

Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З. Сабиров

**РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЁМА И МЕМБРАННЫЙ  
ТРАНСПОРТ ИОНОВ**

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ ПРИ  
НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА  
им. МИРЗО УЛУГБЕКА**

**Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З. Сабиров**

**РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЁМА И МЕМБРАННЫЙ  
ТРАНСПОРТ ИОНОВ**  
(монография)

Ташкент  
“Университет”  
2021

УДК 615. 919:577. 352. 26

Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З.

Регуляция клеточного объёма и мембранный транспорт ионов.

Ташкент: Университет, 2021, с. 164.

В монографии рассматриваются основные принципы регуляции клеточного объёма и мембранный транспорт ионов. Книга посвящена актуальной бурно развивающейся области биофизики и всесторонне раскрывает основные механизмы процесса регуляции клеточного объёма тимоцитов при гипоосмотическом стрессе с особым акцентом на роли ионных каналов и транспортеров в этом процессе. Данные, представленные в этой работе, имеют, прежде всего, фундаментальный интерес, поскольку впервые на основе как литературных данных, так и собственных исследований раскрывают механизм регуляции объёма тимических лимфоцитов. Обсуждаемые результаты исследований могут найти применение не только в теоретических исследованиях, но и, несомненно, найдут практическое приложение в качестве теоретической основы для создания иммуномодуляторов нового типа, действие которых осуществляется через активацию или подавление ключевых объем-регулируемых ионных каналов.

**Рецензенты:**

У.З. Мирходжаев – доктор биологических наук, профессор

М.И. Асраров – доктор биологических наук, профессор

Утверждено к печати Ученым советом Института Биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана им. Мирзо Улугбека. Протокол №10 от 26 ноября 2021 г.

Издательство «Университет»  
Ташкент, 2021 г.

## ВВЕДЕНИЕ

Постоянство объёма живой клетки является важнейшим фактором её выживания в условиях осмотического дисбаланса, который может возникать как при интенсивно протекающих нормальных физиологических процессах (как, например, в лёгких при интенсивном дыхании, в желудочно-кишечном тракте в процессе пищеварения, в почках при фильтрации и концентрировании), так и при патологиях: воспалении, ишемии, инфаркте и инсульте. При этом, экстренное восстановление клеточного объёма осуществляется путём активации специфических мембранных транспортных процессов, деятельность которых направлена на выравнивание возникающего осмотических градиентов. Набухшая клетка должна “освободиться” от излишка внутриклеточных осмолитов. Поэтому она стремится вывести наружу ионы  $K^+$  и  $Cl^-$ , аминокислоты и другие метаболиты через ионные каналы и транспортеры. На сегодняшний день изучение механизмов регуляции объёма живой клетки является одной из центральных проблем современной клеточной физиологии и биофизики. Среди наиболее результативных мировых научных центров, следует отметить научные школы Японии (Okada et al., 2019), США (Delpire and Gagnon, 2018; Wilson and Mongin, 2019), Германии (Wehner et al., 2003; Jentsch, 2016) и Дании (Hoffmann et al., 2015). Объем-зависимые анионные каналы (ОЗАК) с промежуточной проводимостью и наружным выпрямлением занимают центральное место в регуляции клеточного объёма при гипоосмотическом стрессе, а их подавление приводит к полной остановке этого процесса. Одним из поразительных открытий последних лет явился тот факт, что объем-активируемые ионные каналы играют ключевую роль также и в таких биологически важных процессах, как пролиферация и программируемая смерть клеток – апоптоз. Важно отметить, что при ишемии сердца и мозга апоптотическая смерть кардиомиоцитов и нейронов подавляется при блокировании ОЗАК, что открывает широкие перспективы для поиска принципиально новых эффективных кардио- и нейропротекторов.

В данной монографии основное внимание уделено клеткам, населяющим тимус, который является жизненно важным первичным лимфоидным органом. Прекурсорные клетки, образующиеся в костном

мозге, мигрируют в тимус, где они быстро делятся и подвергаются положительному отбору на наличие Т-рецептора, и отрицательному отбору на аутореактивность. Небольшая популяция клеток тимуса, которые прошли этот отбор, выходят в кровоток и функционируют в качестве зрелых периферических Т-лимфоцитов. Вся оставшаяся часть погибает путем апоптоза. Кажется вполне очевидным, что процесс регуляции клеточного объема в целом, так же как и его основные компоненты – объем-активируемые транспортные системы, должны играть важную роль в процессе жизнедеятельности тимоцитов. Однако, анализ литературы показывает, что этому вопросу уделено крайне мало внимания. В наших исследованиях мы попытались восполнить этот пробел. В монографии суммированы основные литературные данные литературы по анатомии и физиологии тимуса, по механизму регуляции клеточного объема лимфоидных клеток, а также основные характеристики трех типов анионных каналов, активируемых в мембране клеток при их осмотическом набухании. Во-первых, это канал ClC-2, который экспрессирован в некоторых типах клеток, таких как секреторный эпителий слюнных желез и поджелудочной железы. Во-вторых, это макси-анионный канал, который имеет гораздо более широкий спектр экспрессирующих клеток (Sabirov and Merzlyak, 2012; Sabirov et al., 2016; Sabirov et al., 2021). И наконец, в-третьих, это объем-зависимый анионный канал промежуточной проводимости и наружного выпрямления, который имеет наиболее широкий спектр экспрессии, включая клетки тимуса. Кроме того, в книге суммированы и систематически изложены результаты наших собственных исследований биофизики и молекулярной физиологии транспортных процессов, принимающих участие в регуляции клеточного объема тимоцитов, включая результаты экспериментов методом микролокального отведения ионных токов (пэтч-кламп), которые прямо подтвердили активацию двух последних типов анионных каналов в мембране набухших тимоцитов. Особое внимание в книге также уделено участию объем-зависимого анионного канала, наряду с другими транспортерами, в процессе выброса из клеток основного эндогенного антиоксиданта – глутатиона.

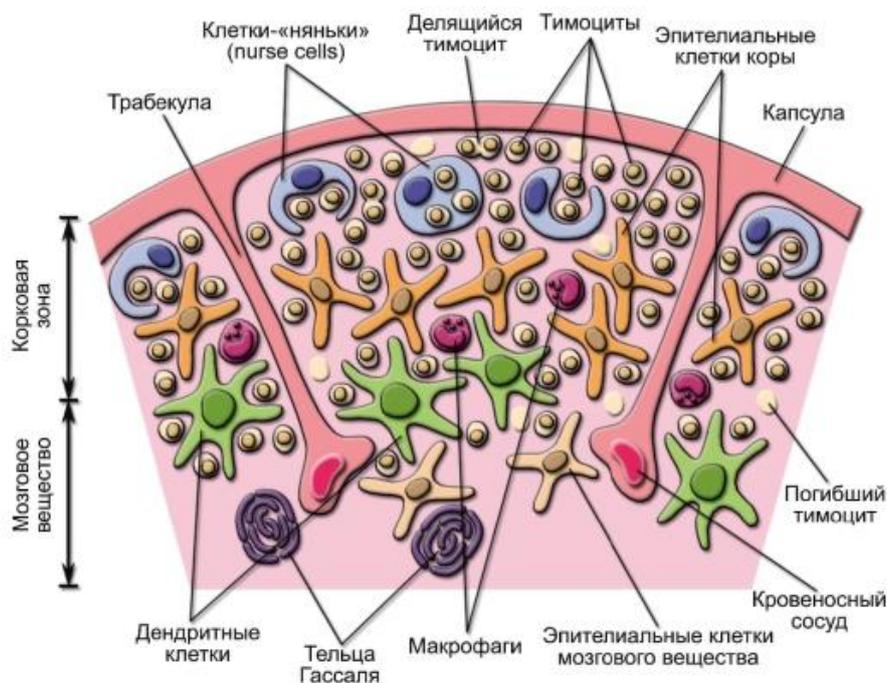
Данная монография будет полезна не только научным работникам, занимающимся фундаментальными и прикладными исследованиями в области биофизики, молекулярной и клеточной физиологии мембранного транспорта, но для студентов, магистров и докторантов, интересующихся биофизикой мембранных процессов. Книга может быть также полезна и для фармакологов в качестве теоретической базы для создания иммуномодуляторов нового типа, действие которых осуществляется через активацию или подавление ключевых объем-регулируемых ионных каналов.

# ГЛАВА I. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

## §1.1. Тимус и механизм созревания Т-лимфоцитов

Тимус (thymus, вилочковая, или зобная железа), как и костный мозг, является центральным органом иммуногенеза (Петров, 1987; Zdrojewicz et al., 2016). Тимус имеется у всех позвоночных животных, но его форма и местоположение могут быть различны. У человека тимус состоит из двух долей, расположенных в верхней части грудной клетки сразу за грудиной. У пресмыкающихся и птиц он обычно имеет вид двойной цепочки, тянущейся по обеим сторонам шеи. Тимус состоит из двух асимметричных долей: обе доли тесно соприкасаются друг с другом на уровне середины. Нижняя часть каждой доли расширена, а верхняя сужена. Каждая долька состоит из коркового и мозгового слоев (рис. 1.1). Строма тимуса представлена специфическими эпителиальными клетками отростчатой формы. Своими отростками эпителиальные клетки как бы окружают, обнимают незрелые тимоциты, за что и получили образное название "клетки-няньки". Корковый слой (кортекс) густо заполнен малыми лимфоцитами (timoцитами), отличающимися высокой митотической активностью. Морфологически от лимфоцитов других тканей они не отличаются. Плотность тимоцитов в мозговом (медулярном) слое меньше. Организованных зародышевых центров в тимусе нет. Эпителиальные клетки мозгового слоя образуют компактные островки – тельца тимуса. Аfferентные лимфатические сосуды в органе отсутствуют. Тимус иннервирован пост-ганглионарными симпатическими нервными волокнами, которые входят в орган вместе с кровеносными сосудами (Elenkov et al., 2000; Elenkov, 2008). Такая иннервация является одним из компонентов тесного взаимодействия между нервной и иммунной системами. Размеры тимуса зависят от возраста и линейной принадлежности животных. Абсолютная масса этого органа увеличивается до периода полового зрелости, а затем снижается. Относительная масса уменьшается все время, начиная с момента рождения, но полностью орган никогда не исчезает. К примеру, в тимусе крыс на 6-й неделе жизни насчитывается довольно

много лимфоидных клеток, около 2000 млн. Однако к 16 неделе количество клеток уменьшается примерно в 4 раза (Клаус, 1990). В тимусе молодых животных, который почти целиком состоит из лимфоидных клеток, имеются кроме того дендритные, эпителиальные клетки и макрофаги (Клаус, 1990).



