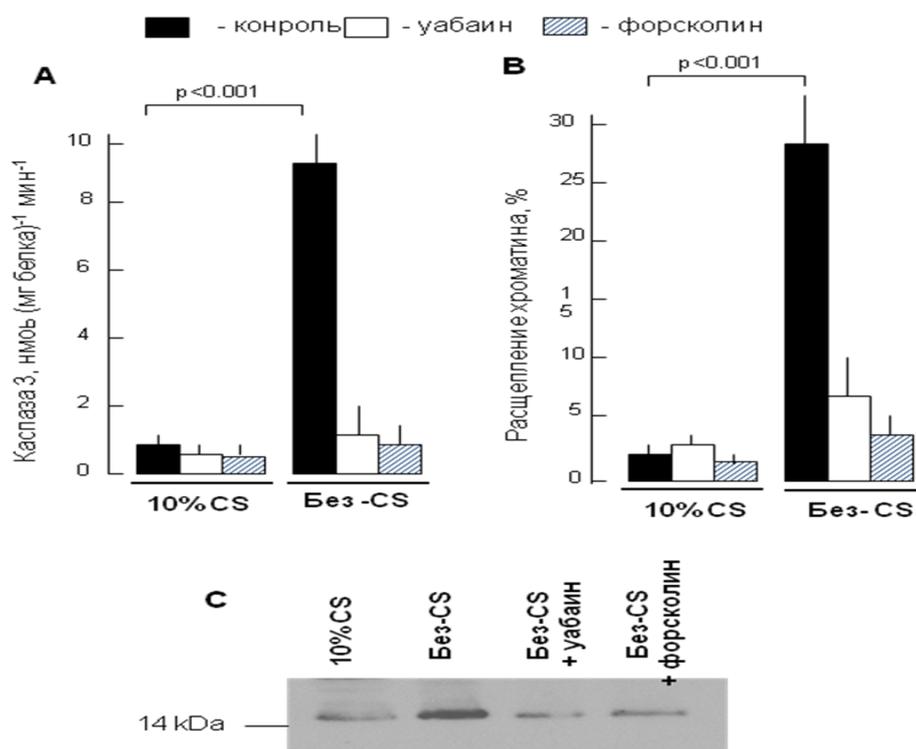


Рис. 25. Эффект сывороточного голодания, 1 мМ убаина и 10 мМ форсколина на активность каспазы-3 (А), расщепления хроматина (В) и выброса цитохрома с из митохондрий (С) у E1A-VSMC. Клетки промывались PBS и инкубировались 5 ч в присутствии 10% телячьей сыворотки (CS) или в безсывороточной среде. Убаин был добавлен за 2 часа до удаления сыворотки. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в экспериментах, проведенных в 3-х экземплярах (caspase-3) и 4-х экземплярах (расщепление хроматина).

4.2.2. Кинетика модуляций объёма в голодающих по сыворотке E1A-VSMC

Рисунок 26А показывает, что после 30-60-мин лаг-фазы объём E1A-VSMC клеток, лишенных ростовых факторов, увеличивался на ~30-50%. Процесс набухания клеток завершался быстрым апоптотическим коллапсом, регистрируемым по образованию пузырьков плазматической мембраны (т.н. blebbing) и заканчивающимся в течение 10-15 мин формированием множества апоптотических тел (**Рис. 26С**). Клеточное набухание предшествовало активации каспазы-3 и расщеплению

хроматина, которые можно было увидеть через 4-5 час после устранения ростовых факторов. После начала сывороточного голодания (Рис. 23). У E1A-VSMC клеток, которые были предварительно обработаны убаином или форсколином, устранение ростовых факторов не вызывало достоверного изменения объема (Рис. 26А, Таблица 10).

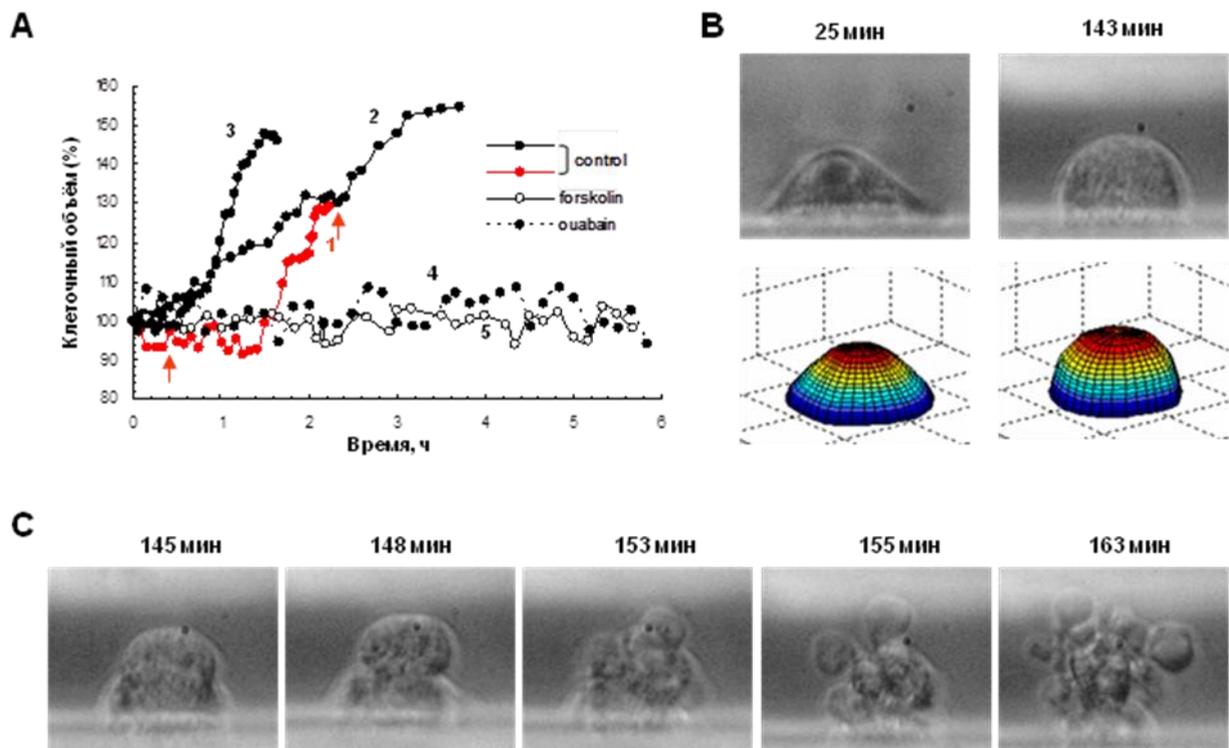


Рис. 26. Эффект сывороточного голодания, убаина и форсколина на объём E1A-VSMC. А. Репрезентативные кинетики изменения объёма, запускаемого сывороточным голоданием в отсутствии (1-3) и присутствии 1 мМ убаина (4) или 10 мМ форсколина (5). Убаин добавлялся за 2 часа до удаления сыворотки. В. *Верх*: Вид сбоку клетки, чья кинетика изменения объёма показана красным через 25 и 143 мин после удаления сыворотки и эти точки показаны на рис. А стрелочками. *Низ*: 3D модель, соответствующая виду той же клетки в те же точки времени, полученная с помощью методики DISUR. С. Изображения клетки сбоку, показывающие коллапс голодающей по сыворотке клетки, чья динамика объёма показана красным.

Таблица 10. Эффект устранения ростовых факторов, убаина и форсколина на объём E1A-VSMC клеток

Добавление/ изъятие	<i>n</i>	Клеточный объём, %	Время последнего измерения клеточного объёма, мин	Время клеточного коллапса, мин
Контроль (10% CS)	5	105±6	308±17	ND
CS-free	7	142±8*	140±58 [#]	148±52
CS-free + 1 мМ убаин	3	116±17	331±15	ND
CS-free + 10 µМ форсколин	4	96±12	331±16	ND

Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, которые были получены из *n* независимых экспериментов. Начальные значения клеточного объёма брались за 100%. Убаин был добавлен за 2 часа до устранения ростовых факторов. ND – клеточный коллапс не был зарегистрирован. * $p < 0.005$ в сравнении с контрольными значениями.

4.2.3. Кинетика модуляций объёма E1A-VSMC клеток при действии стауроспорина

Стауроспорин известен как сильный стимулятор апоптоза во всех изученных типах клеток (Okada et al. 2001). В этом смысле E1A-VSMC клетки не являются исключением. **Рисунок 34А** показывает, что 5-ти часовая инкубация E1A-VSMC в присутствии 1 µМ стауроспорина приводит к массивному накоплению мёртвых клеток. Как и в случае

отсутствия ростовых факторов, клетки, обработанные стауроспорином, выявили резкую активацию каспазы 3 (Рис. 27В) и накопление фрагментов хроматина (Рис. 27С). Однако, в отличие от сывороточного голодания, стауроспорин запускал быстрое клеточное сжатие, которое приводило к уменьшению клеточного объема на ~30% через 90 мин инкубации (Рис. 28А-С). Важно отметить, что не смотря на различное поведение объёмов, после 2-5-часов максимального сжатия, клетки, находящиеся под воздействием стауроспорина претерпевали морфологически такое же мембранное почкование и апоптотический коллапс (Рис. 28D) как и в случае E1A-VSMC, лишенных ростовых факторов (Рис. 26С).

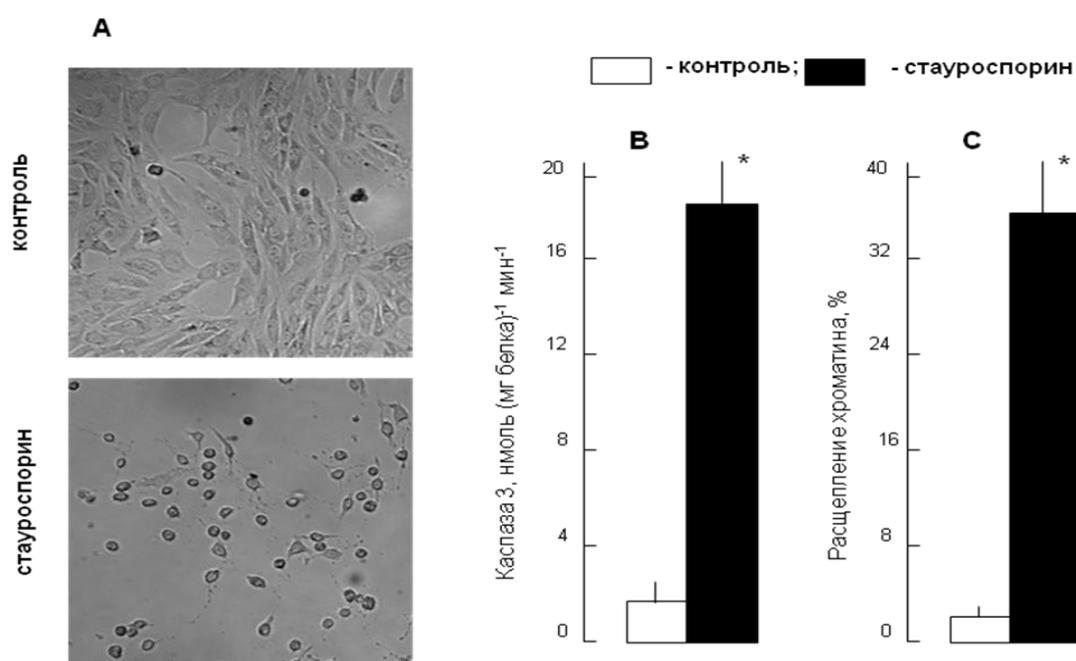


Рис. 27. Эффект стауроспорина на морфологию (А), активность каспазы-3 (В) и расщепление хроматина (С) у E1A-VSMC. Клетки инкубировались в течение 5-ти часов в присутствии 10% телячьей сыворотки и 1 мМ стауроспорина. Показаны средние арифметические значения \pm S.E., полученные в 3-х (каспаза - 3) и 4-х (расщепление хроматина) экспериментах. * $p < 0.002$ в сравнении с контролем.

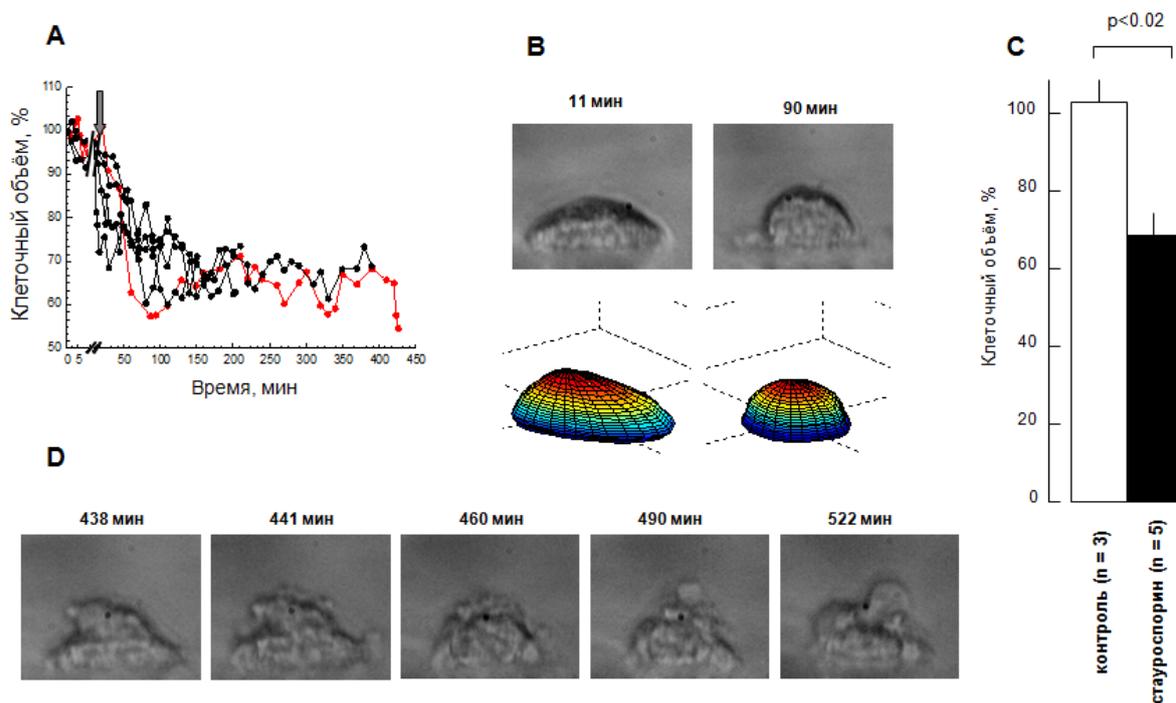


Рис. 28. Эффект стауроспорина на объём E1A-VSMC. **A.** Репрезентативные кинетики изменения объёма, запускаемые добавлением 1 мМ стауроспорина в DMEM содержащую 10% телячьей сыворотки. **B.** *Верх:* Изображения сбоку клеток, чья кинетика изменения объёма показана через 11 и 90 минут после добавления стауроспорина. *Низ:* Соответствующие 3D модели этой же клетки, в те же моменты времени, полученные с помощью методики DISUR. **C.** Объём E1A-VSMC через 90 мин инкубации в присутствии и отсутствии стауроспорина. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные из n независимых экспериментов, показаны. Начальные значения клеточного объёма были взяты за 100%. **D.** Изображения клеток сбоку, показывающие коллапс клеток при сывороточном голодании, чья кинетика клеточного объёма показана **красным**.

4.2.4. Действие анизосмотической среды

Для исследования того, достаточно ли изменения клеточного объёма, зарегистрированных в E1A-VSMC клетках, лишенных ростовых факторов или обработанных стауроспорином, для запуска апоптоза, мы сравнили действия анизосмотической среды на динамику клеточного объёма, активацию каспазы 3 и разрушение хроматина. Как и

предполагалось, искусственно уменьшение осмолярности DMEM при помощи уменьшения [NaCl] от 135 до 85 мМ приводило к временному увеличению клеточного объёма на ~50%, который почти что полностью восстанавливался через 30 мин из-за активации систем, участвующих в регуляторном уменьшении объёма (RVD) (**Рис. 29А**). Последующая перфузия E1A-VSMC изосмотической средой приводит к временному сжатию (так называемое пост-RVD изосмотическое сжатие), которое исчезало со временем из-за включения механизмов регуляторного увеличения объёма (RVI). Увеличение осмолярности DMEM добавлением 150 и 300 мМ маннитола уменьшало клеточный объём на ~20 и 40%, соответственно (**Рис. 29В**).