**Рис. 1.1.**

**Схема строения тимуса.**

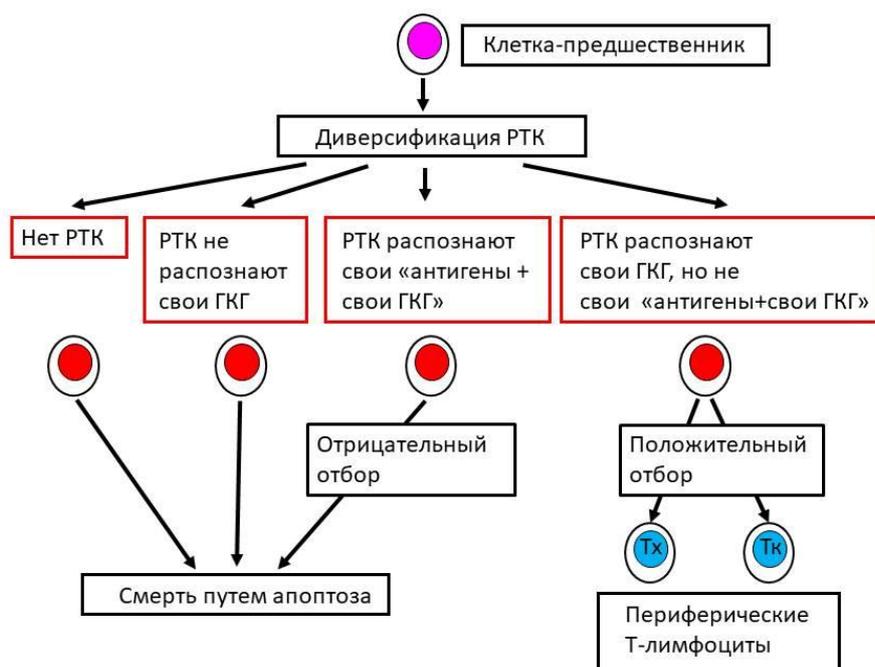
Взято из: [http://www.farsipharm.com.ua/sobytija\\_torgovaja-marka/thymus1.html](http://www.farsipharm.com.ua/sobytija_torgovaja-marka/thymus1.html)

В корковом слое происходит активное размножение тимоцитов. Считают, что именно здесь темп митоза самый высокий: клеточный цикл протекает всего за 3-6 часов. Кортикальные лимфоциты являются незрелыми и прогрессивно дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты (Kurd and Robey, 2016). При этом они мигрируют в мозговой слой, а оттуда в кровь. Помимо Т-лимфоцитов, тимус вырабатывает активные гормоноподобные вещества, содействующие созреванию Т-лимфоцитов (Savino and Dardenne, 2000; Savino et al., 2016). Кровь доставляет в тимус стволовые клетки костного мозга, где они вступают в контакт с эпителиальными клетками поверхностного коркового слоя долек и под влиянием гормонов тимуса трансформируются.

Дифференцировка Т-лимфоцитов начинается уже в период эмбрионального развития. В вилочковой железе создается особое микроокружение за счет тимического эпителия, влияющее на дифференцировку Т-лимфоцитов. Начиная от вхождения предшественников Т-клеток в тимус и до выхода зрелых клеток в органы, огромное число взаимодействий влияют на комплексные процессы дифференциации Т-клеток (Savino and Dardenne, 2000; Alberts et al., 2002; Savino et al., 2016). Процесс пролиферации лимфоцитов в тимусе протекает очень интенсивно, но не все клетки мигрируют из тимуса в виде Т-лимфоцитов: большинство из них там же погибает (Medema and Borst, 1999).

Дифференциация включает регуляцию экспрессии различных мембранных белков, ключевым из которых является рецептор Т-клеток (РТК) (Alberts et al., 2002). РТК - это димерный мембранный белок, по структуре напоминающий антитела. Основная функция этого рецептора - распознавание пептидных фрагментов, связанных с главным комплексом гистосовместимости (ГКГ). ГКГ - это также мембранный белок, присутствующий на поверхности всех ядро-содержащих клеток (Alberts et al., 2002). В структурном отношении это - гетеродимер, по строению также напоминающий антитела. Существуют два класса ГКГ: класс I, который присутствует на всех клетках, и класс II, который присутствует только в антиген-презентирующих клетках, таких как В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги. При пересадке органов, отторжение ткани происходит посредством реакции Т-клеток на ГКГ, поэтому этот рецептор также называется антигеном тканевой совместимости.

Селекция тимоцитов проходит в два этапа (рис. 1.2). После того как на индивидуальном тимоците экспрессируется РТК, являющийся его уникальной специфичностью, клетка вступает в этап позитивной селекции. На этом этапе, для того, чтобы выжить, тимоцит должен проявить способность распознавать собственные антигены тканевой совместимости, экспрессированные на эпителиальных клетках коры тимуса. Тимоциты с подходящими РТК получают сигнал дальнейшей дифференцировки. Они отобраны на этапе позитивной селекции и вступают в следующий этап.



**Рис. 1.2.**

**Отрицательный и положительный отбор в процессе созревания Т-лимфоцитов. По (Alberts et al., 2002).**

На границе коркового и мозгового слоев тимуса созревающие тимоциты встречаются с дендритными клетками и макрофагами. Профессия этих клеток – презентация антигенных пептидов в комплексе с собственными антигенами тканевой совместимости для распознавания Т-лимфоцитами. В данном случае эти клетки презентируют пептиды самого организма – фрагменты аутоантигенов, которые могут заноситься в тимус с током крови. В отличие от зрелого Т-лимфоцита, который при встрече с антигенным пептидом получает сигнал активации, незрелые тимоциты в тимусе, при распознавании специфичных для них РТК аутоантигенов, получают сигнал генетически запрограммированной смерти – апоптоза (Holtzman et al., 2000). Таким образом, происходит негативная селекция аутореактивных Т-лимфоцитов, которые удаляются путем апоптоза.

В результате позитивной и негативной селекции из тимуса в кровотоки и лимфоидные органы поступают только такие Т-лимфоциты, которые несут РТК, способные распознавать собственные ГКГ (антигены тканевой совместимости) в комплексе с пептидными фрагментами чужеродных белков и неспособные распознать их в комплексе с собственными пептидами. Такие зрелые Т-лимфоциты

берут на себя основные защитные функции в клеточном иммунитете. Кроме того, они выполняют важные регуляторные функции, контролируя силу и форму любого специфического иммунного ответа (Zdrojewicz et al., 2016).

Процесс селекции достаточно подробно изучен для Т-клеток (Alberts et al., 2002). Объектом селекции являются кортикальные тимоциты, слабо экспрессирующие рецепторный комплекс РТК-CD3 и несущие одновременно ко-рецепторы CD4 (Т-хелперы, распознают только ГКГ типа II) и CD8 (цитотоксические Т-киллеры, распознающие только ГКГ типа I). Эти клетки почти лишены Bcl-2 и Bcl-x<sub>L</sub> (анти-апоптотические белки), но содержат на своей поверхности Fas-рецептор (рецептор смерти). Такое соотношение факторов, препятствующих и способствующих развитию апоптоза, обрекает их на гибель в отсутствие специальных сигналов защиты (Medema and Borst, 1999; Holtzman et al., 2000; Savill et al., 2002). Источником защитных сигналов для них служит взаимодействие их Т-рецептора (РТК) с белками ГКГ, которые экспрессируют эпителиальные клетки микроокружения глубоких слоев коры тимуса (Medema and Borst, 1999). Если клетка несет рецептор, способный распознать эти молекулы (при этом роль встроенного в них пептида пока не ясна), она получает “поддерживающий” сигнал, который приводит к усилению экспрессии рецептора РТК, активации и пролиферации клетки. Остальные клетки “игнорируются”, что означает для них неизбежное развитие апоптоза. Пока не вполне ясно, что служит непосредственным сигналом к развитию апоптоза в данном случае – действие глюкокортикоидов и пуриновых нуклеотидов, присутствующих в микроокружении, или активные воздействия со стороны окружающих эпителиальных клеток – всех или только определенных субпопуляций.

Положительная селекция сопряжена с дифференцировкой тимоцитов на субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> и CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> клеток, основой которой является выбор способа распознавания антигенных пептидов – в составе молекулы ГКГ первого класса (в их распознавании участвует ко-рецептор CD8) или второго класса (распознаваемый с участием CD4). При этом, экспрессия ко-рецептора CD4 в сочетании с РТК, распознающим пептид в комплексе с молекулой ГКГ первого класса (не

комплементарной рецептору), приводит к апоптозу клетки, также как экспрессия CD8 в сочетании с РТК, распознающим пептид в молекуле ГКГ второго класса (Alberts et al., 2002). Причиной развития апоптоза в этом случае может служить “неполнота” сигнала от распознавания молекул ГКГ, который оказывается недостаточным для включения защиты от апоптоза.

До сих пор нет четкого ответа на вопрос, почему распознавание аутологичных молекул на поверхности эпителиальных клеток защищает тимоциты от апоптоза, а их распознавание на мембране дендритных клеток индуцирует апоптоз тимоцитов. Предполагается, что исход зависит от интенсивности воздействия, определяемой степенью сродства рецептора по отношению к распознаваемому комплексу и плотности молекул РТК и ГКГ на поверхности клеток (Medema and Borst, 1999).

Поскольку не все антигены представлены в тимусе, процесс выработки аутореактивных клонов и формирование ауто толерантности продолжается и после выхода Т-клеток из тимуса. Однако в этом случае значительная часть аутоспецифических клеток не погибает, а блокируется супрессорными клетками.

Зрелые Т-лимфоциты, подвергшиеся селекции, в покое лишены мембранного Fas-рецептора и экспрессируют протоонкогены Bcl-2 и Bcl-x<sub>L</sub>, что определяет их устойчивость к индукторам апоптоза. Положение меняется на обратное при активации лимфоцитов соответствующим антигеном или митогеном: моноклональные антитела против Fas-рецептора не действуют на покоящиеся лимфоциты, но убивают активированные Т-клетки. Активированные лимфоциты могут подвергнуться апоптозу при самых различных воздействиях – повторной стимуляции (Green et al., 2003), при недостатке факторов роста, действии глюкокортикоидов и т. д. (Holtzman et al., 2000; Kurd and Robey, 2016).

## **§1.2. Общие принципы и механизмы регуляции объёма клеток**

Практически все типы клеток в процессе жизнедеятельности испытывают осмотические изменения, так как внутриклеточный метаболизм и процессы мембранного транспорта производят

флуктуации в концентрации осмотически-активных веществ внутри клетки и в ее внеклеточном окружении. Клетка живого организма является высокоорганизованной системой, способной к саморегуляции в условиях меняющихся параметров окружающей среды. Сохранение целостности клетки тесно связано с ее способностью к активному поддержанию постоянства объема (Проссер, 1977; Pasantés-Morales, 2016). Изучение механизмов регуляции объема живой клетки является одной из центральных проблем современной клеточной физиологии и биофизики. Этому вопросу посвящено большое количество исследований, что отражено в многочисленных обзорах на эту тему (Nilius et al., 1996; Strange et al., 1996; Okada, 1997; Lang et al., 1998; Wehner et al., 2003; Jentsch, 2016; Pedersen et al., 2016). Разные типы клеток по-разному регулируют свой объем. Так в условиях осмотического шока, который является стимулом к активации хлор- и калий-селективных ионных каналов, активируются системы Na/H-обмена, сопряженного Na/K/2Cl и K/Cl котранспорта, хлор/бикарбонатного обмена, и некоторых других.