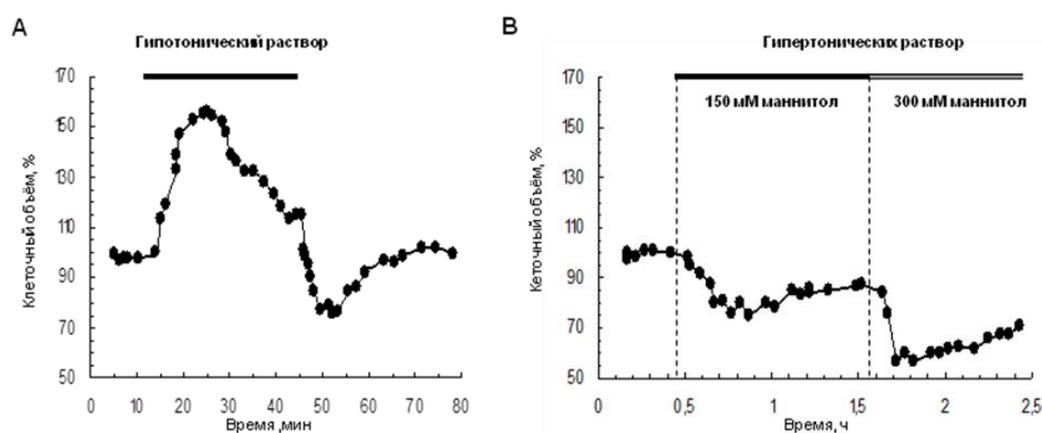


Рис. 29. Репрезентативные кинетики изменения клеточного объёма в E1A-VSMC, обработанных гипосмотической (А) и гиперосмотической (В) средами. Изосмотическая среда (aDMEM) содержала (в мМ) 135 NaCl, 5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 10 глюкозы, 10 HEPES-NaOH (pH 7.4), 10% телячьей сыворотки, витамины и аминокислоты в концентрациях, указанных для приготовления DMEM. В гипоосмотической среде, [NaCl] была уменьшена до 85 мМ; осмолярность была увеличена с помощью добавления 150 и 300 мМ маннитола.

В **таблице 11** показано, что 3-х часовая инкубация E1A-VSMC клеток в изосмотической среде не влияла на активность каспазы-3 и разрушение

хроматина. Ни активность каспазы-3, ни разрушение хроматина не изменились при гипоосмотическом набухании, изоосмотическом сжатии и умеренном гиперосмотическом сжатии, вызванном добавлением 150 мМ маннитола, в то время как 24-часовая инкубация в присутствии 300 мМ маннитола увеличило активность каспазы-3 накопление фрагментов хроматина в ~10-раз.

Таблица 11. 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 (aDMEM)	ND	0.70±0.2 0	0.88±0.08	1.91±0.3 4	2.99±0.27
Гипосмотическое набухание	153±11 (n=5)	0.78±0.1 1	1.09±0.15	2.48±0.4 2	3.13±0.33
Изосмотическое сжатие	77±7 (n=5)	0.64±0.0 9	0.95±0.14	1.33±0.1 9	2.93±0.30
Умеренное гиперосмотическое сжатие	76±4 (n=3)	0.77±0.1 4	1.44±0.30	2.45±0.2 7	4.48±0.61
Сильное гиперосмотическое сжатие	52±5 (n=3)	0.98±0.2 3	7.88±0.66 *	3.77±0.4 1	22.01±2.22 *

Гипосмотическое набухание запускалось уменьшением [NaCl] в aDMEM от 135 до 85 мМ. Изосмотическое сжатие происходило после 30-ти минутного гипоосмотического набухания клеток при их перфузии изоосмотическим aDMEM. Для того чтобы запустить умеренное и сильное гиперосмотическое сжатие, клетки перфузировались aDMEM, содержащим 150 и 300 мМ маннитола, соответственно. [#]Клеточный объём измерялся в моменты максимального изменения (для доп. Деталей, см. Рис. 36). Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, были получены из *n* независимых экспериментов (измерений клеточного объёма) или экспериментов, предпринятых с тремя

(каспаза-3) и четырьмя (расщепление хроматина) образцами. Начальный клеточный объем и общее содержание [³H]-тимидин-меченной ДНК были взяты за 100%. *p<0.001 в сравнении с контрольными значениями.

4.3. Пуриnergическая регуляция объема интеркалированных клеток эпителия почечных канальцев

4.3.1 Эффекты АТФ, УТФ и аннзосмотической среды на клеточный объем С11-MDCK клеток

Как видно на **Рисунке 30А**, 30-ти минутное добавление 50 μМ АТФ приводит к прогрессивному, зависящему от времени сжатию С11-MDCK клеток после изначальной ~5 минутной задержки. АТФ-запускаемое сжатие развивалось далее после отмывки АТФ и сохранялось на протяжении 2-3 часов. В среднем, через 60 мин (30 минут инкубации с АТФ за которыми следовали 30 мин инкубации без АТФ), объем С11-MDCK клеток уменьшался на 55±11% (**Рис. 30 В**). Следует отметить, что - клеточное сжатие при действии АТФ было более сильным по сравнению с клеточным сжатием 38±8% (n=4) в клетках, перфузированных гиперосмотической средой, где осмолярность была увеличена на ~50% добавлением 150 мМ маннитола (**Рис. 31А**). Гиперосмотически сжатые клетки показали очень ограниченное или не показали вообще регуляторное увеличение объема (RVI) и полностью восстанавливали объема при их возвращении в изотоническую среду (**Рис. 31А**). Напротив, при действии гипоосмотической среды, где осмолярность была уменьшена на ~30%, С11-MDCK клетки быстро набухли на 54±13% (n=5), полностью восстановили свой объем в течение последующих 10-15 мин, и сжимались при возвращении в изоосмотическую среду (**Рис. 31В**). Это вторичное сжатие может быть объяснено уменьшением количества внутриклеточных осмолитов, обусловленное активацией систем, вовлеченных в RVD, что сделало осмолярность цитоплазмы пониженной по отношению к изоосмотической внеклеточной среде. Полученные нами результаты

согласуются с быстрым RVD и незначительным RVI, выявленных в суспензии MDCK клеток с помощью методики Coulter counter (Roy and Sauv e 1987; Rothstein and Mack 1990; Rothstein and Mack 1990; Rothstein and Mack 1990).

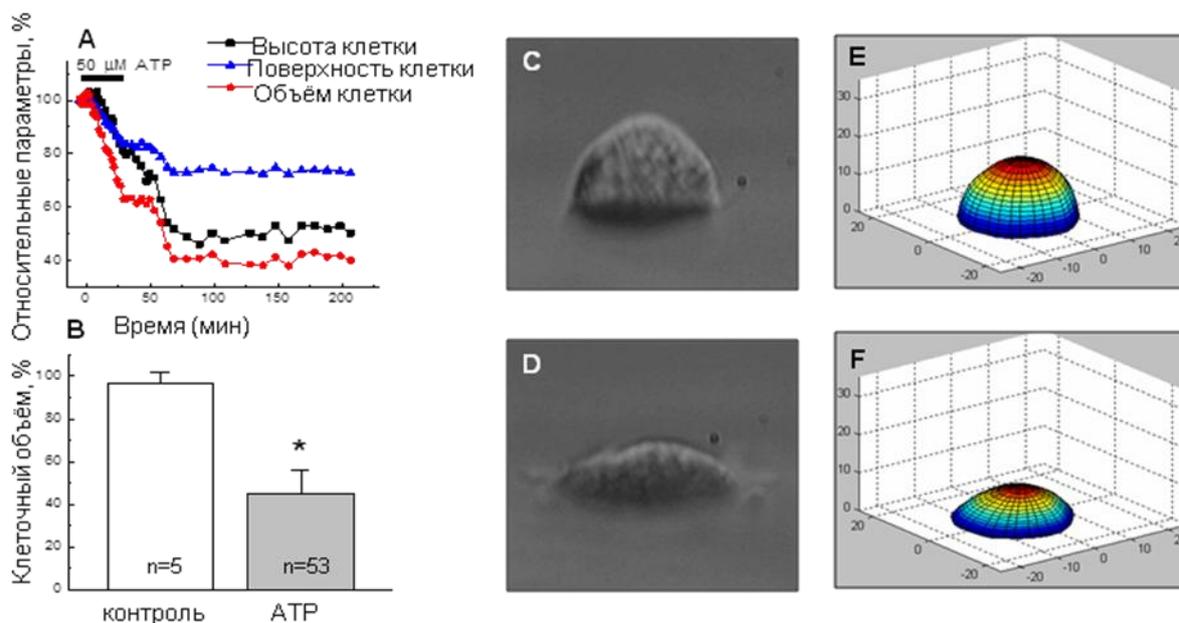


Рис. 30. АТФ приводит к продолжительному сжатию C11-MDCK клеток. **А:** Типичные кривые, показывающие, зависящие от времени изменения высоты, площади поверхности и объема в клетках, перфузируемых 50 мМ АТФ в течение 30 минут при изоосмотических условиях. Начальные значения высоты, поверхности и объема были взяты за 100%. **В:** Количественные изменения клеточного объема в клетках, подверженных 60 мин перфузированию изоосмотической средой (*control*), или в течение 30 мин изоосмотической средой, содержащей 50 мМ АТФ, за которыми следовало 30 мин среды без АТФ (*ATP*). Начальные значения клеточного объема были измерены до добавления АТФ или vehicle, и варьировали в диапазоне $4,268 \pm 246 \text{ мм}^3$ ($n = 53$). Во всех случаях, индивидуальный начальный объем клеток был принят за 100%. $p < 0.05$, vs. control. **С, D:** Вид сбоку светового микроскопа одной клетки до добавления АТФ (**С**), и через 30-мин инкубации с 50 мМ АТФ, за которыми следовала 30 мин инкубация в без-АТФ среде (**D**). **Е, F:** Соответствующий вид 3D моделей, соответствующих изображениям **С** и **D**, которые были сформированы с помощью методики DISUR, как описано в Материалах и Методах.

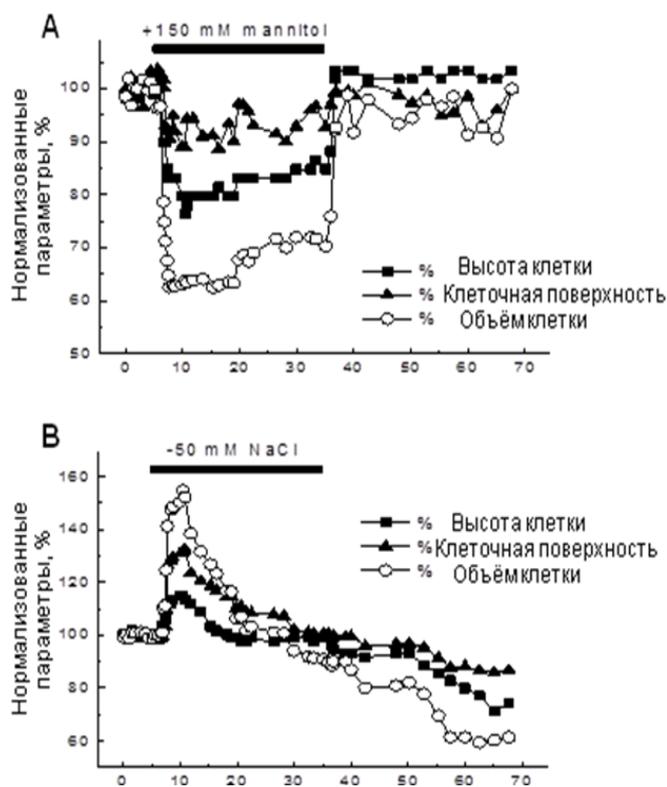


Рис. 31. Динамика клеточного объёма в C11-MDCK клетках, подверженных действию гиперосмотической (А) или гипосмотической (В) среды. А: Репрезентативная кинетика изменений высоты, поверхности и объёма клеток, находящихся в течение 30 мин в гиперосмотической среде (+150 mM mannitol). Начальные значения были приняты за 100%. В: Репрезентативная кинетика изменений высоты, поверхности и объёма клеток C11-MDCK находящихся в течение 30 мин в гипотонической среде ([NaCl] уменьшена от 135 до 85 mM). Начальный объём был принят за 100%.

Аналогично АТФ, 30 минутная перфузия с 50 μ M УТФ вызывало длительное сжатие C11-MDCK клеток (Рис. 32А). В 4 независимых экспериментах, среднее уменьшение клеточного объёма при действии УТФ было ~45% (Рис. 32В). Контрольные клетки не показали статистически значимого изменения объёма за аналогичный период времени (Рис. 32А). Эти данные убедительно показывают, что клеточное сжатие запускается активацией АТФ - и УТФ-чувствительных P2Y рецепторов, а не АТФ-чувствительными, УТФ-резистентными P2X рецепторами (см. Таблицу 3).

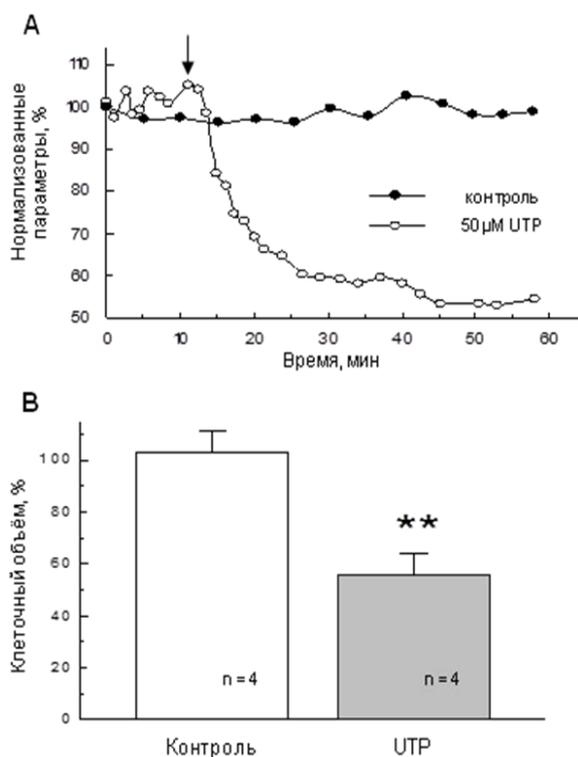


Рис. 32. Эффект агониста P2Y UTP на C11-MDCK клеточный объём. А:

Репрезентативные кинетики объёма контрольных клеток (1) и клеток, перфузированных в течение 30 мин изотонической средой, содержащей 50 mM UTP (2). Момент добавления UTP показан стрелочкой. Начальный объём был принят за 100%. В: Среднее изменение объёма клеток, подверженных перфузии изотонической среды в течение 60 мин (*control*) или 30 мин с 50 mM UTP за которыми следовали 30 мин

без UTP среды (*UTP*). UTP добавлялся через 5 минут после изначальной перфузии изотонической средой как показано А. Начальное значение объёма до добавления UTP or vehicle были приняты за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 4 независимых экспериментах. **p<0.01, по сравнению с контролем.

4.3.2 Роль Ca^{2+}_i и протеинкиназы A и C

В предыдущих исследованиях было установлено, что P2Y рецепторы в C11-MDCK клетках запускают различные сигнальные каскады, включая активацию протеинкиназы C (PKC), увеличение $[Ca^{2+}]_i$ и накопление цАМФ (Orlov et al. 1999a; Akimova et al. 2006a). Имея это в виду, мы исследовали роль этих сигнальных систем в сжатии C11-MDCK клеток в ответ на добавление АТФ.

Как добавление Ca^{2+} ионофора иономицина, так и активатора Ca^{2+} - и фосфолипид-чувствительных изоформ PKC, 4β-РМА, приводило к развивающемуся во времени сжатию C11-MDCK клеток (Рис. 33А), что

соответствовало уменьшению клеточного объема на ~30% (Таблица 12). Ранее ~20% уменьшение объема при действии иономицина было обнаружено в линии клеток MDCK-F с помощью атомно-силовой микроскопии (Schneider et al. 2000). Когда 4 β -PMA и иономицин добавлялись последовательно, их эффекты на клеточный объем суммировались (Рис. 33В), и после 1 часа инкубации с этими соединениями, клеточный объем уменьшился на ~60% (Таблица 12). Обработка C11-MDCK клеток не активным аналогом 4 β -PMA, 4 α -PDD, также как и активатором аденилатциклазы форсколином, который резко увеличивал продукцию цАМФ в C11-MDCK клетках (Orlov et al. 1999a), не влияли на клеточный объем (Рис. 33С, Таблица 12).

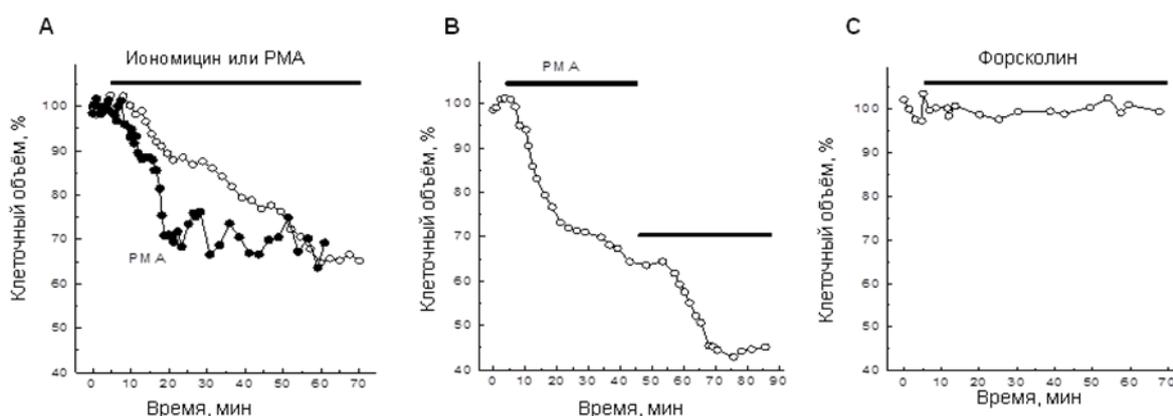


Рис. 33. Репрезентативная кинетика действия Ca^{2+} ионофора иономицина, активатора РКС 4 β -PMA и активатора аденилатциклазы форсколина на объем одиночны C11-MDCK клеток. Один иономицин (А), 1 мМ 4 β -PMA (А), комбинация 4 β -PMA и иономицина (В), или 10 мМ форсколин (С) были добавлены как отмечено. Начальный клеточный объем был принят за 100%.