При попадании в гипотоническую среду (с низкой осмотичностью) клетки сначала набухают, что является пассивным ответом, а затем начинают сжиматься и восстанавливают свой изначальный объем. Этот процесс носит название регуляторного уменьшения объема (RVD – regulatory volume decrease). В случае гипертонической среды (с повышенной осмотичностью) клетки сначала сжимаются (пассивный ответ в течение нескольких секунд), а затем медленно восстанавливают свой объем. Этот процесс называется регуляторным увеличением объема (RVI – regulatory volume increase). Следует подчеркнуть, что даже в изотонической среде клетка не находится в термодинамическом равновесии с окружающей средой. Это связано с наличием ионных градиентов через плазматическую мембрану, который активно поддерживается с помощью АТФ-зависимого активного транспорта и пассивной ионной проницаемости плазмалеммы. Теоретические принципы и мембранные механизмы гомеостаза клеточного объема были проанализированы в классических работах (Tosteson and HOFFMAN, 1960; Milgram and Solomon, 1977; Freedman and Hoffman, 1979; Solomon, 1986). При этом за основу

принимается модель “насос-утечка”, в которую включается как активная составляющая, описывающая активный транспорт, так и пассивная Гольдмановская утечка.

В условиях гипотонического или гипертонического шока наблюдаемая регуляция объема является результатом активации большого числа мембранных транспортных процессов, деятельность которых направлена на выравнивание возникшего осмотического дисбаланса. Так, когда клетка оказывается в среде с низкой осмотичностью, она вынуждена “освободиться” от излишка внутриклеточных осмолитов. Наиболее часто используемыми осмолитами для выброса наружу являются ионы  $K^+$  и  $Cl^-$  (Dickman and Goldstein, 1990). В случае клеток крови показано, что гипоосмотический стресс приводит к активации системы выброса ионов калия и хлора в эритроцитах лягушки (Gusev et al., 1995; Agalakova et al., 1997; Gusev et al., 1997; Gusev et al., 1999), саламандры *Amphiuma* (Cala et al., 1992), форели (Bourne and Cossins, 1984), кролика (al Rohil and Jennings, 1989), овцы (Bize and Dunham, 1994), собаки (Fujise et al., 1997), мыши (Armsby et al., 1995) и человека (Ellory and Hall, 1988). Эти ионы могут выбрасываться через различные системы. С одной стороны, это сопряженный  $K-Cl$  котранспорт, чувствительный к фуросемиду и/или ингибитору DIOA, как это чаще всего наблюдается в эритроцитах (см. например (Fujise et al., 1997)). С другой стороны, ионные каналы, селективные для ионов калия и хлора (см. обзоры (Okada, 1997; Okada et al., 1998)) что более характерно для не эритроидных клеток.

Электрофизиологические исследования не эритроидных клеток (таких как кишечный эпителий, эндотелий, кардиомиоциты, и др.) выявили важную роль ионных каналов в регуляции клеточного объема (см. (Nilius et al., 1996; Strange et al., 1996; Okada, 1997)). Так, было показано, в ответ на гипотонический стресс, в первую очередь активируются неселективные механо-чувствительные каналы, которые, наряду с ионами натрия, пропускают также ионы кальция внутрь клетки. Кальций, в свою очередь, активирует  $Ca$ -зависимые калиевые каналы, увеличивая тем самым калиевую проницаемость плазмалеммы. Независимо от кальция активируются объем-зависимые хлорные

каналы, что повышает хлорную проницаемость мембраны. В результате, хлористый калий выбрасывается из клеток, что приводит к регуляторному уменьшению объема.

Наряду с ионами калия и хлора, из клеток, в ответ на гипотонический стимул, могут также выбрасываться и другие осмотически-активные вещества. Практически все типы клеток содержат нейтральную аминокислоту таурин. Эта аминокислота не входит в состав белков. Относительно недавно было установлено, что таурин выбрасывается из клеток в условиях гипотонического стресса. Данные в основном были получены на эритроцитах рыб (Fincham et al., 1987; Garcia-Romeu et al., 1991; Garcia-Romeu et al., 1996), хотя аналогичные явления наблюдались и при исследовании эритроцитов лошади (Gibson et al., 1993). Предполагается, что белок полосы 3 мембраны эритроцитов, являющийся хлор-бикарбонатным обменником, ответственен за объем-зависимый выброс таурина из эритроцитов (Perlman et al., 1996). В эпителиальных и эндотелиальных клетках выброс таурина может происходить с участием объем-зависимого хлорного канала (Nilius et al., 1996; Okada, 1997; Jentsch, 2016; Mongin, 2016).

При попадании в среду с высокой осмотичностью клетки должны увеличить осмотичность внутриклеточного содержимого для того, чтобы выжить. Поскольку основным внеклеточным ионом является натрий, то это достигается путем активации сопряженных систем транспорта натрия. Протоны в цитоплазме находятся в связанной форме, поэтому обмен их на натрий приведет к общему повышению внутриклеточного осмотического давления и росту клеточного объема (Okada, 1997; Wehner et al., 2003; Hoffmann et al., 2009). Действительно, в первичной культуре гепатоцитов было показано, что натрий протонный обмен является одним из главных компонент регуляторного увеличения клеточного объема в ответ на гипертоническую стимуляцию (Wehner et al., 2002).

Нетто-перенос осмотически-активных ионов натрия, калия и хлора может также осуществляться системой Na/K/2Cl котранспорта. Эта система опосредует однонаправленный электронейтральный поток натрия и калия вместе с двумя ионами хлора. Особенностью этой

системы является то, что в норме, градиенты калия и натрия имеют противоположную направленность и гораздо больше по абсолютной величине, чем градиент ионов хлора. Следовательно, общее направление потока осмолитов зависит от того, какой из градиентов (Na или K) превалирует. Так, как в норме градиент ионов калия (140-160 мМ в цитозоле против 2-5 мМ в плазме и интерстициальной жидкости) несколько выше, чем градиент ионов натрия (10-15 мМ в цитозоле против 140-150 мМ во внеклеточной среде), то общее направление потока осмолитов в норме будет изнутри во внеклеточное пространство. Однако в условиях осмотического стресса, или в эпителии почечных канальцев это направление может измениться на противоположное.

### §1.3. Система регуляции объема Т-лимфоцитов

При попадании в гипертоническую среду, лимфоидные клетки быстро сжимаются и далее не меняют свой объем в течение 1-2 часов, подчиняясь соотношению Бойля-Вант-Гоффа

$$\pi(V_c - b) = nRT \quad (1.1)$$

(где  $b$  - осмотически неактивная часть клеточного объема), то есть они ведут себя как пассивные осмометры с параметром  $b$ , составляющим примерно 20-30% от всего клеточного объема. В гипотонической среде лимфоциты быстро набухают до объема, который примерно соответствует вышеприведенному соотношению, однако затем они начинают сжиматься и в течение 10-20 минут эффективно восстанавливают свой первоначальный объем (Bortner and Cidlowski, 2011). Таким образом, лимфоциты, также как и некоторые другие типы клеток, обладают системой регуляторного уменьшения объема - RVD.

Первоначальные исследования процесса RVD были проведены на периферических лимфоцитах крови (ПЛК) человека, которые можно довольно легко получить с помощью дифференциального центрифугирования венозной крови на ступенчатом градиенте

плотности. Изотопные исследования показали, что при набухании лимфоцитов происходит массовый выброс из клеток ионов калия (как было оценено по потокам  $^{86}\text{Rb}$ ) и хлора (оценено по потокам  $^{36}\text{Cl}$ ). Причем эти потоки не были сопряжены, что указывало на независимый путь прохождения этих ионов через клеточную мембрану. Мембранный потенциал для ПЛК составляет порядка  $-65$  мВ, что несколько выше, чем Нернстовский потенциал для калия. При набухании, мембранный потенциал деполяризуется до значения, близкого к потенциалу Нернста для ионов хлора (от  $-20$  до  $-40$ ), что указывает на повышение хлорной проводимости при RVD.

Так как ПЛК представляют собой смесь различных типов лимфоцитов, Ченг и соавторы (Cheung et al., 1982) провели детальное изучение регуляции объема различных субпопуляций лимфоцитов. Оказалось, что лимфоциты, выделенные из миндалин здоровых детей после тонзилэктомии, регулировали свой объем с существенно меньшей эффективностью, чем лимфоциты из периферической крови. Известно, что миндалины в основном содержат В-клетки, тогда как ПЛК - это большей частью Т-клетки. Поэтому эти авторы выделили чистые популяции Т- и В-лимфоцитов и показали, что Т-лимфоциты регулируют свой объем примерно с той же скоростью, что и ПЛК, тогда как регуляторное уменьшение объема В-лимфоцитов происходило с существенно меньшей скоростью, сравнимой со скоростью лимфоцитов из миндалин. Так, если для Т-клеток RVD заканчивался уже за 15 мин, то В-клетки даже через 30 минут оставались набухшими. Тимус содержит практически только Т-лимфоциты, которые, в отличие от периферических клеток, являются незрелыми. Ченг и соавторы (Cheung et al., 1982) выделили лимфоциты из кусочков тимуса детей, перенесших операцию на сердце, и обнаружили, что тимоциты регулируют свой объем примерно с той же эффективностью, что и зрелые клетки, но только при небольших градиентах осмотичности. В сильно гипотонических средах (50% от исходной) тимоциты, в отличие от зрелых Т-клеток, не восстанавливали свой объем, что возможно объясняется несовершенством систем клеточного гомеостаза для этих незрелых клеток.

Известно, что в процессе развития иммунного ответа, как В-, так и Т-клетки претерпевают бласт-трансформацию. Ли и соавторы (Lee et al., 1988) исследовали регуляцию объема клона L2 мышинных Т-лимфоцитов в покое и после бласт-трансформации, индуцированной интерлейкином ИЛ-2 в течение 24-48 часов. В этой работе покоящиеся клетки не регулировали свой объем в ответ на гипотоническую стимуляцию при комнатной температуре, но регулировали, правда с невысокой скоростью, при повышении температуры до 37 °С. После стимуляции интерлейкином 2, эти клетки начинали быстро пролиферировать, а при помещении их в гипотоническую среду, начинали с высокой скоростью регулировать свой объем. Это свидетельствует о том, что способность регулировать объем существенна для функции Т-лимфоцитов как эффекторных клеток. Интересно, что осмотическая водная проницаемость стимулированных клеток была примерно на 70% выше по сравнению с контрольными не стимулированными лимфоцитами, что возможно также имеет отношение к способности клеток регулировать собственный объем.