Таблица 12. Действие иономицина, 4 β -РМА, 4 α -PDD и форсколина на объём C11-MDCK клеток

Добавление, μ M	n	Клеточный объём (%)
Ничего (Контроль)	3	97 \pm 5
Иономицин, 1	4	70 \pm 4 (p<0.01)
4 β -РМА, 1	4	73 \pm 4 (p<0.05)
4 α -PDD, 1	3	105 \pm 8 (NS)
Форсколин, 10	3	103 \pm 7 (NS)
Иономицин + 4 β -РМА	4	43 \pm 6 (p<0.002)

Клетки инкубировались в течение 1 часа в среде А с соединениями, перечисленными в левой колонке. Начальный клеточный объём был принят за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в n независимых экспериментах, р значения показаны. NS - не значительно.

Как видно из **Рисунка 21**, как АТФ, так и УТФ запускали быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ со среднемаксимальными значениями 775 \pm 102 (n=4) и 783 \pm 121 нМ (n=3) для АТФ и УТФ, соответственно. Мы не наблюдали никакого значительного действия 4 β -РМА на исходный уровень $[Ca^{2+}]_i$ (данные не приведены). Для дальнейшего исследования роли Ca^{2+} в АТФ-запускаемом клеточном сжатии, мы нагрузили C11-MDCK клетки Ca^{2+}_i хелатором ВАРТА-АМ в свободной от Ca^{2+} среде, содержащей внеклеточный Ca^{2+} хелатор EGTA. Эта процедура блокировала АТФ-запускаемое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в C11-MDCK клетках (**Рис. 21С**, $\Delta[Ca^{2+}]_i = 673\pm 91$ (n=4) и 67 \pm 33 нМ (n=3) в контроле и в присутствии хелаторов Ca^{2+} , соответственно, p<0.001) и полностью предотвратило клеточное сжатие, запускаемое АТФ, УТФ и 4 β -РМА (**Таблица 13**). Полученные в этом разделе результаты указывают на ключевую роль $[Ca^{2+}]_i$ и Ca^{2+} -зависимых изоформ РКС в клеточном сжатии, запускаемом агонистами P2Y рецепторов.

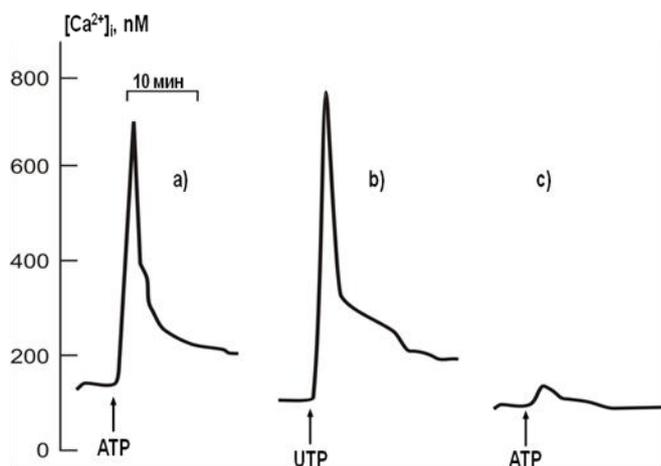


Рис. 34. Репрезентативные кинетики показывающие действие 50 мМ АТР (а, с) и УТР (b) на концентрацию $[Ca^{2+}]_i$ в С11-MDCK клетках. а, b) – Клетки перфузировались контрольной средой А; с) – Клетки перфузировались в течение 30 мин с 20 мМ ВАРТА-АМ в без- Ca^{2+} среде А, содержащей 0.2 мМ EGTA, и затем добавлялся АТР.

Таблица 13. Хелаторы внеклеточного и внутриклеточного Ca^{2+} полностью предотвращает сжатие С11-MDCK клеток, вызванное добавками АТФ-, УТФ- и 4β-РМА

Добавки, μМ	n	Клеточный объём (%)
1. Ничего (контроль)	3	103±6
2. АТФ, 50	5	55±5 (p<0.001)
3. УТФ, 50	5	58±6 (p<0.005)
4. 4β-РМА, 1	4	68±5 (p<0.01)
5. ВАРТА-АМ, 20	3	95±6 (NS)
6. ВАРТА-АМ + АТФ	3	98±7 (NS)
7. ВАРТА-АМ + УТФ	3	105±6 (NS)
8. ВАРТА-АМ + 4β-РМА	3	104±8 (NS)

В экспериментах 1-4, С11-MDCK клетки инкубировались в среде А в течение 30 мин и соединения, перечисленные в левой колонке, добавлялись на последующий 1 час. В экспериментах 5-8, клетки перфузировались в течение 30 мин с ВАРТА-АМ с без- Ca^{2+} среде А, содержащей 0.2 мМ EGTA и затем АТР, УТР и 4β-РМА добавлялись на 1 час. Начальный объём клеток был принят за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в n независимых экспериментах. NS - не значительно.

4.3.3 Эффект антагонистов P2Y рецепторов

За исключением P2Y₁₄, АТФ активирует все клонированные пуриnergические рецепторы, в то время как УТФ является мощным и селективным агонистом P2Y₂, P2Y₄ и P2Y₆ рецепторов (**Таблица 3**) (Burnstock 2007b). Ранее, в нашей лаборатории было установлено, что C11-MDCK клетки экспрессируют мРНК, кодирующие P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁ и P2Y₁₂ рецепторы (Akimova et al. 2006a). Исходя из этих данных, мы исследовали действия селективных антагонистов P2Y₁ и P2Y₆ рецепторов, соединений MRS2179 и MRS2578, соответственно, и сурамина, антагониста P2X₂, P2X₅, P2Y₂, P2Y₄ и P2Y₁₁ рецепторов (Burnstock 2007b), на изменения клеточного объема и прирост $[Ca^{2+}]_i$, вызванные добавками АТФ и УТФ. **Таблица 14** показывает, что сурамин полностью устранял клеточное сжатие и сильно уменьшал прирост $[Ca^{2+}]_i$, вызванный АТФ и УТФ. В отличие от этого, ни MRS2179, ни MRS2578 не воздействовали на эти параметры.

Таблица 14. Действие антагонистов пуринергических рецепторов на клеточное сжатие и на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, запускаемое АТФ и УТФ.

Добавки, μ M	Клеточный объём, %	Максимальный прирост $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на добавки АТФ or УТФ, nM
1. АТФ, 100 ($n=4$)	52 \pm 8	673 \pm 91
2. АТФ + MRS2179, 10 ($n=3$)	59 \pm 6	703 \pm 82
3. АТФ + MRS2578, 10 ($n=3$)	49 \pm 7	651 \pm 88
4. АТФ + сурамин, 100 ($n=5$)	99 \pm 11	93 \pm 67
5. УТФ, 100 ($n=3$)	58 \pm 8	781 \pm 132
6. УТФ + сурамин ($n=5$)	104 \pm 12	118 \pm 56
$P_{1,4}$	<0.02	<0.005
$P_{5,6}$	<0.02	<0.005

C11-MDCK клетки перфузировались в течение 10 мин в среде А с или без антагонистов пуринергических рецепторов, перечисленных в левой колонке. Далее, АТФ или УТФ были добавлены на 60 мин (измерения клеточного объёма) или 10 мин (измерения $[Ca^{2+}]_i$). Изначальный клеточный объём был принят за 100%. Показаны средние значения \pm SE для n экспериментов и p значения <0.05.

4.3.4 Эффект ингибиторов ионного транспорта на АТФ-зависимые изменения клеточного объёма

В нашей лаборатории было обнаружено, что увеличение осмолярности среды уменьшает объём клеток карциномы лёгких А549 после диссипации трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ и даже после пермеабилзации плазматической мембраны (Fels et al. 2009). Для изучения роли трансмембранных ионных градиентов при АТФ-зависимом сжатии C11-MDCK клеток, мы подвергли эти клетки действию среды, напоминающей по соотношению концентраций натрия и калия (высокий- K^+ /низкий- Na^+) внутриклеточную среду. В соответствии с данными, полученными ранее (O'Neill 1999), эта среда вызывала набухание C11-

MDCK клеток (**Рис. 35А**). Мы также обнаружили, что диссипация ионных градиентов, имеющая место в этой среде, полностью предотвратила АТФ-зависимое сжатие клеток (**Рис. 35В**). Эти результаты свидетельствуют о том, что сжатие клеток под действием АТФ происходит из-за активации направленных наружу и/или ингибированием направленных внутрь ионных потоков и осмотически связанной с ними воды, а не изменением функционирования гидрогеля цитоплазмы как осмосенсора.

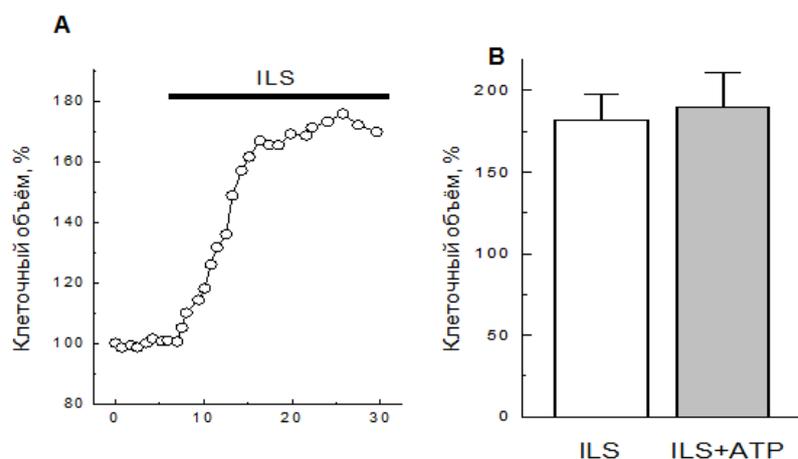


Рис. 35. Для АТФ-запускаемого сжатия C11-MDCK клеток необходимы K^+ и Na^+ трансмембранные градиенты. **А:** Репрезентативная кинетика изменения клеточного объёма, запускаемая перфузией высокой- K^+ , низкой- Na^+ похожего на внутриклеточного раствора (ILS) содержащего (in mM) 10 NaCl, 110 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5 глюкозы и 10 HEPES (pH 7.2, 37°C). **В:** Средние объёмы C11-MDCK клеток, подверженных действию 60 мин ILS или в течение 30 мин ILS среды, за которой следовало 30 мин в той же среде, содержащей 50 mM АТФ. Начальный объём клеток, измеренный до применения ILS среды, был взят за 100%. Данные показывают средние значения \pm SE полученные в 3 независимых экспериментах.

Ранее было установлено, что продолжительная инкубация C11-MDCK клеток в присутствии АТФ и УТФ приводит к практически полному ингибированию $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта (Orlov et al. 1999a; Brindikova et al. 2003). **Таблица 15** показывает, что 30 минутное ингибирование $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта с помощью 20 μ M буметанида

приводит к незначительному (~15-20%) уменьшению объема C11-MDCK клеток; в присутствии буметанида сжатие, запускаемое АТФ, сохранялось. Эти результаты, показывают, что ингибирование $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта не является непосредственной причиной АТФ-зависимого сжатия C11-MDCK клеток.

Таблица 15. Действие ингибиторов ионного транспорта на сжатие C11-MDCK клеток, вызванное добавлением АТФ

Добавки, μM	n	Клеточный объём (%)
1. Нет (контроль)	5	99 \pm 3
2. Буметанид, 10	5	79 \pm 4
3. Карибдотоксин, 0.1	3	111 \pm 5
4. Паксиллин, 2	3	112 \pm 6
5. Клотримазол, 2	3	95 \pm 6
6. Ибериотоксин, 0.1	3	104 \pm 7
7. NPPV, 100	3	97 \pm 6
8. АТФ, 50	6	47 \pm 6
9. Буметанид + АТФ	6	52 \pm 5
10. Карибдотоксин + АТФ	4	96 \pm 4
11. Паксиллин + АТФ	4	101 \pm 6
12. Ибериотоксин + АТФ	4	90 \pm 7
13. Клотримазол + АТФ	6	67 \pm 9
14. NPPV + АТФ	6	92 \pm 9
$P_{1,2}$		<0.01
$P_{1,8}$		<0.001
$P_{1,9}$		<0.001
$P_{2,9}$		<0.005
$P_{1,13}$		<0.005
$P_{8,10}$		<0.001
$P_{8,11}$		<0.001
$P_{8,12}$		<0.005
$P_{8,13}$		=0.092
$P_{8,14}$		<0.002

C11-MDCK клетки перфузировались средой А в течение 60 мин с или без ингибиторов ионного транспорта, перечисленных в левой колонке. В экспериментах 8-14, АТФ добавлялось в течение последних 30 мин перфузии. Исначальный объём клеток был принят за 100%. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в n независимых экспериментах. $p < 0.05$.

Так как K^+ является главным внутриклеточным осмолитом, мы исследовали действие K^+ каналов. 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 средней-проводимости (IK_{Ca}), в то время как клотримазол блокирует IK_{Ca} , но не BK_{Ca} (Wulff et al. 2000; Pedarzani and Stocker 2008; Sanchez and McManus 1996; Pedarzani and Stocker 2008; Sanchez and McManus 1996). Мы обнаружили, что 1 часовая инкубация с карибдотоксином и паксилином приводит к умеренному набуханию C11-MDCK клеток (**Таблица 15**), что согласуется с данными, полученным при действии карибдотоксина на MDCK-F клетки (Schneider et al. 2000). Важно, что карибдотоксин, ибериотоксин и паксиллин полностью предотвращают клеточное сжатие, запускаемое АТФ. Ни базовый клеточный объём, и АТФ-запускаемое клеточное сжатие не изменились при действии клотримазола.

NPPB, соединение, которое блокирует практически все известные анионные каналы, включая Ca^{2+} -активируемые Cl^- каналы и объём-регулируемые анионные каналы VRAC (Nilius and Droogmans 2001), полностью подавляло сжатие C11-MDCK клеток, вызванное добавлением АТФ (**Таблица 15**).

4.3.5 Действие АТФ на внутриклеточный состав моновалентных ионов

Для определения потеря какого из внутриклеточных осмолитов связана с клеточным сжатием, мы измеряли внутриклеточный состав K^+ , Na^+ , и Cl^- как стационарное распределение $^{86}Rb^+$, $^{22}Na^+$, и $^{36}Cl^-$, соответственно. Как видно из **Таблицы 16**, 1-часовая инкубация C11-MDCK клеток с АТФ уменьшало внутриклеточное содержание обмениваемого K^+ и Cl^- на ~20%. Ингибирование экто-АТФазы с помощью добавления 100 μ M ARL 67156 не изменило внутриклеточный состав этих моновалентных ионов, но увеличило потерю K^+ и Cl^- в клетках при действии АТФ до 33% ($p < 0.02$) и 41% (и $p < 0.05$), соответственно. Принимая это во внимание, мы исследовали действие ингибиторов K^+ и Cl^- каналов в присутствии ARL 67156. Мы обнаружили, что ингибирование Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов паксилином, ибериотоксином и карибдотоксином полностью предотвратило потерю K^+ и Cl^- , запускаемую АТФ. Действие АТФ на внутриклеточный состав ионов также уменьшался при действии ингибитора анионных каналов NPPB (**Таблица 16**).

Таблица 16. Действие АТФ и ингибиторов ион-транспортирующих систем на внутриклеточный состав моновалентных катионов (нмоль на мг белка)

Добавки, μM	K^+	Na^+	Cl^-
Нет (контроль)	210 \pm 12	49 \pm 10	146 \pm 19
АТФ, 100	161 \pm 12*	ND	114 \pm 17
ARL 67156, 100	221 \pm 18	ND	152 \pm 21
АТФ + ARL 67156	141 \pm 13**	32 \pm 8	86 \pm 10*
АТФ + ARL 67156+ карибдотоксин, 0.1	205 \pm 15	35 \pm 12	138 \pm 17
АТФ + ARL 67156+ паксиллин, 2	218 \pm 8	43 \pm 10	150 \pm 14
АТФ + ARL 67156+ ибериотоксин, 0.1	197 \pm 11	40 \pm 8	130 \pm 12
АТФ + ARL 67156+ NPPB, 100	189 \pm 15	50 \pm 13	139 \pm 16

Клетки инкубировались в течение 1 ч в среде А с соединениями, перечисленными в левой колонке. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка, полученные в 3 независимых экспериментах. *, ** - $p < 0.05$ и < 0.02 относительно контроля, соответственно. ND – эти параметры не измерялись.

4.3.6. Карибдотоксин и NPPB подавляют АТФ-индуцированную экспрессию c-Fos

Так как промотор c-Fos включает (Ca^{2+} +сАМР) чувствительные элементы, его экспрессии регулируется различными стимулами, вызывающими увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$ (Taurin et al. 2002a) и активацию протеинкиназ А и С, отмеченные при действии агонистов P2Y рецепторов (Muscella et al. 2003). Имея это ввиду, мы сравнили действие АТФ на экспрессию c-Fos в отсутствии и присутствии карибдотоксина и NPPB – ингибиторов ионных каналов, препятствующих АТФ-индуцированному сжатию C11-MDCK клеток (Таблица 16). Рисунок 36 показывает, что 30 минутная инкубация C11-MDCK клеток с АТФ увеличивает содержание белка c-Fos в ~5-раз. Аналогично их действию на АТФ-индуцируемое

сжатие клеток (Таблица 16), карибдотоксин резко уменьшал, а NPPB полностью ингибировал прирост содержания иммунореактивного белка в ответ на активацию P2Y рецепторов.