Ионные механизмы регуляции клеточного объема лимфоцитов были исследованы в ряде электрофизиологических работ (см. обзоры (Grinstein and Foskett, 1990; Lewis and Cahalan, 1990; Cahalan, 2001)). Роль ионов кальция в процессе активации иммунного ответа доказана очень убедительно (Cahalan, 2001). Установлено, что, как стимуляция митогенами (т.е. веществами, стимулирующими деление клеток), так и истощение внутриклеточных кальциевых депо лимфоцитов приводит к активации каналов, названных CRAC (Ca Release Activated Ca channels; (Lewis and Cahalan, 1989)), и последующему повышению внутриклеточного кальция, которое является обязательным для запуска генов иммунного ответа. В начальных работах было показано, что блокаторы Са-зависимых калиевых каналов (хинин и цетидил) и ингибиторы кальмодулина (некоторые фенотиазины) подавляли регуляцию объема в периферических лимфоцитах (Cheung et al., 1982). Однако, попытки зарегистрировать повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция в ПЛК при гипотоническом шоке с использованием таких флуоресцентных Са<sup>2+</sup>-индикаторов, как Quin-2 и Indo-1 были безуспешными, а использование более специфических

блокаторов калиевых каналов показало, что не Ca-зависимые, а потенциал-регулируемые калиевые каналы, чувствительные к харибдотоксину (одному из компонентов яда скорпиона) ответственны за выброс ионов калия при набухании лимфоцитов (Grinstein and Smith, 1990). Однако, последующие работы с использованием индикатора Fluo-3 показали, что, при стимуляции человеческих Т-лимфоцитов в гипотонических средах, в них развиваются выраженные кальциевые ответы, которые блокируются ионами гадолиния, блокатора механочувствительных катионных каналов (Schlichter and Sakellaropoulos, 1994). Это означает, что Ca-активируемые калиевые каналы, которые присутствуют как в тимоцитах, так и в В-лимфоцитах (Mahaut-Smith and Schlichter, 1989), должны вносить свой вклад в общий рост калиевой проницаемости при регуляции объема лимфоидных клеток.

Исследования методом пэтч-кламп показали наличие как Ca<sup>2+</sup>-активируемых, так и потенциал-зависимых калиевых каналов в мембране лимфоцитов. Феноменологически, в лимфоцитах различают три различных типа потенциал-зависимых калиевых каналов: 1) n-тип, наиболее распространен и встречается в нормальных Т-лимфоцитах, тимоцитах, лейкомиических линиях клеток, В-лимфоцитах, а также в макрофагах; этот канал открывается при потенциалах более положительных чем -50 мВ, имеет амплитуду 12-16 пСм и чувствителен к тетраэтиламмонiu (ТЭА), 4-аминопиридину, хинину и харибдотоксину. В отличие от калиевых каналов задержанного выпрямления в нейронах, K<sup>+</sup>-канал лимфоцитов ингибируется также блокаторами кальциевых каналов, такими как верапамил, дилтиазем, дигидропиридины, ионы никеля, кадмия и кобальта; 2) n' - тип каналов почти такой же, как и n-тип, но имеет несколько иную инактивацию и в 10 раз менее чувствителен к ТЭА, характерен для мышечных Т-клеток и тимоцитов; 3) l (эль) - тип найден в аутоиммунных мышцах с мутацией lpr, имеет несколько большую амплитуду (21-27 пСм), в 10 раз более чувствителен к ТЭА, чем n-тип и не блокируется харибдотоксином.

Калиевый канал n-типа в настоящее время идентифицирован на молекулярном уровне как Kv1.3. Показано также, что близкий по структуре канал Kv1.1 (чувствительный к дендротоксину)

экспрессируется в мышинных тимоцитах  $CD4^+CD8^-$ , а канал Kv3.1 присутствует в поющих CD8<sup>+</sup> клетках.

Два типа Ca-активируемых калиевых каналов также были обнаружены в лимфоцитах: это канал с маленькой проводимостью (SK, 7-8 пСм) в линии Т-клеток Jurkat, и канал с промежуточной проводимостью (IK, 15-35 пСм) в нормальных Т- и В-лимфоцитах человека. В покое (когда внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  составляет порядка 100 нМ) эти каналы закрыты, но они полностью активируются при концентрации  $Ca^{2+}$  порядка 1 мкМ. На молекулярном уровне, первый тип каналов идентифицирован как SKCa2 и SKCa3, тогда как второй тип - как IKCa1. Ханна и соавторы (Khanna et al., 1999), показали, что экспрессия мРНК гена hSK4/hIK1 (идентичен IKCa1) существенно повышается (в 15 раз) при активации человеческих Т-лимфоцитов фитогемагглютинином. При этом, экспрессия мРНК Kv1.3 повышалась всего в 1,3 раза, что говорит о том, что в активированных клетках калиевая проводимость определяется в основном  $Ca^{2+}$ -активируемыми  $K^+$ -каналами. Регуляция объема (в состоянии покоя и после активации фитогемагглютинином) была более чувствительна к клотримазолу (ингибитору  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов hSK4/hIK1), чем к агитоксину (блокатору Kv1.3), что говорит о значительной роли Ca-активируемых калиевых каналов как при активации Т-клеток, так и в регуляции их объема в покое и после бласт-трансформации.

Как было отмечено выше, наличие анионной проницаемости очень важно для регуляторного уменьшения объема, так как для нетто-потоков катионов необходимо также и движение эквивалентного количества анионов. Действительно, методом пэтч-кламп было показано наличие нескольких типов анион-селективных каналов в лимфоцитах (Lewis and Cahalan, 1990; Cahalan, 2001). Наиболее тесно связанным с регуляцией объема, по-видимому, является тип, названный "мини-каналы". Этот канал регистрировался в Т- и В-лимфоцитах, активировался при набухании клеток в гипотонических средах только при наличии во внутриклеточной среде АТФ и имел ряд селективности  $I^- > SCN^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > \text{аспартат} > \text{глюконат}$ , характерный для объем-зависимых хлорных каналов. Макроскопический ток имел

наружное выпрямление и подавлялся ингибитором анионного транспорта DIDS. Анализ флуктуаций позволил оценить амплитуду одиночного канала равной около 2 пСм, что явилось основанием для названия "мини". Следует однако отметить, что за исключением низкой амплитуды, этот анионный ток практически идентичен объем-зависимой хлорной проводимости, описанной для других типов клеток в работах (Jackson and Strange, 1995; Strange and Jackson, 1995; Strange et al., 1996; Nilius et al., 1997; Okada, 1997) показано, что низкий уровень флуктуаций хлорной проводимости, активированной гипотонией, связан с тем, что каналы всегда открыты при небольших потенциалах (использованных в большинстве работ) и могут быть закрыты только при больших положительных потенциалах. Амплитуда одиночных каналов, оцененная по закрыванию каналов при сильной деполяризации, была порядка 30-50 пСм. Близкая величина проводимости показана для объем-зависимого хлорного канала в линии человеческих Т-клеток Jurkat.

Второй тип хлорных каналов в лимфоцитах имел проводимость около 40 пСм и открывался при повышении внутриклеточной концентрации цАМФ и/или при длительной деполяризации (Chen et al., 1989). Неизвестно, имеет ли этот канал отношение к регуляции объема, но то, что его регуляция нарушена у больных муковисцидозом (цистическим фиброзом) свидетельствует о том, что он является важным аспектом при этой патологии.

Третий тип каналов - это хлорные каналы большой проводимости (Cahalan and Lewis, 1988). Они имеют амплитуду около 400 пСм (макси-анионные каналы) и найдены как в Т-, так и в В-лимфоцитах. Хотя и известно, что эти каналы активируются при набухании клеток (Sabirov et al., 2001), свойства макроскопических токов, регистрируемых при гипотонии, сильно отличаются от свойств этого канала: макси-анионные каналы имеют ярко выраженную потенциал-зависимость и закрываются при небольших положительных и отрицательных потенциалах, тогда как объем-зависимый макроскопический ток инактивируется только при сильной деполяризации. В настоящее время предполагается, что макси-анионные каналы играют важную роль в межклеточной передаче

сигналов, так как они пропускают такие молекулы, как АТФ и глутамат (Sabirov et al., 2001; Sabirov and Okada, 2005). Хлорные каналы лимфоидных клеток в настоящее время не идентифицированы на молекулярном уровне.

Суммируя вышесказанное, общая схема регуляции объема лимфоцитов при гипотоническом шоке выглядит следующим образом. Разбаланс между внутри- и внеклеточным осмотическим давлением приводит к потоку воды внутрь клетки и ее набуханию. Растяжение мембраны приводит к активации кальций-проницаемых каналов типа CRAC и входу ионов кальция в цитозоль. Это в свою очередь приводит к открыванию Ca-активируемых калиевых каналов. Одновременно (и вероятно независимо) происходит активация объем-зависимых хлорных каналов, которая, во-первых, вызывает деполяризацию клеточной мембраны до значений, достаточных для активации потенциал-зависимых калиевых каналов (n-, n'- и l- типа), и во вторых, обеспечивает путь для электрогенного транспорта анионов. Ионы калия движутся по своему концентрационному градиенту, который направлен наружу, а ионы хлора идут вслед за ними. Таким образом, происходит выброс KCl и эквивалентного количества воды, сжатие клетки и выравнивание осмотического градиента.

Подчиняются ли тимоциты вышеприведенной схеме? На первый взгляд, процесс регуляции объема выглядит в основном схожим с таковым для периферических лимфоцитов и лимфобластов, однако детальное исследование ионных потоков (Soler et al., 1993) показало, что тимоциты крысы обладают системой сопряженного K:Cl котранспорта, чувствительного к специфическому ингибитору DIOA (dihydroindenyl-oxo-alkanoic acid). Радиоактивные потоки калия и хлора были сопряжены, так как после истощения клеток в низкокалиевых средах, хлорный поток также подавлялся. При набухании клеток в гипотонической среде, DIOA-чувствительный выброс KCl сильно повышался. Исследование изменений объема тимоцитов показало, что DIOA подавляет регуляцию объема примерно в тех же концентрациях, что и сопряженный поток калия и хлора (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993). Таким образом, согласно данным этой группы авторов, регуляция объема тимоцитов в корне отличается от зрелых лимфоцитов

и опосредуется не ионными каналами, а системой сопряженного транспорта. Авторы сделали предположение, что при созревании лимфоцитов, система, основанная на K:Cl транспортере заменяется на ионные каналы. К настоящему времени эта гипотеза не подтверждена электрофизиологическими исследованиями тимоцитов и требует тщательной проверки. Проведенные нами исследования показали, что процесс регуляторного уменьшения объема тимоцитов при гипотоническом стрессе полностью ингибируется блокаторами калиевых и хлорных каналов, а сами хлорные каналы детектируются методом пэтч-кламп, что может свидетельствовать о важной роли ионных каналов в регуляции объема тимоцитов. Блокаторы водных каналов также существенно подавляли RVD тимоцитов, что указывает на то, что перенос воды в процессе регуляции объема тимоцитов происходит по селективным водным каналам (Kurbannazarova et al., 2003).

#### **§1.4. Общая характеристика анионных каналов**

Анионные каналы (АК) присутствуют как в плазматической мембране, так и в мембранах внутриклеточных органелл. Клетки животных экспрессируют разнообразные типы анионных каналов в плазматической мембране. АК вовлечены в широкий спектр клеточных функций, как путем сдвига мембранного потенциала к равновесному потенциалу для Cl<sup>-</sup> (E<sub>Cl</sub>), так и вкладом в транспорт внеклеточных и внутриклеточных неорганических анионов, таких как Cl<sup>-</sup> и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> или транспортом некоторых внутриклеточных органических анионов таких, как глутамат и анионные формы АТФ (в основном АТФ<sup>4-</sup> и Mg-АТФ<sup>2-</sup>).

В отличие от катионных каналов, АК непосредственно не участвуют в инициации и передаче возбудимости в нервах и мышцах животных. Потенциал клеточных мембран определяется электродвижущей силой (задаваемой равновесным потенциалом) и проводимостью для каждого из проникающих ионов. Открывание потенциал-зависимых Na<sup>+</sup> и/или Ca<sup>2+</sup> каналов вызывает потенциал действия, а открытие некоторых типов потенциал-зависимых K<sup>+</sup> каналов способствует реполяризации, так как равновесные потенциалы для Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> (E<sub>Na</sub> and E<sub>Ca</sub>) являются более положительными, а

потенциал для  $K^+$  ионов ( $E_K$ ) более негативен по сравнению с потенциалом покоя. Открывание  $Cl^-$  каналов приводит к гиперполяризации или деполяризации в зависимости от значения  $E_{Cl}$ , а значит и внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  ( $[Cl^-]_i$ ). Уровень  $[Cl^-]_i$  в большинстве типов клеток определяется активностью плазматических переносчиков аниона  $Cl^-$ , таких как  $Na^+-K^+-2Cl^-$  симпортер ( $Na^+-K^+-2Cl^-$  котранспортер: NKCC),  $Na^+-Cl^-$  симпортер (NCC),  $K^+-Cl^-$  симпортер (KCC),  $Cl^-/HCO_3^-$  антипортер (анионообменник: AE) и  $Cl^-/H^+$  антипортер (ClC-3, -4, -5, -7), а также в некоторых типах клеток - семейством  $Na^+$  и  $Cl^-$ -зависимых нейротрансмисмиттерных транспортеров (SLC6).

Когда величина  $[Cl^-]_i$  выше или ниже ее электрохимического равновесного значения (например, 10 мМ, тогда как внеклеточная концентрация  $Cl^-$ ,  $[Cl^-]_o$  составляет 100 мМ и мембранный потенциал в соответствии с уравнением Нернста составляет около -60 мВ при 37°C), открывание хлорных каналов приведет к деполяризации или гиперполяризации, соответственно. Иными словами, открывание хлорных каналов будет приводить к удержанию  $[Cl^-]_i$  вблизи его электрохимического равновесия. Поскольку в зрелых нейронах и клетках скелетных мышц уровень  $[Cl^-]_i$  намного ниже равновесного значения, открывание нейрональных лиганд-управляемых анионных каналов (например, рецептора глицина (GLyR) и/или GABA<sub>A</sub> рецептора (GABA<sub>A</sub>R), также как мышечных потенциал-зависимых анионных каналов ClC-1) будет приводить к стабилизации мембранного потенциала, что, в свою очередь, приведет к ингибированию синапса и подавления возбуждения (а затем и мышечных сокращений). Поэтому, мутации генов, нарушающие функции этих хлорных каналов вызывают анионную каналопатию, связанную с гипервозбудимостью нейронов и скелетных мышц.

Хлорные каналы также участвуют в трансэпителиальном транспорте (секреции или поглощении) электролитов и жидкости. Например, в эпителиальных клетках сАМР/РКА активирующийся  $Cl^-$  канал, CFTR, участвует в секреции NaCl и жидкости в дыхательных путях, поджелудочной железе и эпителиальных клетках кишечника, а также в реабсорбции NaCl клетками потовых желез. Наследственная дисфункция CFTR является причиной болезни муковисцидоза и

характеризуется закупоркой дыхательных путей, протоков поджелудочной железы, а также высоким содержанием электролитов в поту. Канала ClC-Kb участвует в реабсорбции ионов Cl<sup>-</sup> через базолатеральную мембрану толстого восходящего участка петли Генле, дистальных извитых канальцев и собирательных канальцев в человеческой почке. Поэтому, его наследственная дисфункция приводит к синдрому Бартера (Типа III), который связан с массовой потерей соли почками.

В дополнение к этим классическим и хорошо известным функциям анионных каналов плазмалеммы, недавно было обнаружено их участие во многих других важных клеточных функциях и процессах, в том числе в регулировании клеточного объема (Okada, 1997; 2004), пролиферации (Shen et al., 2000; Wondergem et al., 2001), клеточной дифференцировки (Voets et al., 1997b), индуцированной гибели клеток (Okada and Maeno, 2001; Okada, 2004), приобретенной устойчивости к цисплатину (Lee et al., 2007; Shimizu et al., 2008), а также утечки АТФ (Sabirov and Okada, 2004; 2005) и глутамата (Liu et al., 2006; Malarkey and Pappura, 2008). Эти новые функции зависят от деятельности особого вида каналов плазмалеммы, которые характеризуются чувствительностью к клеточному объему или индуцированному набуханию клетки.

В условиях, вызывающих набухание, в клетках включается механизм, называемый регуляторным уменьшением объема, который осуществляется главным образом оттоком KCl, приводящим к выходу осмотически эквивалентной воды. Чтобы осуществить это, почти все типы клеток используют все доступные анионные каналы, в том числе базально-активные (фоновые), Ca<sup>2+</sup>-активированные, цАМФ активированные, ClC-2-связанные, анионные каналы большой проводимости (макси-анионный), а также ОЗАК (Okada, 1997). Среди них объем-регулируемые анионные каналы (это ClC-2, макси-анионный и ОЗАК) являются повсеместно распространенными и приводятся в действие и/или регулируются при набухании клетки.

## **§1.5. ClC-2: канал небольшой проводимости внутреннего выпрямления.**

Некоторые члены семейства ClC анионных каналов и транспортеров являются хорошо изученными хлорными каналами (Jentsch et al., 1999; Jentsch et al., 2002; Jentsch et al., 2005b). Среди девяти членов этого семейства у млекопитающих для ClC-1, ClC-4 до ClC-7, ClC-Ka(K1) и ClC-Kb(K2) не обнаружено чувствительности к изменению объема клетки. Хотя и предполагалось, что ClC -3 молекулярно идентичен ОЗАК, скорее всего, он им не является (см. ниже), так как обычно находится не в плазматической мембране, а во внутриклеточных мембранах (Jentsch et al., 2005a; Jentsch et al., 2005b). Кроме того, недавно было показано, что ClC -3 является не хлорным каналом, а Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> антипортером (Matsuda et al., 2008), подобно ClC-4 и -5 (Picollo and Pusch, 2005), а также ClC -7 (Graves et al., 2008). Таким образом, в семействе ClC млекопитающих только ClC-2 относится к объем-активируемым анионным каналам.

ClC-2 может быть активирован не только при клеточном набухании (Grunder et al., 1992), но и при сильной гиперполяризации (Thiemann et al., 1992) и внеклеточном закислении (Jordt and Jentsch, 1997). Активация ClC-2 не напрямую зависит от внутриклеточного АТФ (Park et al., 1998), а, скорее всего, индуцируется истощением АТФ (Rutledge et al., 2002). Одиночные каналы ClC-2, как известно, имеют небольшую проводимость, всего 2-3 пС (Weinreich and Jentsch, 2001), а размер поры канала пока не определен. Для макроскопических токов этих каналов характерно внутреннее выпрямление и инактивация, вызванная деполяризацией (Kajita et al., 2000; Fahlke, 2001). Селективность по галогенам ClC-2 относится к типу с сильным электрическим полем (ряды Эйзенмана IV или V) и имеет последовательность по проницаемости Cl<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>I<sup>-</sup> (Thiemann et al., 1992). ClC-2 каналы слабо блокируются производным стиблина, DIDS, но довольно эффективно блокируются карбоксилатным аналогом NPPB (Thiemann et al., 1992; Furukawa et al., 1998). Наиболее эффективными блокаторами этих каналов являются тяжелые металлы, Cd<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> (Schwiebert et al., 1995; Bond et al., 1998; Clark et al., 1998; Duan et al., 2000; Kajita et al., 2000)

Индукцированная набуханием клеток активация ClC-2 вовлечена в процесс RVD ооцитов *Xenopus* (Furukawa et al., 1998), клеток насекомых SF9 (Xiong et al., 1999) и клеток гепатомы (Roman et al., 2001). В клонированных клетках T84, однако, участие ClC-2 в RVD не было установлено (Bond et al., 1998). Предполагается, что в нейронах ClC-2 играет важную роль в установлении  $[Cl^-]_i$  в соответствии с его электрохимическим равновесием (Staley et al., 1996). Однако, у нокаут-мышей по ClC-2 не проявляются судороги или эпилепсия, но обнаружена дегенерация фоторецепторов и мужских половых клеток (Bosl et al., 2001), а также вакуолизация в белом веществе головного мозга и спинного мозга (Blanz et al., 2007).

### §1.6. Макси-анионный канал

Макси-анионный канал является еще одним представителем объем-зависимых хлорных каналов и обнаруживается в различных типах клеток, от амфибий до человека (Sabirov and Okada, 2009; Sabirov and Merzlyak, 2012; Sabirov et al., 2016). Для него характерна очень высокая проводимость одиночных каналов в физиологических условиях (примерно 300-400 пС), что отличает его от других хлорных каналов. Большинство авторов отмечает, что макси-анионный канал имеет несколько подсостояний различного уровня, в частности ~ 15 пС, ~ 50 пС, ~ 100 пС, ~150 пС и 200 пС (Schwarze and Kolb, 1984; Olesen and Bundgaard, 1992; Sun et al., 1993; Dutta et al., 2004). Проводимость канала увеличивается с ростом концентрации  $Cl^-$  в среде, но имеет насыщение около 640 пС с  $K_m = 112$  мМ в L6 клетках миобласты (Hurnak and Zachar, 1994) 581 пС с  $K_m = 120$  мМ в Т-лимфоцитах (Schlichter et al., 1990) и 617 пС и  $K_m = 77$  мМ в «саркопузырьках» скелетной мышце лягушки (Hals et al., 1989).