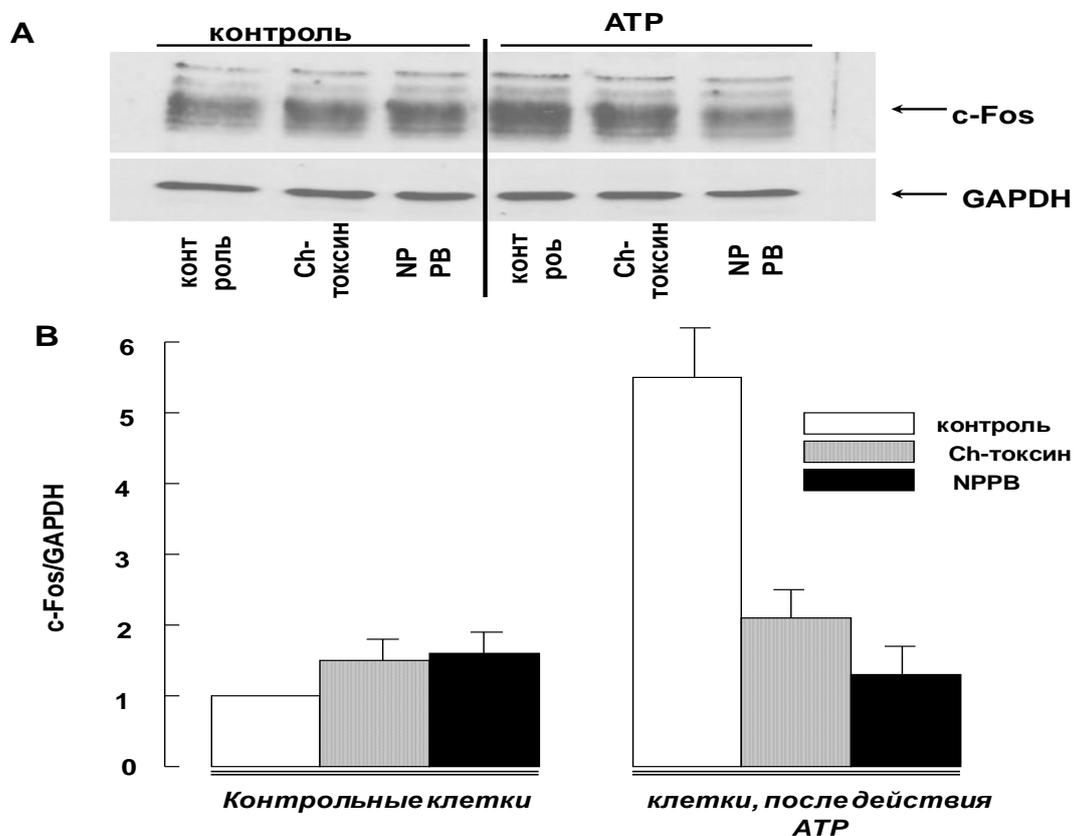


Рис.36. c-Fos экспрессия в C11-MDCK клетках. **А:** Репрезентативный Вестерн блот, показывающий эффект АТР, карибдотоксина и NPPB на c-Fos и GAPDH содержание в C11-MDCK клетках. **В:** Эффект карибдотоксина и NPPB на отношении c-Fos/GAPDH в контрольных и подверженных действию АТР клеток. Клетки инкубировались в среде А, содержащей 100 мМ ARL 67156 ± 0.1 мМ карибдотоксин или 100 мМ NPPB в течение 10 мин, и затем 50 мМ АТР или vehicle добавлялись на следующие 30 мин. c-Fos/GAPDH отношение в отсутствии АТР и других тестируемых компонентов было взято за 1.0. Показаны средние значения ± SE, полученные в 4 экспериментах.

5. Обсуждение результатов

5.1 Смерть C11-MДСК клеток при действии убаина не опосредуется набуханием и разрывом плазматической мембраны

В соответствии с термодинамической моделью, рассмотренной в разделе 2.2.2.2, убаин и другие CTS вызывают диссипацию Гиббс-Доннановского равновесия и электрического мембранного потенциала, что в свою очередь, может привести к увеличению объёма и разрушению плазматической мембраны (Macknight and Leaf 1977; Armstrong 2003; Armstrong 2003). Данные, согласующиеся с этой гипотезой, были в основном получены на гепатоцитах, подверженных АТФ голоданию через гипоксию, окислительный стресс или ингибирование окислительного фосфорилирования. Используя электронный измеритель размеров клеток и измерение светорассеяния суспензии клеток, Carini с коллегами обнаружили, что гепатоциты, подверженные АТФ голоданию набухают в 2 фазы: изначальное ~15% набухание с сохраненной целостностью плазматической мембраны, и конечное 30-40% набухание, за которым следует резкое увеличение проницаемости плазматической мембраны для пропидиум иодида и накопление мёртвых клеток (Carini et al. 1999). Они также заметили, что набухание и смерть гепатоцитов устранялась в среде, лишенной Na^+ (Carini et al. 1995).

Рассматривая эту хемиосмотическую гипотезу смерти набухших клеток, необходимо подчеркнуть, что действие CTS на клеточный объём различно в различных типах клеток. Так, 10-30-мин инкубация с убаином вызывала набухание желудочковых миоцитов морских свинок (Takeuchi et al. 2006) и нейронов пиявки *Retzius* (Dierkes et al. 2006), не воздействовала на объём желудочковых миоцитов кролика (Drewnowska and Baumgarten 1991), гепатоцитов (Russo et al. 1994) и астроцитов (Kimmelberg and Ransom 1986)

крысы, клеток линий Jurkat (Nobel et al. 2000) и А6 (Granitzer et al. 1994) и приводило к сжатию миоцитов сердца, выделенных из эмбрионов цыплят (Smith et al. 1993) и нейронов улитки *Helix aspersa* (Alvarez-Leefmans et al. 1992). В перфузированных корковых собирательных трубочках кроликов, убаин запускал временное набухание, за которым следовало уменьшение объёма с финальным объёмом на 15% ниже контрольных значений (Strange 1990).

Вместе с ткане - и видоспецифическим вовлечением внутриклеточных моновалентных ионов и органических осмолитов в регулирование объёма клеток (Lang et al. 1998a; Mongin and Orlov 2001; Hoffmann et al. 2009; Mongin and Orlov 2001; Hoffmann et al. 2009; Lang et al. 1998a; Hoffmann et al. 2009), противоречивые результаты, полученные в при исследовании цитотоксического действия CTS, могут быть как объяснены отсутствием надёжных методов мониторинга в течение длительного времени динамики изменения объёма прикреплённых к подложке клеток. В самом деле, как отмечалось выше, светорассеяние может применяться для относительной оценки клеточного объёма суспендированных клеток однородной формы. Измерение объёма с помощью счётчика Культера может быть также использовано только для суспендированных клеток, а трипсинизация прикрепленных к подложке клеток с целью перевода их в суспензию, может быть достаточным условием для изменения клеточного объёма (Andersen et al. 2005). Кроме того, открепление эпителиальных и эндотелиальных клеток от подложки, приводит к так называемому апоптоису, вид клеточной смерти, сопровождающийся их сжатием (Akimova et al. 2008). Количественная оценка клеточного объёма из измерений площади планарной поверхности не может быть также использована в этом случае, так как изменение объёма клеток, прикреплённых к подложке, происходит в основном за счёт изменения их высоты, а не планарной площади (Boudreault and Grygorczyk 2004; Groulx et al. 2006; Groulx et al. 2006; Fels et al. 2009; Groulx

et al. 2006). Альтернативные техники, использующие проникающие через мембрану радиоактивные метки, такие как [^{14}C]urea, или метил-D-[^{14}C]глюкозу, нуждаются в продолжительной преинкубации, имеют ограниченную точность, и не могут использоваться для исследования быстрого изменения объёма. Некоторые эти ограничения могут быть установлены с помощью измерений объёма, основанных на изобестическом совмещении флуоресценции красителей, таких как fluo-2, кальцеин или BCECF. Нужно подчеркнуть, что такие методы предполагают гомогенное распределение оптически-активных молекул внутри клетки, их незначительное фотовысвечивание вместе с минимальными побочными эффектами, которые могут возникать при продуцировании активных форм кислорода (Solenov et al. 2004; Hamann et al. 2002b; Hamann et al. 2002b; Hamann et al. 2002b). В дополнение, утечка этих реагентов, также как и тетраэтиламмониевых катионов, измеряемая ион-селективными микроэлектродами (Reuss 1985), усложняет их использование для сравнительного анализа длительной кинетики изменения клеточного объёма, вызванных CTS.

Учитывая указанные выше ограничения, мы применили метод DISUR для сравнения кинетики модуляции объёма CTS-чувствительных C11-MDCK клеткок и CTS-устойчивых клеток гладкой мускулатуры крысы (VSMC). Данные, полученные в этих экспериментах, показывают, что разрыв плазматической мембраны при клеточном набухании не участвует в цитотоксическом действии убаина. В самом деле, полномасштабная инверсия соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ как в C11-MDCK, так и VSMC клетках наблюдалась через 2 ч после добавления убаина (**Рис. 17**). В этой временной точке, объём C11-MDCK и VSMC клеток при действии убаина увеличивался на 16% и 12%, соответственно (**Таблица 6**). Мы также заметили, что схоже с оубаином, ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы в без K^+ среде привело к резкой инверсии $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ отношения и умеренному набуханию C11-MDCK клеток

(Таблица 6). Однако, в отличие от убаина, мы не наблюдали цитотоксического действия на C11-MDCK клетки среды без калия, вызывающих сходное убаином ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы и диссипацию трансмембранного градиента натрия (Рис. 18, Таблица 5). Это любопытное явление было изначально описано для C7-MDCK клеток Пшежетским с коллегами (Pchejetski et al. 2003) и затем подтверждено Contreras et al. (Contreras et al. 2004). Изучая клетки, пермеабилizованные дигитонином, мы обнаружили, что ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы приводит также к незначительному набуханию (Рис. 21, Таблица 9). В последующих экспериментах мы увеличили время инкубации с убаином до 7 ч и показали, что за 5-10 мин до открепления от подложки объём C11-MDCK клеток, обработанных убаином, увеличился на ~30-40% (Рис. 19, Таблица 7). Важно отметить, что выброс LDH из гипосмотически набухших клеток как маркер нарушенной целостности плазматической мембраны запускался, когда объём C11-MDCK клеток увеличивался в ~5-раз, но отсутствовал при 2-3-кратном увеличении объема клеток (Таблица 8). Эти данные сопоставимы с предыдущими результатами, показывающими что A549, 16HBE14o-, NIH 3T3 и клетки семенников китайского хомячка имеют большой мембранный резерв, который в силу наличия инвагинаций плазматической мембраны и внутриклеточных мембран позволяют без литического разрыва увеличить поверхность плазматической мембраны и объём клеток в ~4- и 10-раз, соответственно, (Groulx et al. 2006).

Механизм, лежащий в основе независимого от объёма клеток разрыва плазматической мембраны и смерти клеток при действии CTS, остаётся плохо изученным. На протяжении последних 2 десятилетий, несколько исследовательских групп показали, что Na^+, K^+ -независимые эффекты CTS, включая кавеолин-опосредованное взаимодействие $\alpha\text{-Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы с мембранно ассоциированной тирозин киназой Src, которая, в свою очередь, активирует различные сигнальные пути, включая митоген-активируемые

протеин киназы (МАРК), фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K), PI3K-зависимую протеин киназа В, фосфолипазу С (PLC), колебания $[Ca^{2+}]_i$ и увеличение продукция активных форм кислорода (АФК) (для обзора, см (Хие 2003;Aperia 2007;Schoner and Scheiner-Bobis 2007)). В предыдущем исследовании, Акимова с сотрудниками не нашла какого-либо участия PLC, Ca^{2+}_i и АФК в индуцированной уабаином смерти C11- и C7-MDCK клеток (Akimova et al. 2005b). Было установлено, однако, что смерть MDCK клеток, при действии CTS уменьшалась при умеренном закислении цитоплазмы (Akimova et al. 2006c), ингибировании p38 МАРК киназы (Akimova et al. 2009) и трансфекции клеток CTS-устойчивой $\alpha 1-Na^+,K^+$ -АТФазой (Akimova et al. 2010). Относительное участие различных субъединиц Na^+,K^+ -АТФазы также как и *de novo* экспрессированных H^+ -чувствительных генов в клеточной смерти, вызванной CTS, должно быть изучено в дальнейших исследованиях.

5.2 Набухание, а не сжатие предшествует смерти гладкомышечных клетках сосудов, вызванной устранением ростовых факторов

Ранние морфологическое исследование привели исследователей к гипотезе, что сжатие является не только универсальным маркёром апоптоза, но участвует в запуске и/или развитии механизма клеточной смерти (см. Раздел 2.2). Проведенные нами эксперименты показали, что увеличение клеточного объёма ~50%, а не сжатие предшествует смерти E1A-VSMC клеткок, вызванной отсутствием в среде инкубации ростовых факторов, считающимся классическим индуктором апоптоза (**Рис. 26**). Это наблюдение соответствует увеличению объёма на 10-20%, зафиксированное в опухолевых клетках асцита Эрлиха при действии цисплатина (Tastesen et al. 2010), и лимфоцитах человека, обработанных агонистами P2X₇ рецепторов (Taylor et al. 2008). Следует заметить, однако, что набухание клеток асцита Эрлиха

было заметно через 16 ч после добавления цисплатина и могло быть следствием вторичного некроза, а не раннего апоптоза, в то время как умеренное набухание P2X₇-стимулированных лимфоцитов было замечено после их транзитного сжатия. В наших экспериментах мы не видели предварительного сжатия E1A-VSMC клеток при их переносе в среду, лишенную ростовых факторов. Мы также заметили, что набухание предшествовало появлению апоптотических клеткок (Рис. 26), активации каспазы-3 и разрушению хроматина (Рис. 27).

Несколько сценариев может быть предложено для разнонаправленного изменения объёма, обработанных триггерами апоптоза.

Первое, изменение объёма клеток, претерпевающих апоптоз. находится под контролем тканеспецифичного набора транспортёров плазматической мембраны, участвующих в перемещении главных осмолитов и поддержании их электрохимического градиента на плазматической мембране. Эта гипотеза соответствует термодинамической модели, рассматривающей вовлечение ионных транспортёров в регуляцию объёма в клетках с разным мембранным потенциалом (E_m) и внутриклеточными концентрациями K^+ ($[K^+]_i$) и Cl^- ($[Cl^-]_i$) (Рис. 7). В самом деле, в клетках с $E_m \sim E_K > E_{Cl}$, $[K^+]_i = [K^+]_{iN}$ и $[Cl^-]_i > [Cl^-]_{iN}$, активация K^+ каналов не влияет на клеточный объём, в то время как активация Cl^- каналов приводит к деполяризации мембраны, выходу K^+ и клеточному сжатию (здесь, $[K^+]_{iN}$ и $[Cl^-]_{iN}$ означают внутриклеточные концентрации K^+ и Cl^- , которые соответствуют потенциалам равновесия Нернста (E_K и E_{Cl} , соответственно). В клетках с $E_m \sim E_{Cl} < E_K$, $[K^+]_i > [K^+]_{iN}$, $[Cl^-]_i \sim [Cl^-]_{iN}$ и $P_{Cl} \gg P_K$, активация K^+ каналов приводит к гиперполяризации и выходу Cl^- и осмотически зависимой воды. Это как раз и является случаем эритроцитов млекопитающих с $E_m \sim E_{Cl} = [Cl^-]_{iN} \sim -10$ mV. В этих клетках, стимулы, повышающие $[Ca^{2+}]_i$, резко увеличивает K^+ проводимость через активацию IK_{Ca} каналов, которые, в свою очередь, приводят к клеточному сжатию и так называемому эриптозу (Schneider et al. 2007). В отличие от

этого, в клетках с $[Cl^-]_i < [Cl^-]_{iN}$, активация Cl^- каналов приводит к клеточному набуханию. Важно отметить, что вместе с ионными каналами, $[Cl^-]_i$ находится под контролем электронейтральных котранспортёров $Na^+, K^+, 2Cl^-$ и K^+, Cl^- , чья экспрессия и активность изменяются при действии различных гормонов и нейротрансмиттеров, а также контролируется объёмом клеток (Gamba 2005).

Второе, апоптотический стимул различной природы оказывают различное влияние на активность транспортирующих систем, контролирующую объём клеток. В самом деле, мы обнаружили, что в отличие от устранения ростовых факторов, E1A-VSMC клетки, обработанные другим классическим триггером апоптоза - стауроспорином - уменьшили свой объём ~30% (**Рис. 28**). Это наблюдение соответствует уменьшению среднего объёма HeLa, U937 и NG108-15 клеток при действии стауроспорина, измеренному с помощью счётчика Культера (Maeno et al. 2000; Yurinskaya et al. 2005), обработанных стауроспорином мозжечковых грануловидных нейронов, у которых измерение объёма рассчитывали из площади поперечного сечения (Hernandez-Enriquez et al. 2010) и T24 клеток, где объём рассчитывался с помощью недавно разработанной методики негативного трансмиссионного контраста не проникающего через мембрану красителя с последующей трехмерной реконструкцией (Gregg et al. 2010).