Вольтамперные характеристики полностью открытого состояния канала, как правило, симметричны, линейны и без каких-либо насыщений. Канал имеет максимальную вероятность открытого состояния около 0 мВ и легко закрывается, когда напряжение превышает  $\pm 15-30$  мВ. В зависимости от типа клеток, чувствительность к напряжению меняется, а в некоторых случаях наблюдается преимущественная чувствительность к положительным или

отрицательным потенциалам. Тем не менее, зависимость от напряжения вероятности открытого состояния ( $P_{open}$ ) остается колоколообразной с максимумом около нуля. Потенциал полуэффекта ( $V_{1/2}$ ) для Т-лимфоцитов равен -22,8 мВ и 18 мВ с эквивалентным воротным зарядом 5,7 и 9,6 для отрицательных и положительных потенциалов, соответственно (Schlichter et al., 1990). В культуре клеток миобластов L6 значение  $V_{1/2}$  было равно -25,6 мВ и 49,6 мВ для покоящихся клеток и -15,5 мВ и 31,4 для быстро пролиферирующих клеток (Hurnak and Zachar, 1994). Воротные заряды также имели отличия для этих двух физиологических состояний клеток, более низкие значения эффективного заряда наблюдались для покоящихся клеток (3,5 и 1,7) по сравнению с пролиферирующими клетками (10,6 и 3,7) для отрицательных и положительных напряжений, соответственно. Подобно Т-лимфоцитам, потенциал полуэффекта был выше при отрицательном потенциале (-36,9 мВ против 13,9 мВ) и у макси-анионного канала из клеток молочной железы (Gray et al., 1984).

Во многих клетках макси-анионный канал демонстрирует высокую анион-катионную селективность. О высокой степени проницаемости хлора по сравнению с натрием было сообщено для макси-анионных каналов из клеток бычьего пигментированного мерцательного эпителия ( $P_{Cl}/P_{Na} = 24$ ; (Mitchell et al., 1997)), Т-лимфоцитов ( $P_{Cl}/P_{Na} = 30$ , (Schlichter et al., 1990)) клеток нейробластомы ( $P_{Cl}/P_{Na} = 30$ ; (Falke and Mislner, 1989)), сердечных миоцитов новорожденных крыс ( $P_{Cl}/P_{Na} = 24.6$ ; (Coulombe and Coraboeuf, 1992)) и из клеток молочной железы C127 ( $P_{Cl}/P_{Na} = 21-26$ , (Sabirov et al., 2001)). С другой стороны, несколько более низкая селективность ( $P_{Cl}/P_{Na} = 9-11$ ) наблюдалась у клонированных клеток НТ-29 (Vajrnath et al., 1993), свежесыводенных эпителиальных клеток морской свинки (Kemp et al., 1993), эпителиальных клеток желчного протока крысы (McGill et al., 1992), линии мышечных клеток крыс (Hurnak and Zachar, 1994). Сан с сотр. (Sun et al., 1992)] получили еще более низкое значение  $P_{Cl}/P_{Na} = 6$  для клонированных клеток гладкой мускулатуры. Изучая макси-анионный канал Т-лимфоцитов, Шлитчтер с сотр. (Schlichter et al., 1990) обнаружили снижение селективности от значения  $P_{Cl}/P_{Na} = 30$ , измеренной при сбалансированной осмолярности, до величины  $P_{Cl}/P_{Na} =$

11, при наличии осмотического градиента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что макси-анионные каналы могут различаться не только от клетки к клетке, но также и в зависимости от состояния экспериментальных условий при измерении селективности.

Данные по селективности для различных неорганических и органических анионов приведены в Таблице 1.1. Для многих клеток установлено, что избирательность макси-анионных каналов соответствует рядам Эйзенмана для слабого электрического поля со следующей последовательностью: йодид > бромид > хлорид > фторид (Soejima and Kokubun, 1988; Schlichter et al., 1990; Vajrnath et al., 1993; Kajita et al., 1995; Sabirov et al., 2001). Макси-анионный канал проницаем также для крупных органических анионов, в том числе для глюконата, глутамата, аспартата и лактобионата (табл. 1.1). Хурнак и Захар (Hurnak and Zachar, 1995) изучили связь между минимальной площадью поперечного сечения анионов и их относительной проницаемостью и оценили диаметр пор макси-анионного канала в культуре клеток миобласты, который составил около 0,6 нм. Аналогичная оценка радиуса поры (0,32 нм) была получена Соеджима и Кокубун (Soejima and Kokubun, 1988) из площади поперечного сечения наибольшего из исследованных анионов, NEPES, проницаемость для которого уже не обнаруживалась. Анализ проницаемости макси-анионного канала в клетках молочной железы C127 для органических анионов различного размера с использованием теории исключенной площади дал радиус поры от 0,55 нм до 0,75 нм в зависимости от того, были ли приняты во внимание силы трения (Sabirov and Okada, 2004). Однако, сравнение отношения проницаемости с отношением электрической подвижности для испытанных органических анионов дало неожиданно линейное отношение с наклоном, близким к 1, когда эти отношения были построены друг против друга. Этот результат показывает, что даже перемещение крупных анионов внутри поры макси-анионного канала осуществляется путем свободной диффузии и практически не подвергается влиянию стенок поры. Таким образом, оценки размера поры, основанные на измерениях ионной проницаемости, являются заниженными. Использование незаряженных полимерных молекул в качестве зонда дало больший размер пор для

макси-анионного канала. Так, при односторонней аппликации полиэтиленгликолей (ПЭГ) измеренный эффективный радиус поры был равен 1,16 нм и 1,42 нм для цитозольного и внеклеточного входа, соответственно, тогда как двусторонняя аппликация ПЭГ дала усредненный радиус ~1,3 нм (Sabirov and Okada, 2004). Этот размер поры значительно превышает размеры небольших неорганических анионов и является достаточным для транспортировки больших органических анионов.

Макси-анионный канал из париетальных клеток желудка был нечувствителен к внеклеточной pH 5 - 8 (Kajita et al., 1995). В культуре клеток каротидного гломуса крысы канал был нечувствителен к внутриклеточной pH 6,5-8 в inside-out пэтче (Stea and Nurse, 1989). Однако высокое внешнее pH 9 сдвигало потенциал-зависимость макси-анионного канала в более отрицательные значения потенциала, в скелетной мышце лягушки (Woll and Neumcke, 1987). У макси-анионного канала трахеи, встроенного в гигантские липосомы, понижение pH среды уменьшало вероятность открытого состояния с кажущейся константой  $pK = 6,09$  (Duszyk et al., 1995). Амплитуда каналов не изменялась при подкислении, что позволяет предположить, что протонированный сайт находится далеко от проводящего пути канала.

Молекулярная природа макси-анионного канала остается в настоящее время не установленной, хотя разные авторы предполагали участи в его формировании митохондриального порина, АТФ/АДФ-обменника и белков семейства TTY (для подробного обзора этих гипотез см. (Sabirov and Okada, 2009; Sabirov and Merzlyak, 2012; Sabirov et al., 2016). И лишь совсем недавно было показано, что макси-анионный канал является белком SLCO2A1 (Sabirov et al., 2017). В качестве регуляторного компонента канала служит белковый комплекс Annexin 2-S100A10 (Islam et al., 2020).

**Таблица 1.1. Селективность и ряды проницаемости  $P_x/P_{Cl}$  (в скобках) для макси-анионного канала различных типов клеток.**

Клетки	Ряд проницаемости	Литература
Шванновские клетки крысы в культуре	$I^- (1.4) > Br^- (1.2) > Cl^- (1.0) >$ метил- $SO_4^- (0.72) > SO_4^{2-} (0.61) >$ ацетат $^- (0.39) =$ изотиоцианат $^- (0.39) >$ аспарат $^- (<0.03),$ глутамат $^- (<0.03)$	(Gray et al., 1984)
Эпителий мочевого пузыря кролика	$Cl^- (1.0) \approx Br^- (1.0) \approx I^- (1.0) \approx SCN^- (1.0) \approx NO_3^- (1.0) > F^- (0.57) >$ ацетат $^- (0.30) >$ глюконат $^- (0.07)$	(Hanrahan et al., 1985)
Легочные альвеолярные клетки (тип II) в культуре.	$I^-(1.5) > Br^- (1.02) \geq Cl^- (1.00) > NO_3^- (0.9) >$ глюконат $^- (0.6)$	(Schneider et al., 1985)
Гладко мышечные клетки из аорты эмбриональных клеток крысы в культуре	$I^- (1.4) > Br^- (1.3) > Cl^- (1.0) > F^- (0.7)$	(Soejima and Kokubun, 1988)
Клетки каротидного гломуса крысы в культуре	$Cl^- (1.0) > HCO_3^- (0.71) > SO_4^{2-} (0.57) >$ глутамат $^- (0.14)$	(Stea and Nurse, 1989)
Мышечные В-лимфоциты гибридной линии	$F^- (1.25) > I^- (1.18) > SCN^- (1.10) > Br^- (1.07) > Cl^- (1.00) >$ глюкуронат $^- (0.78) >$ $NO_3^- (0.68) >$ аспарат $^- (0.62)$	(Bosma, 1989)
Нормальные человеческие Т-лимфоциты	$I^- (1.38) > NO_3^- (1.14) > Br^- (1.04) > Cl^- (1.0) > F^- (0.57) >$ $SCN^- (0.56) > HCO_3^- (0.56) > SO_4^{2-} (0.49) >$ глюконат $^- (0.29) \approx$ пропионат $^- (0.30) >$ аспарат $^- (0.08)$	(Schlichter et al., 1990)

Эмбриональные остеогенные клетки цыпленка в культуре	$\text{Cl}^- (1.0) > \text{метилсульфат}^- (0.71) > \text{глюконат}^- (0.25) > \text{глутамат}^- (0.17)$	(Ravesloot et al., 1991)
Человеческие карциномные клетки толстой кишки HT-29cl.19A	$\text{I}^- (1.2) > \text{Br}^- (1.05) > \text{Cl}^- (1.0) > \text{F}^- (0.46) > \text{глюконат}^- (0.24)$	(Bajnath et al., 1993)
Везикулы из мускул <i>Ascaris sum</i>	$\text{I}^- > \text{Br}^- = \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$	(Dixon et al., 1993)
Клеточная линия из крысиных мускул L6	$\text{Br}^- (1.18) > \text{I}^- (1.15) > \text{NO}_3^- (1.13) > \text{Cl}^- (1.0) > \text{метансульфонат}^- (0.60) > \text{HCO}_3^- (0.59) > \text{пропионат}^- (0.44) > \text{SO}_4^{2-} (0.40) > \text{глутамат}^- (0.1)$	(Hurnak and Zachar, 1995)
Париетальные клетки морской свинки	$\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$	(Kajita et al., 1995)
Мышечные клетки рака молочной железы C127	$\text{I}^- (1.31) > \text{Br}^- (1.14) > \text{Cl}^- (1.0) > \text{F}^- (0.61) > \text{фосфат}^{2-} (0.43) > \text{аспарат}^- (0.23) \approx \text{глутамат}^- (0.22)$	(Sabirov et al., 2001)
Мышечные клетки рака молочной железы C127	$\text{Cl}^- (1.0) > \text{формиат}^- (0.66) > \text{пируват}^- (0.52) > \text{метансульфонат}^- (0.51) > \text{ацетат}^- (0.50) > \text{пропионат}^- (0.39) > \text{глюкоронат}^- (0.19) > \text{глюкогептонат}^- (0.18) > \text{глюконат}^- (0.17) > \text{глутамат}^- (0.16) > \text{лактобионат}^- (0.13)$	(Sabirov and Okada, 2004)

## §1.7. Объем-зависимый анионный канал

Объем-зависимый анионный канал (ОЗАК) в англоязычной литературе часто обозначается как VSOR (Volume-Sensitive Outwardly Rectifying). Он является наиболее типичным анионным каналом, активирующимся при набухании в большинстве типов клеток животных (Okada, 1997). При физиологических внутриклеточных уровнях АТФ ОЗАК ответственен за большую часть активизированной набуханием проводимости целой клетки. Раньше этот канал также называли  $\text{Cl}^-$ -каналом, активирующимся при набухании ( $I_{\text{Cl,swell}}$ : (Ackerman et al., 1994a; Ackerman et al., 1994b; Nilius et al., 1997)) объем-чувствительным анионным каналом для органических осмолитов (VSOAC: Volume-Sensitive Organic Anion Channel (Kemp et al., 1993; Strange and Jackson, 1995; Strange et al., 1996)), объем-регулируемым анионным током (VRAC: Volume-Regulated Anion Current (Levitan and Garber, 1998; Nilius and Droogmans, 2003)).

В дополнение к чувствительности к объему и умеренному наружному выпрямлению, ОЗАК обладает и другими фенотипическими свойствами, как показано в Табл 1.2. У этого канала есть промежуточная унитарная проводимость между 10 и 80 пСм (Worrell et al., 1989; Solc and Wine, 1991; Banderali and Roy, 1992; Grygorczyk and Bridges, 1992; Weiss and Lang, 1992; Kelly et al., 1994; Okada et al., 1994; Petersen et al., 1994; Jackson and Strange, 1995; Boese et al., 1996; Meyer and Korbmacher, 1996; Tsumura et al., 1996; Duan et al., 1997; Voets et al., 1997a; Wehner et al., 2002; Inoue et al., 2005). Двойной пэтч-кламп, то есть, одновременная запись в режиме whole-cell и cell-attached (Okada et al., 1994; Petersen et al., 1994; Inoue et al., 2005) и средний ток при inside-out записи (Tsumura et al., 1996) ясно демонстрируют, что умеренное наружное выпрямление макроскопических токов главным образом вызвано наружным выпрямлением, наблюдаемым у одиночного канала (Grygorczyk and Bridges, 1992; Okada et al., 1994; Meyer and Korbmacher, 1996; Tsumura et al., 1996; Inoue et al., 2005). При аппликации больших положительных напряжений наблюдается время-зависимая инактивация whole-cell ОЗАК токов с одновременным пошаговым выключением одиночных ОЗАК каналов при двойном пэтч-клампе (Okada et al., 1994; Inoue et al., 2005).

В большинстве типов клеток ряд проницаемости ОЗАК для галогенов  $I^- > Br^- > Cl^-$ , соответствует последовательности Эйзенмана I, (Strange et al., 1996; Nilius et al., 1997; Okada, 1997). Наиболее физиологически важное свойство ОЗАК – это зависимость активности канала от концентрации свободного АТФ в цитоплазме без его гидролиза (см. (Okada, 1997)). Эта особенность отличает его от ClC-2 и макси-анионного канала (Табл. 1.2). В отличие от внутриклеточного свободного АТФ, внутриклеточный свободный  $Mg^{2+}$  является фактором, подавляющим активность канала ОЗАК (Oiki et al., 1994). Внутриклеточные протоны также сильно уменьшают активность ОЗАК с рК 6,3 (Sabirov et al., 2000) вызывая подавление RVD в условиях лактоацидоза (Mori et al., 2002; Nabekura et al., 2003). ОЗАК обладает широкой чувствительностью к обычным блокаторам анионных каналов, включая производные стильбена (SITS, DIDS), карбоксилатные аналоги (NPPB, DPC, 9-AC) и DPC-производные ариламинобензоатов (нифлумовая кислота, флуфенаминовая кислота) (Strange et al., 1996) (Nilius et al., 1997; Okada, 1997; Okada et al., 2006). Активность ОЗАК также ингибируется различными типами структурно несвязанных соединений, такими как некоторые (но не все) ингибиторы или субстраты Р-гликопротеина, арахидоновая кислота и производное сулфонилмочевины – глибенкламид (Okada et al., 2006). Хотя конкурентный антагонист для рецепторов эстрогена, тамоксифен, который также является известным ингибитором Р-гликопротеина, часто используется как эффективный блокатор ОЗАК, нужно отметить, что тамоксифен был полностью неэффективен при блокировке ОЗАК в некоторых типах клеток, включая линии мышечных клеток мыши (Voets et al., 1997a), бычьи клетки пигментного эпителия сетчатки глаза (Mitchell et al., 1997), крысиные симпатические нейроны (Leaney et al., 1997) и мышинные корковые нейроны (Inoue et al., 2005). Относительно специфичные блокаторы ОЗАК нового поколения включают бисфенол флоретин (Fan et al., 2001), дериват этакриновой кислоты DCPiB (Decher et al., 2001) и кислое производное диарилмочевины - NS3728 (Helix et al., 2003). В отличие от ClC-2, активность ОЗАК совершенно нечувствительна к внеклеточной аппликации  $Cd^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . Кроме того,

ионные токи ОЗАК были мало чувствительны к  $Gd^{3+}$  (Hazama et al., 1999; Sabirov et al., 2001).

Стильбеновые производные, SITS и DIDS, ингибируют ионные токи ОЗАК в зависимости от фиксированного напряжения (Kubo and Okada, 1992; Okada, 1997), чем и отличаются от карбоксилатного аналога NPPV, флоретина и арахидоновой кислоты. Стильбеновые производные более заметно подавляли выходящие токи, чем входящие, с усилением кинетики инактивации при положительных потенциалах. Эти результаты указывают, что SITS и DIDS блокируют открытый канал во внешнем входе поры ОЗАК. Очень похожее блокирование открытого канала наблюдалось при внеклеточном (но не внутриклеточном) действии анионных форм глибенкламида (Liu et al., 1998) и АТФ (Jackson and Strange, 1995; Tsumura et al., 1996; Poletto Chaves and Varanda, 2008). Сурамин также блокирует канал ОЗАК в открытом состоянии в бычьих эндотелиальных клетках (Droogmans et al., 1999), мышечных клетках Лейдига (Poletto Chaves and Varanda, 2008) и человеческих эпителиальных клетках HeLa (Sato-Numata et al., 2017). Все это позволяет предположить, что канал ОЗАК обладает достаточно большим внешним вестибюлем, а его пора меньше, чем размеры SITS, глибенкламида, сурамина и АТФ. Действительно, исследования методом распределения полимерных неэлектролитов (Ternovsky et al., 2004) показали, что минимальный радиус поры ОЗАК составляет 0,63 нм, что очень близко к эффективным радиусам  $SITS^{2-}$  (~0,55 нм) и  $АТФ^{4-}$  (~0,58 нм) и немного меньше чем эффективные радиусы глибенкламида (~0,60 нм) и сурамина (~0,91 нм).

Определение полного генома ряда биологических видов, в том числе и человека, открывает широкие возможности для определения механизмов регуляции объема на молекулярном уровне. Одним из наиболее впечатляющих результатов последнего времени явилось установление молекулярной основы объем-зависимого анионного канала, остававшегося загадкой в течение десятков лет, как комбинации из пяти паралогов белков семейства LRRC8 (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014).

Таким образом, три семейства объем-активируемых анионных каналов (ClC-2, макси-анионный канал и ОЗАК) имеют

чувствительность к изменению объема, но отличаются друг от друга по проводимости одиночных каналов, формы вольтамперных характеристик (ВАХ), селективности по галогенам, чувствительностью к тяжелым металлам и зависимости от внутриклеточного АТФ (Табл. 1.2).

### **§1.8. Заключение к главе I**

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что регуляция клеточного объема лимфоидных клеток достаточно детально исследована. Также, как и другие типы клеток (такие как эпителиальные, глиальные и др.), лимфоциты способны активно регулировать собственный объем в условиях гипоосмотического стресса, и эта способность является ведущим фактором, позволяющим сохранять этим клеткам целостность при резких изменениях тоничности внутри- и внеклеточной среды. При этом, основным ионным механизмом для большинства клеток, включая лимфоидные, является активация электрогенного транспорта для ионов калия, что обеспечивает движущую силу процесса за счет мощного электрохимического калиевого градиента, направленного наружу, а также активация анионного транспорта (в основном – хлорного), который необходим для обеспечения электронейтральности, без которой невозможен нетто-перенос заряженных осмолитов. Тимоциты являются незрелыми лимфоцитами, и для них, на основании экспериментов по измерению сопряженных потоков радиоактивно-меченных ионов калия и хлора и его ингибированию единственным доступным блокатором сопряженного калий/хлор ко-транспорта, был предложен принципиально иной механизм, в котором именно сопряженный транспорт ионов калия и хлора через соответствующий транспортер обеспечивает нетто-выброс калия и хлора, сопровождающийся осмотически эквивалентным выходом молекул воды и регуляторным уменьшением объема. Это явное несоответствие механизма регуляции клеточного объема для незрелых клеток – тимоцитов, и для зрелых периферических лимфоидных клеток и явилось основанием для проведения нами детального исследования механизма регуляции объема тимоцитов, которые представлены в данной работе.

**Таблица 1.2. Сравнение физиологических, биофизических и фармакологических свойств ClC-2, Макси-анионного канала и OZAK.**

	<b>ClC-2</b>	<b>Макси-анионный канал</b>	<b>OZAK</b>
<i>Физиологические свойства</i>			
Чувствительность к объему	Набухание потенцирует	Набухание потенцирует	Набухание активирует
Внутриклеточная АТФ-зависимость	Не регулируется АТФ	Не регулируется АТФ	Негидролитическая зависимость от АТФ
<i>Биофизических свойства</i>			
Радиус поры	Неизвестен	1.28-1.34 нм	0.58-0.65 нм
Проводимость одиночного канала	Маленькая (2-3 пСм)	Большая (300-400 пСм)	Промежуточная (10-80 пСм)
Выпрямление	Внутреннее выпрямление	Нет выпрямления	Наружное выпрямление
Потенциал-зависимая кинетика	Инактивация при деполяризации. Активация при гиперполяризации	Инактивация при деполяризации и при гиперполяризации	Деполяризация вызывает инактивацию
Ряд проницаемости для галогенов	$Cl^- \geq Br^- > I^-$	$I^- > Br^- > Cl^-$	$I^- > Br^- > Cl^-$
Проницаемость глутамат/аспартат	маленькая	большая	промежуточная
<i>Фармакологические свойства</i>			
Чувствительность к DIDS	-+	+	++
Чувствительность к NPPB	+	+	++
Чувствительность к тяжелым металлам	$Cd^{2+}$ , $Zn^{2+}$ - чувствительность	$Gd^{3+}$ - чувствительность	-
Чувствительность к арахидонатной кислоте	?	++	++

## ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК И АКТИВНОСТИ ИОННЫХ КАНАЛОВ

В данной главе приводится описание состава экспериментальных растворов, а также методов и подходов, использованных в наших исследованиях регуляции клеточного объема, результаты которых описаны в последующих главах.