Третье, уменьшение клеточного объёма, отмеченное в клетках, проходящих апоптоз, может быть, как минимум частично объяснено вторичными событиями, такими как пузырение плазматической мембраны и формирование апоптотических тел, а не первичным сжатием, запускаемым направленным наружу движением внутриклеточных осмолитов и осмотически связанной воды. Эта гипотеза поддерживается сравнительным анализом динамики изменения клеточного объёма и появлением биохимических и морфологических признаков апоптоза (Ohyama et al. 1981; Bortner and Cidlowski 1996; Bortner et al. 1997; l'Hoste et al.

2010;Feldenberg et al. 1999;Bortner and Cidlowski 1999;Hortelano et al. 2002;Bortner et al. 1997) (подробнее см. раздел 2.2).

В данном исследовании, мы преодолели эти проблемы, используя методику DISUR, разработанную в нашей лаборатории (Boudreault and Grygorczyk 2004) для одновременного измерения объёма и площади поверхности в одиночных прикреплённых клетках. Геометрия клеток, проходящих апоптоз, указывает на то, что упаковка изначального клеточного объёма в меньшие апоптотические тела требует либо уменьшения объёма или увеличения поверхности плазматической мембраны. Предполагая, что изначальная площадь поверхности клеток, проходящих апоптоз и полная площадь поверхности апоптотических тел равна, Nunez с коллегами заявил, что уменьшение объёма является геометрическим детерминантом клеток, разбирающихся на апоптотические тела (Nunez et al. 2010). Следует подчеркнуть, однако, что это предположение противоречит экспериментам, показывающим, что, из-за вставки внутриклеточных везикул, у ядерных клеток есть очень большие запасы плазматической мембраны, которые позволяют им увеличивать площадь плазматической мембраны и объёма в ~4- и 10-раз, соответственно, в отсутствие литических разрывов (Groulx et al. 2006). Мы наблюдали, что в моменты, соответствующие максимальному набуханию, поверхность E1A-VSMC клеток во время сывороточног голодания увеличивалась на $32 \pm 11\%$ ($n=7$; $p<0.02$).

Наши результаты показывают, что набухание предшествовало появлению апоптотических тел, увеличению активности каспазы-3, а также разрушению хроматина в E1A-VSMC клетках, лишенных ростовых факторов. Ранее было установлено, что ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы убаином подавляет апоптоз в E1A-VSMC через экспрессию Na^+ -чувствительных генов, включая морталин (Orlov et al. 1999c; Taurin et al. 2002b). Ингибирование этой модели апоптоза также наблюдалось при активации цАМФ-сигнальной системы β -адренергическими агонистами и

форсколином ингибирует апоптоз (Orlov et al. 1999b). Здесь, мы сообщаем, что убаин и форсколин упраздняют набухание при сывороточном голодании E1A-VSMC (**Рис. 26, Таблица 10**). Эти результаты, предполагают, что клеточное набухание может участвовать в запуске и/или развитии апоптоза. Эта гипотеза, однако, противоречит 2 следующим наблюдениям. (i) Мы не обнаружили никакого признака апоптоза в E1A-VSMC подверженных набуханию в гипоосмотической среде (**Таблица 11**). Следует подчеркнуть, однако, что из-за эффективного RVD, объём E1A-VSMC клеток в гипотоническом растворе был увеличен на 50% только временно и практически полностью нормализовался через 30 мин (**Рис. 29**), в то время как апоптозу предшествовало как минимум 30 минутное устойчивое набухание (**Рис. 26, Таблица 10**). (ii) Устойчивое сжатие, а не набухание наблюдалось в E1A-VSMC, проходящих апоптоз в присутствии стауроспорина (**Рис. 28**).

Для изучения того, участвует ли $30\pm 5\%$ сжатие, обнаруженное при действии стауроспорина (**Рис. 28**), в запуске и развитии апоптоза, мы измерили активность каспазы-3 и фрагментацию хроматина в E1A-VSMC клетках при изо- и гиперосмотическом сжатии. **Таблица 11** показывает, что ни временное уменьшение клеточного объёма, происходящее из-за переноса клеток из гипо- в изоосмотический раствор, ни изменение клеточного объёма на $24\pm 4\%$, запускаемое добавлением 150 мМ маннитола, ни привело к апоптозу E1A-VSMC. Резкое увеличение апоптоза было заметно через 24-ч после добавления 300 мМ маннитола, приводящего к уменьшению объёма E1A-VSMC клеток на $48\pm 5\%$ (**Таблица 11**). Это наблюдение соответствует предыдущим данным, показывающим, что увеличение осмолярности от 300 до 600-700 мОсм при добавлении маннитола, мочевины или NaCl привело к смерти клеток иммунной системы (Bortner and Cidlowski 1996; Orlov et al. 1999c), mIMCD3 линии эпителиальных клеток почек (Michea et al. 2000), HeLa клеток (Bilney and Murray 1998), D54-MG клеток человеческой глиомы

(Ernest et al. 2008) и эритроцитов (Lang et al. 2004). Следует отметить, однако, что похожее увеличение осмоляльности среды только незначительно увеличило апоптоз в SH-SY5Y клетках нейробластомы (Matthew and Feldman 1996) и не действовало на выживаемость VSMC, MDCK клеток (Orlov et al. 1996a; Orlov et al. 2004a), Cos-7, GH₃ и HeLa клеток (Bortner and Cidlowski 1996). Механизм, лежащий в основе различной чувствительности клеток к гиперосмотическому стрессу и их применимость к апоптозу при изоосмотическом состоянии, остаётся плохо изученным. Было предположено, что клетки, резистентные к апоптозу в гиперосмотической среде, быстро восстанавливают свой объём, запуская RVI (Bortner and Cidlowski 1996; Maeno et al. 2006b). Действительно, апоптотический стимул прекращает RVI, описанный в гиперосмотически сжатых клетках HeLa (Ernest et al. 2008; Subramanyam et al. 2010). Однако, и MDCK, и VSMC клетки, подвергнутые 2-кратному сжатию при добавлении 150 мМ маннитола, прекрасно выживали (Orlov et al. 2004a), не смотря на отсутствие сколько-нибудь значительного RVI (Koltsova et al. 2011). Недавние исследования, показали, что чувствительность клеток к гиперосмотическому стрессу обратно зависит от уровня экспрессии CD95 рецепторов (Reinehr and Haussinger 2007). Возможная роль пертурбации клеточного объёма в активации этих рецепторов в E1A-VSMC клетках при сывороточном голодании и действии стауроспорина должна быть изучена в дополнительных экспериментах.

5.3 Роль уменьшения объема в регуляции функционирования интерстициальных клеток эпителия почечных канальцев пуриnergическими рецепторами

Мы впервые показали, что продолжительная активация P2Y рецепторов приводит к сильному и длительному сжатию C11-MDCK клеток, физиологические характеристики которых близки к интеркалирующим клеткам эпителия дистального отдела нефрона. Запускаемые АТФ, изменения клеточного объёма опосредуются активацией карибдотоксин -, ибериотоксин - и паксиллин-чувствительных, Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов с высокой проводимостью и NPPВ-чувствительных анионных каналов. Следует отметить, что клеточное сжатие, обнаруженное нами, ответственно за некоторые физиологические последствия активации пуриnergических рецепторов. В самом деле, нами было установлено, что запускаемая АТФ экспрессия гена раннего ответа c-Fos полностью предотвращалась блокаторами K^+ и анионных каналов, которые участвуют в клеточном сжатии. Таким образом, клеточный объём может служить как ранее не замеченный сигнал/трансдуцирующий фактор в пуриnergической регуляции интерстициальных клеток. Рассмотрим это положение более подробно.

5.3.1. Сильное и продолжительное сжатие C11-MDCK клеток при действии АТФ/УТФ.

Существующая литература предполагает, что агонисты P2Y рецептора могут изменять клеточный объём в зависимости от типа клеток. Так, было замечено, что АТФ приводит к сжатию гепатоцитов и клеток асцитной опухоли Эрлиха (vom Dahl et al. 1991; Pedersen et al. 1998), но набуханию астроцитов мозга (Pedersen et al. 1998) (Takano et al. 2005). Не смотря на то, что изменения клеточного объёма могут иметь физиологическое значение,

особенно для почечных эпителиальных клеток, которые подвергаются частым изменениям клеточного объёма при анизосмотическом окружении, детальных исследований динамики клеточного объёма в ответ на АТФ не существует. Такая информация отсутствует отчасти из-за того, что нет надёжной неинвазивной методики для описания клеточного объёма в течение длительного периода времени. В этом исследовании, мы использовали разработанную в лаборатории доктора Григорчика методику DISUR для того, чтобы закрыть пробелы в нашем знании о влиянии пуринэргических рецепторов на объем эпителиальных клеток. С помощью этого метода мы впервые обнаружили, АТФ вызывает сильное и продолжительное сжатие C11-MDCK клеток изолированных из почек собаки и близких по своим параметрам интеркалированным клеткам из собирательных трубочек (**Рис. 30**). УТФ имело одинаковое с АТФ действие в запуске клеточного сжатия (**Рис. 32**), указывая на участие АТФ/УТФ-чувствительных P2Y рецепторов, активация которых запускает сигнальный каскад через взаимодействие с ГТФ-связывающими G-белками.

Роли рецепторов, связанных с G-белками в регуляции клеточного объёма посвящено значительное число исследований (Fisher et al. 2008; Franco et al. 2008; Franco et al. 2008). Так было установлено, что агонисты этих рецепторов, включая АТФ, могут оказывать влияние на объем клеток, ускорять восстановление клеточного объёма в условиях анизосмотической среды и влиять на активность ион-транспортирующих систем, принимающих участие в регуляции объема клетки (Mongin and Kimelberg 2005b; Tilly et al. 2010; Loveday et al. 2003; Franco et al. 2004; Tilly et al. 2010; Loveday et al. 2003; Franco et al. 2004). Так, например, было установлено, изменение клеточного объема мышечных фибробластов при действии с брадикинина (Ritter et al. 1992), крысиных гепатоцитов аргинин-вазопрессина (AVP), инсулина, глюкагона, аденозина и АТФ (vom Dahl et al. 1991; Hallbrucker et al. 1991; Hallbrucker et al. 1991), крысиных астроцитов при действии AVP и АТФ

(Takano et al. 2005; Del Bigio et al. 1992; Del Bigio et al. 1992), в крысиных гладкомышечных клетках сосудов при активации бета-адренергических рецепторов изопротеренолом (Orlov et al. 1996с), а в крысиных L6 миобластах при активации мускаринового рецептора ацетилхолином (Sen et al. 1995). Следует, однако, отметить, что во всех указанных выше случаях изменения клеточного объема не превышали $\pm 10-15\%$ от начальных значений. В этой связи $\sim 50\%$ сжатие, которое мы наблюдали в C11-MDCK клетках, было неожиданным и беспрецедентным. Такое сжатие было сравнимо или даже превышало клеточное сжатие, запускаемое гипертоническим раствором с 50% увеличением осмолярности (**Рис. 31**). Этот феномен, несомненно, должен иметь важное участие в физиологии почек, рассмотренное в разделе 5.3.3.

5.3.2. Клеточный механизм, служащий связывающим звеном при АТФ-индуцируемом клеточном сжатии

В предыдущих работах было установлено, что C11-MDCK клетки экспрессируют мРНК, кодирующие P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁ и P2Y₁₂ рецепторы (Акімова et al. 2006а). Основываясь на одинаковом действии АТФ и УТФ на клеточный объем C11-MDCK клеток, обнаруженный в данной работе (**Рис. 30 и 32**), можно предположить, что клеточное сжатие запускается P2Y₂ рецепторами, взаимодействующими с G_q/G₁₁ белками и обладающими одинаковым сродством к этим нуклеотидам (Burnstock 2007а). В самом деле, ни MRS2179 ни MRS2578, селективные антагонисты УТФ-чувствительных P2Y₁ и P2Y₆ рецепторов, не влияли на клеточное сжатие клеток, в то время как сурамин - антагонист широкого спектра пуринергических рецепторов, включая P2Y₂, P2Y₄ и P2Y₁₁, полностью блокировал прирост Ca²⁺_i и клеточное сжатие, запускаемые АТФ и УТФ (**Таблица 14**).

Активация G_q/G_{11} -связанных $P2Y$ рецепторов, включая $P2Y_2$, ведёт к стимуляции фосфолипазы $C-\beta$, 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 РКС изоформ. В наших экспериментах, хелатирование $[Ca^{2+}]_i$ с помощью ВАРТА-АМ полностью устраняло действие эффект АТФ на клеточный объём (**Таблица 13**). Мы также обнаружили, что сжатие C11-MDCK клеток может быть вызвано добавками Ca^{2+} ионофора иономицина и активатора DAG-зависимых изоформ РКС 4β -РМА (**Рис. 33**). Действие 4β -РМА и иономицина на объём C11-MDCK клеток были аддитивными (**Рис. 33**), а их комбинация привела примерно к такому же сжатию клеток, как и в присутствии АТФ/УТФ (**Таблица 12**). Действие 4β -РМА на клеточный объём резко уменьшалось при добавлении хелаторов Ca^{2+}_i (**Таблица 13**), указывая на участие Ca^{2+} -чувствительных, DAG-зависимых изоформ РКС. Похожий механизм, включающий Ca^{2+} -чувствительных, DAG-зависимых изоформ изоформы РКС α и РКС β I был ранее показан в случае активации АТФ объём-чувствительных ионных каналов астроцитов (Rudkouskaya et al. 2008).

A priori, АТФ-индуцированное клеточное сжатие должно быть обусловлено значительной Ca^{2+} -зависимой потерей внутриклеточных осмолитов. В самом деле, разрушение трансмембранного ионного градиента, происходящее при переносе C11-MDCK клеток в похожую на внутриклеточную ионную среду, полностью устраняло действие АТФ на клеточный объём (**Рис. 35**). Мы также обнаружили, что добавление АТФ вызывало уменьшение содержания внутриклеточного K^+ и Cl^- на ~35% и ~40%, соответственно (**Таблица 16**). Следует отметить, что потеря внутриклеточного K^+ и Cl^- представляется недостаточной для полного объяснения уменьшения клеточного объема на 55-60%. В этой связи, можно

предположить, что АТФ/УТФ-индуцированное сжатие также ассоциировано с потерей внутриклеточных органических осмолитов, обнаруженном в других исследованиях (Lang et al. 1998a; Hoffmann et al. 2009).

MDCK клетки экспрессируют несколько типов Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов, включая VK_{Ca} и IK_{Ca} , а также Cl^- каналы, ингибируемые NPPB (Lang and Paulmichl 1995; Bourcier et al. 2002; Bourcier et al. 2002). Pacha с коллегами наблюдали, что апикальная мембрана интеркалированных клеток высоко изобилуют VK_{Ca} в сравнении с главными (principal) клетками собирающих канальцев, ответственных за гормональную регуляцию водно-солевого гомеостаза в дистальном отделе нефрона (Pacha et al. 1991). В данном исследовании, мы обнаружили, что АТФ-индуцированное сжатие похоже на интеркалированные C11-MDCK клетки полностью подавлялось ингибиторами VK_{Ca} и бериотоксином и паксилином, также как и NPPB и не селективным блокатором $\text{VK}_{\text{Ca}}/\text{IK}_{\text{Ca}}$ карибдотоксином, в то время как ингибитор IK_{Ca} клотримазол существенного влияния не оказывал (**Таблица 15**). Паксиллин, ибериотоксин, карибдотоксин и NPPB также предотвратили потерю внутриклеточного K^+ and Cl^- (**Таблица 16**). Эти результаты говорят о том, что VK_{Ca} и NPPB-чувствительные анионные каналы играют ключевую роль в потере K^+ и Cl^- и сжатии клеток при действии АТФ (**Рис. 37**). Следует подчеркнуть, однако, что из-за, плохо изученной фармакологии ионных каналов и P2Y эпителиальных клеток собаки и возможные побочные эффекты выше описанных соединений, для окончательной проверки предложенной модели необходимо провести более детальное исследование дозовой зависимости действия указанных выше соединений, а также эксперименты с использованием siRNA с целью избирательного нокдауна белков-мишеней.

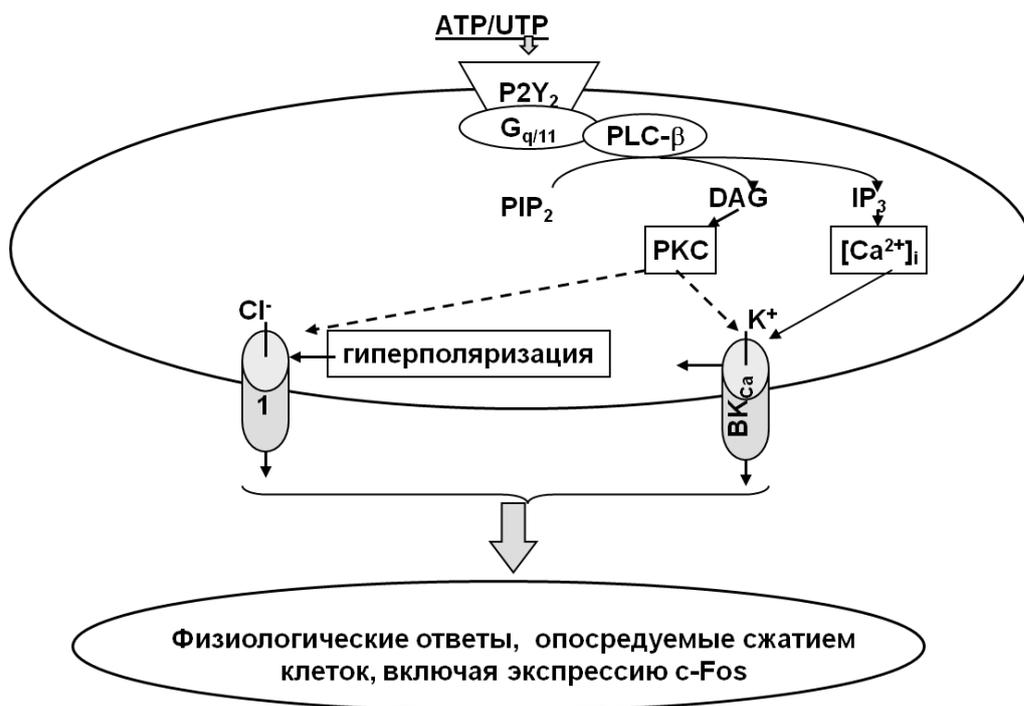


Рис. 37. Механизм сжатия клеток эпителия почечных канальцев при активации P2Y₂ рецепторов

5.3.3. Физиологические значения АТФ-индуцированных изменений клеточного объёма

Для выяснения физиологического значения клеточного сжатия, вызванного активацией пуриnergических рецепторов, мы изучили его связь с активацией экспрессии c-Fos, который принадлежит супер-семейству генов раннего ответа. Мы обнаружили, что 30 мин инкубация с АТФ приводит к увеличению в ~5-раз содержания иммунореактивного c-Fos белка (**Рис. 36**). Этот эффект АТФ сильно уменьшался при добавлении карибдотоксина и полностью устранялся добавкой NPPB. Так как эти ингибиторы ионных каналов устраняли АТФ-индуцированное сжатие клеток, полученные данные указывают на ключевую роль клеточного сжатия в активации транскрипция c-Fos и проведения сигналов, опосредованных c-Fos-чувствительными генами позднего ответа. Такая связь может встречаться в почках, например, во время действия на интерстициальные клетки, выступающих на большее

расстояние в просвет почечных канальцев по отношению к главным (principal) клеткам, таких стимулов как механическое раздражение и трансэпителиальные пульсовые колебания давления, которые, как было показано, приводит к массивному выбросу АТФ и УТФ с апикальной и базолатеральной поверхностей эпителиального монослоя клеток (Burnstock 2007a). В самом деле, недавно, используя клетки, нагруженные кальцеином, Holtzclaw с коллегами показали, что 30-мин воздействие механического стресса приводит к сжатию C11-MDCK клеток, которое исчезало при Ca^{2+}_i -истощении, ингибировании K^+ каналов и значительно уменьшалось в клетках, подвергнутых воздействию $ВK_{Ca}-\beta 4$ siRNA (Holtzclaw et al. 2010). Рассматривая эти данные в совокупности с результатами наших исследований, мы предполагаем, что пуринергические сигналы, запускаемые аутокринным выбросом АТФ/УТФ, участвуют в сжатии интерстициальных клеток и в увеличении интралюминального диаметра, запускаемые механическими стимулами. Эта гипотеза согласуется с ингибированием Ca^{2+}_i сигналинга, провоцируемого трансэпителиальными пульсовыми колебаниями давления в монослоях поляризованных MDCK клеток, при разрушении внеклеточного АТФ апиразой и добавлении неспецифического антагониста P2X и P2Y рецепторов сурамина (Praetorius et al. 2005). Учитывая роль P2Y₂ рецепторов в проведении сигналов, запускаемых в интерстициальных клетках добавками АТФ и УТФ (Akimova et al. 2006a), мыши, лишённые P2Y₂ рецепторов должны быть исследованы для изучения роли пуринергических сигналов в функционировании интерстициальных клеток в условиях механическим стресса *in vivo*.

6. Заключение

В предыдущих исследованиях было установлено, что длительная инкубация с убаином и другими CTS, ингибирующими Na^+, K^+ -АТФазу, не влияет на жизнеспособность клеток гладкой мускулатуры сосудов крысы (VSMC), но вызывает нарушение целостности плазматической мембраны и смерть C11-MDCK клеток. В этой связи, в первой части нашей работы мы применили уникальную методику DISUR, разработанную в Научно-исследовательском центре университета г. Монреаль, для сравнения влияния убаина на объем VSMC и C11-MDCK клеток. Наши результаты показывают, что разрыв плазматической мембраны в C11-MDCK клетках под действием убаина не является прямым следствием клеточного набухания, запускаемого ингибированием Na^+, K^+ -АТФазы и инверсией соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$.

Во второй части нашей работы мы обнаружили разнонаправленное изменение клеточного объёма (набухание *vs.* сжатие) в E1A-VSMC клетках, претерпевающих апоптоз, вызываемый отсутствием ростовых факторов и стауроспорином. Эти данные показывают, что клеточное сжатие не может считаться универсальным маркёром апоптоза. Мы также обнаружили, что ни набухание, ни сжатие, обнаруженное при отсутствии ростовых факторов и добавки стауроспорина, соответственно, не являются достаточным условием для генерации сигнала, приводящего к смерти клеток.

В третьей части работы нами с использованием техники DISUR, было впервые описано сильное и устойчивое во времени сжатие C11-MDCK клеток, являющихся культуральной моделью интеркалирующих клеток собирательных канальцев почек, в ответ на стимуляцию P2Y пуриnergических рецепторов. Нами установлено, что клеточное сжатие опосредуется увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и активацией Ca^{2+} -чувствительных изоформ протеинкиназы C, которые, в свою очередь, запускают массовый выход K^+ и Cl^- через Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы BK_{Ca} и NPPB-

чувствительные анионные каналы, соответственно. Мы также показали, что клеточное сжатие принимает участие в пуриnergической регуляции экспрессии гена раннего ответа c-Fos. Таким образом, уменьшение клеточного объёма может служить ранее неизвестным сигнальным фактором в пуриnergической регуляции функций клеток эпителия почечных канальцев.

1. Каков механизм активации экспрессии гена раннего ответа c-Fos при сжатии клеток и каковы функциональные последствия этого явления?
2. Каков механизм тканеспецифического действия убаина на жизнеспособность клеток?
3. Каков механизм нарушения целостности плазматической мембраны клеток эпителия почечных канальцев при действии CTS, не являющейся прямым следствием ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы, инверсии соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ и увеличения объема клеток?
4. Каково относительное участие ион-транспортирующих систем клетки в разнонаправленном изменении их объема при действии индукторов клеточной смерти?

Мы надеемся, что ответы на эти вопросы, имеющие первоочередное физиологическое и патофизиологическое значение, будут получены в ближайших исследованиях.

7. 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 $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. 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 стауроспорин - 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 P2Y_2 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 Ca^{2+} , активацией Ca^{2+} -чувствительных изоформ протеинкиназы C, потерей калия и хлора и устраняется при

действии ингибиторов анионных каналов и Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов высокой проводимости.

5. Активация P2Y_2 рецепторов сопровождается увеличением экспрессии гена раннего ответа *c-Fos*, которая подавлялась ингибиторами как Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов высокой проводимости, так и анионных каналов. Эти данные свидетельствуют о важной роли регуляции клеточного объема в функционировании клеток эпителия почечных канальцев.

Считаю своим приятным долгом выразить благодарность моим научным руководителям д.б.н. проф. Георгию Владимировичу Максимову и д.б.н. проф. Сергею Николаевичу Орлову за постоянное внимание и готовность поделиться своими знаниями при планировании экспериментов и в ходе анализе полученных результатов. Я также хочу выразить благодарность сотрудникам биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова д.б.н. С.В. Котелевцеву, к.б.н. С. Кольцовой и к.б.н. О.А. Акимовой, а также сотрудникам Научно-исследовательского центра ун-та г. Монреаль Ричарду Григорчику за методическую помощь и моральную поддержку при выполнении моей диссертационной работы. Особая благодарность моим оппонентам д.б.н. проф. В.П. Зинченко и д.м.н. проф. В.Г. Пинелис, а также д.б.н. Н. Я. Орлову, подготовившему отзыв ведущей организации, за детальное ознакомление с диссертацией и сделанные замечания.

Работа была выполнена при финансовой поддержке the Canadian Institutes for Health Research, the Kidney Foundation of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Canada, Российского фонда фундаментальных исследований и Федеральной целевой программы 2009-2013 «Исследовательские и преподавательские ресурсы инновационной России».

8. Список литературы

- Akimova OA, Bagrov AY, Lopina OD, Kamernitsky AV, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 2005a. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent signaling in C7-MDCK cells. *J Biol Chem* 280:832-839.
- Akimova OA, Grygorczyk A, Bunday RA, Bourcier N, Gekle M, Insel PA, Orlov SN. 2006a. Transient activation and delayed inhibition of Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransport in ATP-treated C11-MDCK cells involve distinct P2Y receptor subtypes and signaling mechanisms. *J Biol Chem* 281:31317-31325.
- Akimova OA, Lopina OD, Hamet P, Orlov SN. 2005b. Search for intermediates of Na⁺,K⁺-ATPase-mediated [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent death signaling triggered by cardiotonic steroids. *Pathophysiology* 12:125-135.
- Akimova OA, Lopina OD, Rubtsov AM, Gekle M, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 2009. Death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence for p38 MAPK-mediated Na⁺/K⁺-independent signaling. *Apoptosis* 14:1266-1273.
- Akimova OA, Mongin AA, Hamet P, Orlov SN. 2006b. The rapid decline of MTT reduction is not a marker of death signaling in ouabain-treated cells. *Cell Mol Biol* 52 (No 8):71-77.
- Akimova OA, Pchejetski D, Hamet P, Orlov SN. 2006c. Modest intracellular acidification suppresses death signaling in ouabain-treated cells. *Pflugers Archiv* 451:569-578.
- Akimova OA, Poirier M, Kotelevtsev SV, Hamet P, Orlov SN. 2008. The death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence against anoikis occurrence. *Apoptosis* 13:670-680.
- Akimova OA, Tremblay J, Van Huysse JW, Hamet P, Orlov SN. 2010. Cardiotonic steroid-resistant α1-Na⁺,K⁺-ATPase rescues renal epithelial cells from the cytotoxic action of ouabain: evidence for a Na⁺/K⁺-independent mechanism. *Apoptosis* 15:55-62.
- Aksentsev SL, Mongin AA, Orlov SN, Rakovich AA, Kaler GV, Konev SV. 1994. Osmotic regulation of sodium pump in rat brain synaptosomes: the role of cytoplasmic sodium. *Brain Res* 644:1-6.
- Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sékaly R-P. 1990. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190:1879-1890.
- Alfieri RR, Cavazzoni A, Petronini PG, Bonelli MA, Caccamo AE, Borghetti AF, Wheeler KP. 2002. Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect them from apoptosis. *J Physiol* 540:499-508.
- Alvarez-Leefmans FJ, Gamino SM, Reuss L. 1992. Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspera* neurones. *J Physiol* 458:603-619.
- Andersen LK, Contera SA, Justesen J, Duch M, Hansen O, Chevallier J, Foss M, Pedersen FS, Besenbacher F. 2005. Cell volume increase in murine MC3T3-E1 pre-osteoblasts attaching onto

- biocompatible tantalum observed by magnetic AC mode atomic force microscopy. *Eur Cell Mater* 10:61-68.
- Aperia A. 2007. New roles for an old Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 261:44-52.
- Armstrong CM. 2003. The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6257-6262.
- Arrebola F, Canizares J, Cubero MA, Crespo PV, Warley A, Fernandez-Segura E. 2005. Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine-induced apoptosis. *Apoptosis* 10:1317-1331.
- Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. 1995. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res* 217:410-418.
- Barros LF, Hermosilla T, Castro J. 2001. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol Part A* 130:401-409.
- Beauvais F, Michel L, Dubertret L. 1995. Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. *J Leuc Biol* 57:851-855.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. 1995. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ Res* 77:266-273.
- Benson RSP, Heer S, Dive C, Watson AJM. 1996. Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. *Am J Physiol* 270:C1190-C1203.
- Bezanilla F. 2008. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:323-332.
- Bilney AJ, Murray AW. 1998. Pro- and anti-apoptotic effects of K⁺ in HeLa cells. *FEBS Letters* 424:221-224.
- Blaustein MP, Lederer WJ. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854.
- Bolivar JJ, Lazaro A, Fernandez S, Stefani E, Pena-Cruz V, Lechene C, Cereijido M. 1987. Rescue of a wild-type MDCK cell by a ouabain-resistant mutant. *Am J Physiol* 253:C151-C161.
- Bortner CD, Cidlowski JA. 1996. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol* 271:C950-C961.
- Bortner CD, Cidlowski JA. 1998. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol* 56:1549-1559.
- Bortner CD, Cidlowski JA. 1999. Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 274:21953-21962.
- Bortner CD, Cidlowski JA. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 462:176-188.

- Bortner CD, Cidlowksi JA. 2011. Life and death of lymphocytes: a volume regulation affair. *Cell Physiol Biochem* 28:1079-1088.
- Bortner CD, Hughes FM, Cidlowksi JA. 1997. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272:32436-32442.
- Bortner CD, Sifre MI, Cidlowksi JA. 2008. Cationic gradient reversal and cytoskeleton-independent volume regulatory pathways define an early stage of apoptosis. *J Biol Chem* 283:7219-7229.
- Boudreault F, Grygorczyk R. 2002. Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol* 282:C219-C226.
- Boudreault F, Grygorczyk R. 2004. Evaluation of rapid volume changes of substrate-adherent cells by conventional microscopy 3D imaging. *J Microscopy* 215:302-312.
- Bourcier N, Grygorczyk R, Gekle M, Berthiaume Y, Orlov SN. 2002. Purinergic-induced ion current in monolayers of C7-MDCK cells: role of basolateral and apical ion transporters. *J Membr Biol* 186:131-143.
- Bowens NH, Dohare P, Kuo YH, Mongin AA. 2013. DCPIB, the proposed selective blocker of volume-regulated anion channels, inhibits several glutamate transport pathways in glial cells. *Mol Pharmacol* 83:22-32.
- Bozeat ND, Xiang SY, Ye LL, Duan ML, Burkin DJ, Lamb FS, Duan DD. 2011. Activation of volume regulated chloride channels protects myocardium from ischemia/reperfusion damage in second-window ischemic preconditioning. *Cell Physiol Biochem* 28:1265-1278.
- Brandts JF, Taverna RD, Salasivan E, Lysko KA. 1978. Calorimetric studies of structural transitions of human erythrocyte membrane. Studies of B and C transitions. *Biochim Biophys Acta* 512:566-578.
- Brindikova TA, Bourcier N, Torres B, Pchejetski D, Gekle M, Maximov GV, Montminy V, Insel PA, Orlov SN, Isenring P. 2003. Purinergic-induced signaling in C11-MDCK cells inhibits the secretory Na-K-Cl cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1445-C1453.
- Browe DM, Baumgarten CM. 2004. Angiotensin II (AT1) receptors and NADH oxidase regulate Cl⁻ current elicited by beta1 integrin stretch in rabbit ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 124:273-287.
- Browe DM, Baumgarten CM. 2006. EGFR kinase regulates volume-sensitive chloride current elicited by integrin stretch via Pi-3K and NADH oxidase in ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 127:237-251.
- Brown A, Lasek RJ. 1993. Neurofilaments move apart freely when released from the circumferential constrain of the axonal plasma membrane. *Cell Motil Cytoskeleton* 26:313-324.
- Burg MB. 1995. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268:F983-F996.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87:1441-1474.

- Burg MB, Kwon ED, Kultz D. 1997. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59:437-455.
- Burnstock G. 2006a. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.
- Burnstock G. 2006b. Vessel tone and remodeling. *Nature Med* 12:16-17.
- Burnstock G. 2007a. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659-797.
- Burnstock G. 2007b. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471-1483.
- Callies C, Fels J, Liashkovich I, Kliche K, Jeggle P, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. 2011. Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 124:1936-1942.
- Cannon CL, Basavappa S, Strange K. 1998. Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 275:C416-C422.
- Carini R, Alchera E, Cesaris MG, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G, Albono E. 2006. Purinergic P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J Hepatol* 45:236-245.
- Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. 1999. Alteration of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 248:280-293.
- Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E. 1995. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 206:180-185.
- Chamberlin ME, Strange K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol* 257:C159-C173.
- Cheung CKY, Ko BCB. 2013. NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress - regulations and functional significance. *J Mol Signal* 8:5.
- Churchwell KB, Wright SH, Emma F, Rosenberg PA, Strange K. 1996. NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling by veratridine-stimulated Na⁺ influx in cortical cultures. *J Neurosci* 16:7447-7457.
- Colclasure GC, Parker JC. 1991. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal in dog red cells. *J Gen Physiol* 98:881-892.
- Colclasure GC, Parker JC. 1992. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced K,Cl cotransport in dog red cells. *J Gen Physiol* 100:1-10.
- Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ, Appel SH. 1998. Role of potassium in amyloid-induced cell death. *J Neurochem* 70:1925-1934.
- Columbano A. 1995. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 58:181-190.

Contreras RG, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Shoshani L, Flores-Benitez D, Larre I, Cereijido M. 2004. Ouabain binding to Na⁺,K⁺-ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus. *J Membr Biol* 198:147-158.

Contreras RG, Lazaro A, Mujica A, Gonzalez-Mariscal L, Valdes J, Garcia-Villegas MR, Cereijido M. 1995. Ouabain resistance of the epithelial cell line (Ma104) is not due to lack of affinity of its pumps for the drug. *J Membr Biol* 145:295-300.

Contreras RG, Shoshani L, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Cereijido M. 1999. Relationship between Na⁺,K⁺-ATPase and cell attachment. *J Cell Sci* 112:4223-4232.

Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. 1990. Cell death via apoptosis and its relation to growth, development and differentiation of both tumor and normal cells. *Cancer Res* 10:1153-1160.

Davis A, Hogarth K, Fernandes D, Solway J, Niu J, Kolenko V, Browning D, Miano JM, Orlov SN, Dulin NO. 2003. Functional significance of protein kinase A (PKA) activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA. *Cell Signaling* 15:597-604.

Del Bigio MR, Fedoroff S, Qualtiere LF. 1992. Morphology of astroglia in colony cultures following transient exposure to potassium ion, hypoosmolarity and vasopressin. *J Neurocytol* 21:7-18.

Di Ciano-Oliveira C, Thirone ACP, Szaszi K, Kapus A. 2006. Osmotic stress and the cytoskeleton: the R(h)ole of Rho GTPases. *Acta Physiol* 187:257-272.

Dierkes PW, Wüstern HJ, Klees G, Müller A, Horchstrate P. 2006. Ionic mechanism of ouabain-induced swelling of leech Retzuis neurons. *Pflugers Archiv* 452:25-35.

Drewnowska K, Baumgarten CV. 1991. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am J Physiol* 260:C122-C131.

Dubois J-M, Rouzaire-Dubois B. 2012. Roles of cell volume in molecular and cellular biology. *Prog Biophys Mol Biol* 108:93-97.

Duvall E, Wyllie AH. 1986. Death and the cell. *Immunol Today* 7:115-119.

Eduardsen K, Larsen SL, Novak I, Lambert IH, Hoffmann EK, Pedersen SF. 2011. Cell volume regulation and signaling in 3T3-L1 pre-adipocytes and adipocytes: on the possible role of caveolae, insulin receptors, FAK and ERK1/2. *Cell Physiol Biochem* 28:1231-1246.

Egan TM, Samways DSK, Li Z. 2006. Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 452:501-512.

El-Gharbawy AH, Nadig VS, Kotchen JM, Grim CE, Sagar KB, Kaldunski M, Hamet P, Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Kotchen TA. 2001. Arterial pressure, left ventricular mass, and aldosterone in essential hypertension. *Hypertension* 37:845-850.

Elliott JI, Higgins CF. 2003. IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Reports* 4:189-194.

- Ernest NJ, Habela CW, Sontheimer H. 2008. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. *J Cell Sci* 121:290-297.
- Falciola J, Volet B, Anner RM, Moosmayer M, Lacotte D, Anner BM. 1994. Role of cell membrane Na,K-ATPase for survival of human lymphocytes in vivo. *Biosci Rep* 14:189-204.
- Feldenberg IR, Thevannanther S, del Rio M, de Leon M, Devarajan P. 1999. Partial ATP depletion induces Fas- and caspase-mediated apoptosis in MDCK cells. *Am J Physiol* 276:F837-F846.
- Fels J, Orlov SN, Grygorczyk R. 2009. The hydrogel nature of mammalian cytoplasm contributes to osmosensing and extracellular pH sensing. *Biophys J* 96:4276-4285.
- Fisher SK, Cheema TA, Foster DJ, Heacock AM. 2008. Volume-dependent osmolyte efflux from neuronal tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J Neurochem* 106:1998-2014.
- Franco R, Panayiotidis MI, de La Paz LD. 2008. Autocrine signaling involved in cell volume regulation: the role of released transmitters and plasma membrane receptors. *J Cell Physiol* 216:14-28.
- Franco R, Rodriguez R, Pasantes-Morales H. 2004. Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 449:159-169.
- Fulton AB. 1982. How crowded is cytoplasm. *Cell* 30:345-347.
- Gagnon F, Dulin NO, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 1999a. ATP-induced inhibition of Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: lack of involvement of known purinoceptor-coupled signaling pathways. *J Membrane Biol* 167:193-204.
- Gagnon F, Hamet P, Orlov SN. 1999b. Na⁺,K⁺ pump and Na⁺-coupled ion carriers in isolated mammalian kidney epithelial cells: regulation by protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol* 77:305-319.
- Gagnon F, Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. 1998. Complete inhibition of Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransport in Madin-Darby canine kidney cells by PMA-sensitive protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1369:233-239.
- Gamba G. 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85:423-493.
- Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S. 1994. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Archiv* 428:157-162.
- Gilles R. 1988. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control. *Renal Physiol Biochem* 11:277-288.
- Gillespie PG, Walker RG. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413:194-202.

- Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. 2000. Protein kinase C (PKC) inhibits Fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. *J Biol Chem* 275:19609-19619.
- Gottlieb RA, Dosanjih A. 2001. Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3587-3591.
- Granitzer M, Mountian I, De Smet P, Van Driessche W. 1994. Effect of ouabain on membrane conductances and volume in A6 cells. *Renal Physiol Biochem* 17:223-231.
- Gregg JL, McGuire KM, Focht DC, Model MA. 2010. Measurement of the thickness and volume of adherent cells using transmission-through-dye microscopy. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460:1097-1104.
- Groulx N, Boudreault F, Orlov SN, Grygorczyk R. 2006. Membrane reserves and hypotonic cell swelling. *J Membr Biol* 214:43-56.
- Grover WH, Bryan AK, Diez-Silva M, Suresh S, Higgins JM, Manalis SR. 2011. Measuring single-cell density. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10992-10996.
- Gulak PV, Orlov SN, Pokudin NI, Postnov YuV, Litvinov IS, Orlov NYu, Shnyrov VL. 1984. Microcalorimetry and electrophoresis of the erythrocyte membrane of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2:81-84.
- Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassmé H, Lang F. 2001. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol* 279:F605-F615.
- Gulbins E, Szabo I, Baltzer K, Lang F. 1997a. Ceramide-induced inhibition of T-lymphocyte voltage gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7661-7666.
- Gulbins E, Welsch J, Lepple-Wienhues A, Heinle H, Lang F. 1997b. Inhibition of Fas-induced apoptotic cell death by osmotic cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Commun* 236:517-521.
- Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. 2012. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 33:397-411.
- Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Haussinger D. 1991. Modification of liver cell volume by insulin and glucagon. *Pflugers Archiv* 418:519-521.
- Hamann S, Kiilgaard JF, Litman T, Alvarez-Leefmans FJ, Winther BR, Zeuthen T. 2002a. Measurement of cell volume changes by fluorescence. *J Fluoresc* 12:139-145.
- Hamann S, Kiilgaard JF, Litman T, Alvarez-Leefmans FJ, Winther BR, Zeuthen T. 2002b. Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. *J Fluoresc* 12:139-145.
- Hartee EI. 1972. Determination of protein content: a modification of the Lowry methods that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
- Haussinger D. 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 313:697-710.

- Haussinger D. 1998. Osmoregulation of liver cell function: signalling, osmolytes and cell heterogeneity. *Contrib Nephrol* 123:185-204.
- Haussinger D, Lang F. 1991a. Cell volume - a "second messenger" in the regulation of metabolism by amino acids and hormones. *Cell Physiol Biochem* 1:121-130.
- Haussinger D, Lang F. 1991b. Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanisms for metabolic control. *Biochim Biomed Acta* 1071:331-350.
- Haussinger D, Lang F. 1992. Cell volume and hormone action. *Trends Pharmacol Sci* 13:371-373.
- Haussinger D, Reinehr R. 2011. Osmotic regulation of bile acid transport, apoptosis and proliferation in rat liver. *Cell Physiol Biochem* 28:1089-1098.
- Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E, Okada Y. 1999. Swelling-induced, CFTR-dependent ATP-release from human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* 114:525-533.
- Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91:627-637.
- Hernandez-Enriquez B, Arelano RO, Moran J. 2010. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 167:298-311.
- Hoffmann EK. 2000. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem* 10:273-288.
- Hoffmann EK. 2011. Ion channels involved in volume regulation: effects of migration, proliferation, and programmed cell death in non adherent EAT cells and adherent ELA cells. *Cell Physiol Biochem* 28:1061-1078.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89:193-277.
- Hoffmann EK, Simonsen LO. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 69:315-382.
- Holtzclaw JD, Liu L, Grimm PR, Sansom SC. 2010. Shear stress-induced volume decrease of C11-MDCK cells by BK- α 4/ β 4. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F507-F516.
- Hortelano S, Garcia-Martin ML, Cerdan S, Castrillo A, Alvarez AM, Bosca L. 2001. Intracellular water motion decreases in apoptotic macrophages after caspase activation. *Cell Death Differ* 8:1022-1028.
- Hortelano S, Zeini M, Castrillo A, Alvarez AM, Bosca L. 2002. Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell Death Differ* 9:643-650.
- Hu VW, Heikka DS. 2000. Radiolabeling revisited: metabolic labeling with ³⁵S-methionine inhibits cell cycle progression, proliferation, and survival. *FASEB J* 14:448-454.

- Hua SX, Gottlieb PA, Heo J, Sachs F. 2010. A mechanosensitive ion channel regulation cell volume. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C1424-C1430.
- Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. 1997. Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272:30567-30576.
- Jackson PS, Churchwell K, Ballatori N, Boyer JL, Strange K. 1996. Swelling-activated anion conductance in skate hepatocytes: regulation by Cl^- and ATP. *Am J Physiol* 270:C57-C66.
- Jakab M, Furst J, gschwentner M, Botta M, Garavaglia M-L, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmuller S, Woll E, Chwatal S, Ritter M, Paulmichl M. 2002. Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem* 12:235-258.
- Janmey PA, Lindberg U. 2004. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:658-666.
- Jordan LB, Harrison DJ. 1999. Apoptosis: a distinctive form of cell death. In: Schunkert H, Riegger GAJ, editors. *Apoptosis in Cardiac Biology*. Boston-Dordrecht-London: Kluwer Academic Publishers.p 124-135.
- Kageyama K, Onoyama Y, Kogawa H, Goto E, Tanabe K. 1989. The maximum and minimum water content and cell volume of human erythrocytes in vitro. *Biophys Chem* 34:79-82.
- Kahle KT, Rinehart J, de los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP. 2005. WNK3 modulates transport of Cl^- in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16783-16788.
- Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orłowski J. 1994. Functional characterization of three isoforms of the Na^+/H^+ exchanger stably expressed in chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* 269:23544-23552.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kim W, Moon S-O, Sung MJ, Kim SH, Lee S, Kim J, Koh GY, Park SK. 2002. Protective effect of adrenomedullin in mannitol-induced apoptosis. *Apoptosis* 7:527-536.
- Kimelberg HK, Ransom BR. 1986. Physiological and pathophysiological aspects of astrocytic swelling. *Astrocytes* 3:129-166.
- Kirk K, Strange K. 1998. Functional properties and physiological roles of organic solute channels. *Annu Rev Physiol* 60:719-739.
- Koltsova SV, Akimova OA, Kotelevtsev SV, Grygorczyk R, Orlov SN. 2012a. Hyperosmotic and isosmotic shrinkage differentially affect protein phosphorylation and ion transport. *Can J Physiol Pharmacol* 90:209-217.
- Koltsova SV, Platonova A, Maksimov GV, Mongin AA, Grygorczyk R, Orlov SN. 2011. Activation of P2Y receptors causes strong and persistent shrinkage of C11-MDCK renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C403-C412.

- Koltsova SV, Trushina Y, Haloui M, Akimova OA, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 2012b. Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺-independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* 7:e38032.
- Korchev YE, Gorelik J, Laboratory MJ, Sviderskaya EV, Johnston CL, Coombes CR, Vodyanoy I, Edwards CR. 2000. Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy. *Biophys J* 78:451-457.
- Kozera L, White E, Calaghan S. 2009. Caveolae act as membrane reserves which limit mechamosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PLoS One* 4:e8312.
- Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, Kim H, Yuan JXJ. 2001. Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 280:C970-C979.
- Kroemer G, El-Diery WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Placentini M, Nagata S, Melino G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12:1463-1467.
- Krumschnabel G, Maehr T, Nawaz M, Schwarzbaum PJ, Manzl C. 2007. Staurosporine-induced cell death in salmonid cells: role of apoptotic volume decrease, ion fluxes and MAPK kinase signaling. *Apoptosis* 12:1755-1768.
- Kuang K, Yiming M, Zhu Z, Iserovich P, Diecke FP, Fischbarg J. 2006. Lack of threshold for anisotonic volume regulation. *J Membrane Biol* 211:27-33.
- Kunz L, Stark G. 1997. Photodynamic membrane damage at the level of single ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1327:1-4.
- l'Hoste S, Chargui A, Belfodil R, Corcelle E, Duranton C, Rubera I, Poujeol C, Mograbi B, Tauc M, Poujeol P. 2010. CFTR mediates apoptotic volume decrease and cell death by controlling glutathione efflux and ROS production in cultured mice proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F435-F453.
- Lang F, Busch G, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. 1998a. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78:247-306.
- Lang F, Busch GL, Völkl H. 1998b. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 8:1-45.
- Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205:147-157.
- Lang F, Gulbins E, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Huber SM, Duranton C, Lang KS, Lang PA, Wieder T. 2004. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 17:473-480.
- Lang F, Hoffmann EK. 2011. Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr Physiol* 2:2037-2061.

- Lang F, Lang KS, Wieder T, Myssina S, Birka C, Lang PA, Kaiser S, Kempe D, Duranton C, Huber SM. 2003a. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pfluger Arch - Eur J Physiol* 447:121-125.
- Lang F, Paulmichl M. 1995. Properties and regulation of ion channels in MDCK cells. *Kidney Int* 48:1200-1205.
- Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM. 2003b. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10:249-256.
- Lauf PK, Adragna NC. 2000. K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem* 10:341-354.
- Ledbetter ML, Young GJ, Wright ER. 1986. Cooperation between epithelial cells demonstrated by potassium transfer. *Am J Physiol* 250:C306-C313.
- Lefkowitz RJ. 2007. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol* 190:9-19.
- Lehtonen JVA, Kinnunen PKJ. 1995. Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys J* 68:1888-1894.
- Lewis R, Feetham CH, Barret-Jolley R. 2013. Cell volume regulation in chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* 28:1111-1122.
- Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, Moseley AE. 2007. Na,K-ATPase and the role of a isoforms in behaviour. *J Bioenerg Bioeng* 39:385-389.
- Loveday D, Heacock AM, Fisher SK. 2003. Activation of muscarinic cholinergic receptors enhances the volume-sensitive efflux of myo-inositol from SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 87:476-486.
- Macknight ADC, Leaf A. 1977. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev* 57:510-573.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9487-9492.
- Maeno E, Shimizu T, Okada Y. 2006a. Normotonic cell shrinkage induces apoptosis under extracellular low Cl conditions in human lymphoid and epithelial cells. *Acta Physiol* 187:217-222.
- Maeno E, Takahashi N, Okada Y. 2006b. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Letters* 580:6513-6517.
- Malek AM, Goss GG, Jiang L, Izumo S, Alper SL. 1998. Mannitol at clinical concentration activates multiple signaling pathways and induces apoptosis in endothelial cells. *Stroke* 29:2631-2640.
- Martinac B. 2011. Bacterial mechanosensitive channels as a paradigm for mechanosensory transduction. *Cell Physiol Biochem* 28:1051-1060.

- Matthew CC, Feldman EL. 1996. Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cell from hyperosmotic induced programmed cell death. *J Cell Physiol* 166:323-331.
- McFerrin MB, Turner KL, Cuddapah VA, Sontheimer H. 2012. Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 303:C1070-C1080.
- Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. 2000. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F209-F218.
- Minton AP. 1981. Excluded volume as determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biopolymers* 20:2093-2120.
- Minton AP, Colclasure GC, Parker JC. 1992. Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10504-10506.
- Moeckel GW, Zhang L, Chen X, Rossini M, Zent R, Pozzi A. 2013. Role of integrin $\alpha 1\beta 1$ in the regulation of renal medullary osmolyte concentration. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F223-F231.
- Mongin AA. 2007. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology* 14:183-193.
- Mongin AA, Aksentsev SL, Orlov SN, Fedulov AS, Mezen NI, Kvacheva ZV, Konev SV. 1996. Swelling-induced activation of $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransport in glial cells: kinetic properties and intracellular signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1285:229-236.
- Mongin AA, Aksentsev SL, Orlov SN, Slepko NG, Kozlova MV, Maximov GV, Konev SV. 1994. Swelling-induced K^+ influx in cultured primary astrocytes. *Brain Res* 651:110-114.
- Mongin AA, Cai Z, Kimelberg HK. 1999. Volume-dependent taurine release from cultured astrocytes requires permissive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and calmodulin. *Am J Physiol Cell Physiol* 277:C823-C832.
- Mongin AA, Kimelberg HK. 2002. ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol* 283:C569-C578.
- Mongin AA, Kimelberg HK. 2003. Is autocrine ATP release required for activation of volume-sensitive chloride channels? *J Neurophysiol* 90:2791-2792.
- Mongin AA, Kimelberg HK. 2005a. Astrocyte swelling in neuropathology. In: Kettenmann HO, Ranson BR, editors. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press. p 550-562.
- Mongin AA, Kimelberg HK. 2005b. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca^{2+} -sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C204-C213.
- Mongin AA, Orlov SN. 2001. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology* 8:77-88.

- Mullaney PF, Dean PN. 1970. The small angle light scattering of biological cells. Theoretical consideration. *Biophys J* 10:764-772.
- Muscella A, Elia MG, Greco S, storelli C, Marsigliante S. 2003. Activation of P2Y receptor induces c-FOS protein through a pathway involving mitogen-activated protein kinases and phosphoinositide 3-kinases in HeLa cells. *J Cell Physiol* 195:234-240.
- Nakahari T, Murakami M, Yoshida H, Miyamoto M, Sohma Y, Imai Y. 1990. Decrease in rat submandibular acinar cell volume during ACh stimulation. *Am J Physiol* 258:G878-G886.
- Nasuhoglu C, Feng S, Mao Y, Shammatt I, Yamamoto M, Earnest S, Lemmon M, Hilgemann DW. 2002. Modulation of cardiac PIP2 by cardioactive hormones and other physiologically relevant interventions. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C223-C234.
- Nielsen DK, Jensen AK, Harbak H, Christensen SC, Simonsen LO. 2007. Cell content of phosphatidylinositol (4,5)biphosphate in Ehrlich mouse ascites tumour cells in response to cell volume perturbations in anisotonic and isosmotic media. *J Physiol* 582:1027-1036.
- Nilius B, Droogmans G. 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81:1415-1459.
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J, Droogmans G. 1998. Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelium cells. *J Physiol* 506:353-361.
- Nobel CSI, Aronson JK, van den Dobbelsteen DJ, Slater AFG. 2000. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis* 5:153-163.
- Nukui M, Shimizu T, Okada Y. 2006. Normotonic cell shrinkage induced by Na⁺-deprivation results in apoptotic cell death in human epithelial HeLa cells. *J Physiol Sci* 56:335-339.
- Nunez R, Sancho-Martinez SM, Novoa JML, Lopez-Hernandez FJ. 2010. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death Differ* 17:1665-1671.
- O'Neil RG, Heller S. 2005. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 451:193-203.
- O'Neill WC. 1999. Physiological significance of volume-regulated transporters. *Am J Physiol* 276:C995-C1011.
- Oberleithner H, de Wardener HE. 2011. Sodium: A wolf in sheep's clothing. *Blood Purif* 31:82-85.
- Ohyama H, Yamada T, Watanabe I. 1981. Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes. *Radiat Res* 85:333-339.
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532:3-16.

- Olson JE, Alexander C, Feller FA, Clayman ML, Ramnath EM. 1995. Hyposmotic volume regulation of astrocytes in elevated extracellular potassium. *J Neurosci Res* 40:333-342.
- Orlov SN. 1994. Ion transport across erythrocyte membrane: mechanisms and volume-dependent regulation. *Sov Sci Rev F Physiol Gen Biol* 8:1-48.
- Orlov SN. 2007. On the history of ecto-ATPases: the role of W.A.Engelhardt. *Purinergic Signaling* 3:231-232.
- Orlov SN, Dam TV, Tremblay J, Hamet P. 1996a. Apoptosis in vascular smooth muscle cells: role of cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Commun* 221:708-715.
- Orlov SN, Dulin NO, Gagnon F, Gekle M, Douglas JG, Schwartz JH, Hamet P. 1999a. Purinergic regulation of Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport and MAP kinases is limited to C11-MDCK cells resembling intercalated cells from collecting ducts. *J Membrane Biol* 172:225-234.
- Orlov SN, Hamet P. 2006. Intracellular monovalent ions as second messengers. *J Membr Biol* 210:161-172.
- Orlov SN, Kolosova IA, Cragoe EJ, Gurlo TG, Mongin AA, Aksentsev SL, Konev SV. 1993. Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-dependent Na/H exchange, Na,K,2Cl cotransport and K,Cl cotransport in rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1151:186-192.
- Orlov SN, Kuznetsov SR, Kolosova IA, Aksentsev SL, Konev SV. 1997. Volume-dependent regulation of ion transporters in human and rat erythrocytes: role of cytoskeleton and protein phosphorylation. *Russian Physiol J* 83 (No5-6):119-147.
- Orlov SN, Pchejetski D, Taurin S, Thorin-Trescases N, Maximov GV, Pshezhetsky AV, Rubin AB, Hamet P. 2004a. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism. *Apoptosis* 9:55-66.
- Orlov SN, Platonova AA, Hamet P, Grygorczyk R. 2013. Cell volume and monovalent ion transporters: their role in the triggering and progression of the cell death machinery. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:C361-C372.
- Orlov SN, Pokudin NI, Kotelevtsev YuV, Gulak PV. 1989. Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes. *J Membrane Biol* 107:105-117.
- Orlov SN, Taurin S, Tremblay J, Hamet P. 2001. Inhibition of Na^+ , K^+ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio: possible implication in vascular remodeling. *J Hypertens* 19:1559-1565.
- Orlov SN, Thorin-Trescases N, Dulin NO, Dam T-V, Fortuno MA, Tremblay J, Hamet P. 1999b. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase 3. *Cell Death Differ* 6:661-672.
- Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P. 1999c. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 274:16545-16552.

- Orlov SN, Thorin-Trescases N, Pchejetski D, Taurin S, Farhat N, Tremblay J, Thorin E, Hamet P. 2004b. Na⁺/K⁺ pump and endothelial cell survival: [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of [Na⁺]_i. *Pflugers Archiv* 448:335-345.
- Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. 1996b. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport. *J Membrane Biol* 153:125-135.
- Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. 1996c. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport. *Am J Physiol* 270:C1388-C1397.
- Orlowski J, Grinstein S. 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Archiv* 447:549-565.
- Pacha J, Frindt G, Sackin H, Palmer LG. 1991. Apical maxi K channels in intercalated cells of CCT. *Am J Physiol* 261:F696-F705.
- Panayiotidis MI, Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. 2010. Ouabain-induced perturbations in intracellular ionic homeostasis regulate death receptor-mediated apoptosis. *Apoptosis* 15:834-849.
- Papakonstanti EA, Vardaki EA, Stounaras C. 2000. Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 10:257-264.
- Parker JC. 1993. In defense of cell volume? *Am J Physiol* 265:C1191-C1200.
- Parshina EY, Yusipovich AI, Platonova AA, Grygorczyk R, Maksimov GV, Orlov SN. 2013. Thermal inactivation of volume-sensitive K⁺,Cl⁻ cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 465:977-983.
- Pchejetski D, Taurin S, der Sarkissian S, Lopina OD, Pshezhetsky AV, Tremblay J, DeBlois D, Hamet P, Orlov SN. 2003. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio. *Biochem Biophys Res Commun* 301:735-744.
- Pedarzani P, Stocker M. 2008. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65:3196-3217.
- Pedersen SF, Nilius B. 2007. Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation. *Methods Enzymol* 428:183-207.
- Pedersen SF, Pedersen S, Lambert IH, Hoffmann EK. 1998. P2 receptor-mediated signal transduction in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1374:94-106.
- Perry PB, O'Neill WC. 1993. Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am J Physiol* 265:C763-C769.
- Piper AS, Large WA. 2003. Multiple conductance states of single Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol* 547:181-196.

Platonova AA, Orlov SN, Grygorczyk R. 2013. Volume changes triggered by anisotonic media in intact and permeabilized cells: role of cytoskeleton network. *Bull Siberian Med* 12:-60.

Poulsen KA, Andersen EC, Hansen CF, Klausen TK, Hougaard C, Lambert IH, Hoffmann EK. 2010. Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: role of chloride channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:X14–X25.

Praetorius HA, Frokier J, Leipziger J. 2005. Transepithelial pressure pulses induce release in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F133-F141.

Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y. 2007. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 14:1295-1304.

Rayment SJ, Latif ML, Ralevic V, Alexander SPH. 2007. Evidence for the expression of multiple uracil nucleotide-stimulated P2 receptors coupled to smooth muscle contraction in porcine isolated arteries. *Br J Pharmacol* 150:604-612.

Reinehr R, Haussinger D. 2007. Hyperosmotic activation of the CD95 system. *Methods in Enzymology* 428:145-160.

Reuss L. 1985. Changes in cell volume measured with an electrophysiological technique. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6014-6018.

Ritter M, Woll E. 1996. Modification of cellular ion transport by Ha-ras oncogene: steps towards malignant transformation. *Cell Physiol Biochem* 6:245-270.

Ritter M, Woll E, Haussinger D, Lang F. 1992. Effect of bradikinin on cell volume and intracellular pH in NIH 3T3 fibroblasts expressing the ras oncogene. *FEBS Letters* 307:367-370.

Rothstein A, Mack E. 1990. Volume-activated K⁺ and Cl⁻ pathways of dissociated epithelial cells (MDCK): role of Ca²⁺. *Am J Physiol* 258:C827-C834.

Roy G, Sauvé R. 1987. Effect of anisotonic medium on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J Membrane Biol* 100:83-96.

Rudkouskaya A, Chernoguz A, Haskew-Layton RE, Mongin AA. 2008. Two conventional protein kinase C isoforms, alpha and beta I, are involved in the ATP-induced activation of volume-regulated anion channel and glutamate release in cultured astrocytes. *J Neurochem* 105:2260-2270.

Russell JM. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80:212-276.

Russo MA, Morgante E, Mariani MF, Yeh HI, Farber JL, van Rossum GD. 1994. Effects of ouabain and chloride-free medium on isosmotic volume control and ultrastructure of hepatocytes in primary culture. *Eur J Cell Biol* 64:229-242.

Sachs F. 2010. Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology* 25:50-56.

Sachs JR. 1998. How do red blood cells know how big they are? In: Okada Y, editor. *Cell volume regulation: the molecular mechanism and volume sensing machinery*. Tokyo: Elsevier Science. p 3-13.

- Sanchez M, McManus OB. 1996. Paxilline inhibition of the α -subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 35:963-968.
- Scheiner-Bobis G. 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanism of ion transport. *Eur J Biochem* 269:2424-2433.
- Schliess F, Haussinger D. 2000. Cell hydration and insulin signaling. *Cell Physiol Biochem* 10:403-408.
- Schliess F, Haussinger D. 2007. Osmosensing by integrins in rat liver. *Methods Enzymol* 428:129-144.
- Schneider J, Nicolay JP, Foller M, Wieder T, Lang F. 2007. Suicidal erythrocyte death following cellular K^+ loss. *Cell Physiol Biochem* 20:35-44.
- Schneider SW, Pagel P, Rotsch C, Danker T, Oberleithner H, Radmacher M, Schwab A. 2000. Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 439:297-303.
- Schoner W, Scheiner-Bobis G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their role in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C509-C536.
- Sen CK, Hanninen O, Orlov SN. 1995. Unidirectional sodium and potassium flux in myogenic L6 cells: mechanisms and volume-dependent regulation. *J Appl Physiol* 78:272-181.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1996. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction. *Oncogene* 12:2045-2050.
- Shnyrov VL, Orlov SN, Zhadan GG, Pokudin NI. 1990. Thermal inactivation of membrane proteins, volume-dependent Na^+, K^+ cotransport, and protein kinase C activator-induced changes of the shape of human and rat erythrocytes. *Biomed Biochim Acta* 49:445-453.
- Sihna B, Koster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, abankwa D, Stan RV, Butler-Browne G, Védie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P. 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144:402-413.
- Skriabin G, Orlov SN, Massé C, Berthiaume Y. 2000. Phloretin inhibits Na^+ and K^+ uptake in cultured alveolar type II cells by reduction of cellular ATP content. *Exp Lung Res* 26:319-333.
- Smith JB, Wade MR, Fineberg NS, Weinberger MH. 1988. Influence of race, sex, and blood pressure on erythrocyte sodium transport in humans. *Hypertension* 12:251-258.
- Smith TW, Rasmusson RL, Lobaugh LA, Lieberman M. 1993. Na^+/K^+ pump inhibition induces cell shrinkage in cultured chick cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 88:411-420.
- Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS. 2004. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C426-C432.

- Sowa G. 2012. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front Physiol* 2:120.
- Spagnoli C, Beyder A, Besch S, Sachs F. 2008. Atomic force microscopy analysis of cell volume regulation. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 78 (3 Pt 1):78.031916.
- Strange K. 1990. Volume regulation following Na⁺ pump inhibition in CCT principal cells: apical K⁺ loss. *Am J Physiol* 258:F732-F740.
- Strange K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28:155-159.
- Strange K, Denton J, Nehrke K. 2006. Ste20-type kinases: evolutionary conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology* 21:61-68.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2:695-702.
- Subramanyam M, Takahashi N, Hasegawa Y, Mohri T, Okada Y. 2010. Inhibition of protein kinase Akt1 by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) is involved in apoptotic inhibition of regulatory volume increase. *J Biol Chem* 285:6109-6117.
- Szabo I, Gulbins E, Zhang X, Apfel H, Barth P, Busch AE, Koppenhoefer U, Schlottmann K, Pongs O, Lang F. 1996. Tyrosine phosphorylation dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T-lymphocytes upon Fas stimulation. *J Biol Chem* 271:20465-20469.
- Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. 1998. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T-lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6169-6174.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR. 2005. Receptor-mediated glutamate-release from volume-sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16466-16471.
- Takeuchi A, Tatsumi S, Sarai N, Terashima K, Matsuoka S, Noma A. 2006. Ionic mechanisms of cardiac swelling induced by blocking Na⁺/K⁺ pump as revealed by experiments and simulation. *J Gen Physiol* 128:495-507.
- Tastesen HS, Holm JB, Moller J, Poulsen KA, Moller C, Sturup S, Hoffmann EK, Lambert IH. 2010. Pinpointing differences in cisplatin-induced apoptosis in adherent and non-adherent cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 26:809-820.
- Tatur S, Groulx N, Orlov SN, Grygorczyk R. 2007. Ca²⁺-dependent ATP release from A549 cells involves synergic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *J Physiol* 584:419-435.
- Taurin S, Dulin NO, Pchejetski D, Grygorczyk R, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 2002a. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism. *J Physiol* 543:835-847.
- Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay T-L, Thibaut P, Bennett MR, Hamet P, Pshezhetsky AV. 2002b. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an

anti-apoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 91:915-922.

Taylor SRJ, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, Melvin JE, Elliott JI. 2008. Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol* 180:300-308.

Thompson GJ, Langlais C, Cain K, Conley EC, Cohen GM. 2001. Elevated extracellular $[K^+]_o$ inhibits death-receptor and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome c release. *Biochem J* 357:137-145.

Tilly BC, Edixhoven MJ, van den Berghe N, Bot AG, de Jonge HR. 2010. Ca^{2+} -mobilizing hormones potentiate hypotonically-induced activation of ionic conductances in intestine 407 cells. *Am J Physiol* 267:C1271-C1278.

Tremblay J, Dutil J, Hamet P, Deng AY. 2001. Dissection of rat chromosome 2 with congenic strains support the ANP-receptor, CS-A, as a candidate gene of hypertension in the Dahl rats. *J Hypertens* 19 (Suppl. 2):S163.

Trouet D, Hermans D, Droogmans G, Nilius B, Eggermont J. 2001. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 284:461-465.

Vazquez-Juarez E, Ramos-Mandujano G, Hernandez-Benitez R, Pasantes-Morales H. 2008. On the role of G-protein-coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 21:1-14.

Venosa RA. 1991. Hypo-osmotic stimulation of active Na^+ transport in frog muscle: apparent upregulation of Na^+ pumps. *J Membrane Biol* 120:97-104.

Voets T, Droogmans G, Raskin G, Eggermont J, Nilius B. 1999. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5298-5303.

vom Dahl S, Hallbrucker C, Lang F, Haussinger D. 1991. Regulation of cell volume in the perfused rat liver by hormones. *Biochem J* 280:105-109.

vom Dahl S, Schliess F, Reissmann R, Gorg B, Weiergraber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Haussinger D. 2003. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 278:27088-27095.

Vrbka L, Vondrasek J, Jagoda-Cwiklik B, Vasha R, Jungwirth P. 2006. Quantification and rationalization of the higher affinity of sodium over potassium to protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15440-15444.

Wang Y, Roman R, Lidofsky SD, Fitz JG. 1996. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12020-12025.

Wehner F, Bondarova M, ter Veld F, Endl E, Nurnberger HR, Li T. 2006. Hypertonicity-induced cation channels. *Acta Physiol* 187:21-25.

- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RKH. 2003. Cell volume regulation: osmolyte transport and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1-80.
- Wei L, Xiao AY, Jin C, Yang A, Lu ZY, Yu SP. 2012. Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage in cortical neurons. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 448:325-334.
- Wenkstern TW, Engelhardt WA. 1959. [On extracellular localization of adenosinepolyphosphatase in nucleated erythrocytes]. *Folia Haematol* 76:423-431.
- Wesselborg S, Kabelitz D. 1993. Activation-driven death of human T cell clones: time course kinetics of the induction of cell shrinkage, DNA fragmentation, and cell death. *Cell Immunol* 148:234-241.
- Williamson P, Algarin L, Bateman J, Choe HR, Schlegel RA. 1985. Phospholipid asymmetry in human erythrocyte ghosts. *J Cell Physiol* 123:209-214.
- Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. 2000. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8151-8156.
- Xie Z. 2003. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 986:497-503.
- Yamamoto M, Chen MZ, Wang YJ, Sun HQ, Wei Y, Martinez M, Yin HL. 2006. Hypertonic stress increases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by activating PIP5K β . *J Biol Chem* 281:32630-32638.
- Yurinskaya VE, Goryachaya T, Guzhova I, Moshkov A, Rozanov Y, Sakuta G, Shirokova A, Shumilina E, Vassilieva I, Lang F, Vereninov A. 2005. Potassium and sodium balance in U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. *Cell Physiol Biochem* 16:155-162.
- Yusipovich AI, Zagubizhenko MV, Levin GG, Platonova A, Parshina EY, Grygorczyk R, Maksimov GV, Rubin AB, Orlov SN. 2011. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index. *J Microscopy* 244:229.
- Zhou QS, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer PJ. 1997. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase a protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 272:18240-18244.
- Zimmermann H. 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Archiv* 452:573-588.