### §2.1. Описание растворов, используемых в исследовании регуляции клеточного объема

В нашей лаборатории общепринятым является нормальный раствор Рингера, который содержит (в мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Na-HEPES, 6 HEPES, и 5 глюкозы (290 мосмоль/кг H<sub>2</sub>O, pH-7,4 доведенный NaOH). В растворе К-Рингер 135 мМ NaCl замещается эквимолярно на KCl (суммарная [K<sup>+</sup>]=140 мМ). Раствор Е содержал (в мМ): 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (pH 7,4, 30 мосмоль/кг H<sub>2</sub>O). Раствор К-Рингер готовился добавлением 2,25 мл 3М KCl в 47,75 мл раствора Е (общий объем 50 мл).

Гипотонические растворы обычно готовятся путем смешивания раствора Рингера или К-Рингера с раствором Е в соотношениях, указанных в таблице 2.1. В экспериментах по исследованию роли ионов калия в регуляции объема тимоцитов, описанных в следующей главе, сначала отдельно готовились растворы №5 на основе натрия и на основе калия (выделено жирным шрифтом в Табл. 2.1), затем концентрация ионов калия варьировалась путем смешения этих двух растворов в соотношениях, указанных в Табл. 2.2. Осмоляльность полученных гипотонических растворов рассчитывалась по формуле:

$$\Pi = (\Pi_R V_R + \Pi_H V_H) / (V_R + V_H) \quad (2.1)$$

где  $\Pi_R$  и  $\Pi_H$  – осмотичности раствора Рингера и Н-буфера, а  $V_R$  и  $V_H$  – соответствующие объемы.

Осмотичности исходных растворов определяли по понижению температуры замерзания растворов с помощью осмометра OM802 (Vogel, Германия).

**Таблица 2.1. Состав, осмотичность и содержание NaCl и K<sup>+</sup> в гипоосмотических растворах\*.**

№	Рингер или К-Рингер (мл)	Раствор Е (мл)	Осмоляльность (мосмоль/кг H <sub>2</sub> O)	% гипотоничности	[NaCl] (мМ)	[K <sup>+</sup> ] для смесей с К-Рингером (мМ)
1	7	0	290,0	100,0	135,0	5,0
2	6	1	252,9	87,2	115,7	24,3
3	5	2	215,7	74,4	96,4	43,6
4	4	3	178,6	61,6	77,1	62,9
<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>141,4</b>	<b>48,8</b>	<b>57,9</b>	<b>82,1</b>
6	2	5	104,3	36,0	38,6	101,4
7	1	6	67,1	23,2	19,3	120,7
8	0	7	30,00	10,3	0,00	140,0

\*В этой таблице 5-й раствор – это раствор #5 в таблице 2.2

В некоторых экспериментах (там, где это указано) использовался Рингер-140, который содержал (в мМ): 140 NaCl, 6 KCl, 15 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1,5 MgCl<sub>2</sub> (300 мосмоль/кг H<sub>2</sub>O, pH-7,4 доведенный NaOH). Гипотонические растворы на основе Рингера-140 (см. Табл. 2.3) готовились путем разведения этого раствора Н-буфером следующего состава (в мМ): 15 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1,5 MgCl<sub>2</sub>, pH=7,4 (34±2 мосмоль/кг H<sub>2</sub>O).

**Таблица 2.2. Составы гипотонических растворов #5, использованных в исследовании роли ионов калия.**

№	#5-Норм. Рингер (мл)	#5-К- Рингер (мл)	Осмоляль- ность (мосмоль /кг H <sub>2</sub> O)	% гипотонич- ности	[K <sup>+</sup> ] (мм)
1	10	0	141,4	48,8	5,00
2	8	2			20,4
3	6,5	3,5			35,9
4	4,5	5,5			51,3
5	3,5	6,5			66,7
6	2,5	7,5			82,1

**Таблица 2.3. Состав и осмотичность гипотонических растворов на основе Рингера-140**

№	Рингер (мл)	H-буфер (мл)	Конечная осмотич- ность (мосмоль/кг -H <sub>2</sub> O)	Осмотичес- кий градиент (мосмоль/кг -H <sub>2</sub> O)
1	7	0	300	0
2	6	1	262	38
3	5	2	224	76
4	4	3	186	114
5	3	4	148	152
6	2	5	110	190

### **§2.2. Описание растворов для экспериментов по микролокальному отведению ионных токов (пэтч-кламп)**

В экспериментах по микролокальному отведению ионных токов (пэтч-кламп), если специально не указано, ячейка обычно заполнялась нормальным раствором Рингера такого же состава, как описано в § 2.1.

Составы растворов для этой серии экспериментов основывались на общих физико-химических принципах электрофизиологического эксперимента (Sabirov et al., 2017).

В экспериментах в конфигурации *whole-cell* пипетки заполнялись раствором следующего состава (в мМ): 125 CsCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 5 HEPES (pH 7,4 доведен с помощью CsOH), и 10 ЭГТА (этиленгликоль тетраацетат) (pCa=7,65; 275 мосмоль/кг-H<sub>2</sub>O). В некоторых экспериментах Na<sub>2</sub>ATP не был добавлен (это специально указано при описании соответствующих результатов). Гипертонический пипеточный раствор для конфигурации *whole-cell* (320 мосмоль/кг-H<sub>2</sub>O) получали добавлением 50 мМ маннитола. В экспериментах по определению проницаемости мембраны к глутамату, внеклеточный раствор с низким содержанием хлора был приготовлен путем эквимольной замены 135 мМ NaCl в нормальном растворе Рингера на 135 мМ Na-глутамата. При определении проницаемости к аспартату, внутриклеточный раствор с низким содержанием хлора был приготовлен путем замены 100 мМ CsCl в пипеточном растворе на 100 мМ Cs-аспартат.

В экспериментах по определению проницаемости мембраны к глутатиону (GSH), внеклеточный раствор с низким содержанием хлора был приготовлен путем эквимольной замены 135 мМ NaCl в нормальном растворе Рингера на 135 мМ Na-GSH, а внутриклеточный раствор с низким содержанием хлора был приготовлен путем замены 100 мМ CsCl в пипеточном растворе на 100 мМ Cs-GSH.

В экспериментах в конфигурации *on-cell* для регистрации одиночных каналов ОЗАК, клетки инкубировались в ячейке в гипотоническом растворе с высоким содержанием K<sup>+</sup> следующего состава (в мМ): 100 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 Na-HEPES, 6 HEPES, и 5 глюкозы (pH 7,4, 218<sub>±</sub>4 мосмоль/кг-H<sub>2</sub>O). Пипетки заполнялись раствором, содержащим (в мМ): 100 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> и 5 HEPES (pH 7,4 доведен CsOH, 208<sub>±</sub>3 мосмоль/кг-H<sub>2</sub>O). В некоторых экспериментах концентрация CsCl была уменьшена до 30 мМ, или CsCl был заменен на эквимольную концентрацию ТЭАСl (тетраэтиламмония хлорид).

Блокатор DCPIB (4-[(2-бутил-6,7-дихлоро-2-циклофенил-2,3-дигидро-1-оксо-1*H*-инден-5-ил)оксо]-бутановая кислота) был приобретен из фирмы TOCRIS Biosciences (Бристоль, Великобритания). DIOA (R(+)-бутилиндазон, R-(+)-[(2-*n*-бутил-6,7-дихлоро-2-циклофенил-2,3-дигидро-1-оксо-1*H*-инден-5-ил)окси] ацетат), флоретин (3-(4-гидроксифенил)-1-(2,4,6-тригидроксифенил) пропан-1-он), SITS (4-ацетамидо-4'-изотиоцианато-2,2'-стильбенсульфоновая кислота), GdCl<sub>3</sub>, HEPES (2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил] этансульфоновая кислота) и ЭГТА были приобретены в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США). Остальные реактивы были отечественного производства градации «х.ч.» или «ч.д.а.» и использовались без дополнительной очистки.

GdCl<sub>3</sub> хранили в виде 50 мМ исходного раствора в воде и добавляли в раствор Рингера непосредственно перед каждым экспериментом. Остальные блокаторы и ингибиторы добавлялись в экспериментальные растворы непосредственно перед использованием из маточных растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО). Конечное содержание ДМСО не превышало 0,1%, и при этой концентрации сам растворитель не оказывал существенного влияния на регистрируемые параметры.

### **§2.3. Описание методов получения лимфоцитов из тимуса крыс и мышей**

Методы получения взвеси лимфоидных клеток подробно описаны в работе (Клаус, 1990). Ниже приводится метод получения суспензии Т-лимфоцитов из тимуса мыши. Размер тимуса крысы существенно больше, чем у мыши. Поэтому, в случае крысы все объемы были увеличены в 2-3 раза, либо использовалась только часть тимуса, так как выход клеток достаточно большой. Использовались молодые животные (около 6 недель), так как с возрастом тимус уменьшается. Следует также учитывать, что размер тимуса и, следовательно, выход клеток сильно уменьшаются у нездоровых и плохо ухоженных животных. Клетки выделялись по следующим этапам:

1. Перед экспериментом в некоторых случаях вводили гепарин для предотвращения свертывания крови. Для анестезии, в стеклянный

сосуд с крышкой наливали примерно 1 мл галотана (2-бром-2-хлор-1,1,1-трифторэтан; SIGMA кат. № В4388) и помещали туда мышь, которая засыпала через короткое время (10-20 с). Мышь забивали цервикальной дислокацией (раздвижением шейных позвонков): прижать животное к крышке клетки (можно придерживать головку карандашом) и удерживая ее за основание хвоста, резко дернуть. Смерть наступает мгновенно и безболезненно.

2. Животное фиксировали на препаровальном столике, вырезали тимус, тщательно очищали его от кровеносных сосудов и помещали в холодный раствор Рингера в 10 см чашке Петри.

3. Подготавливали пластиковый одноразовый шприц на 1 мл, отрезав его кончик (на отметке 0,1 мл) бритвой, а также нейлоновую сетку с отверстиями 100 мкм и 1 пробирку Эппендорфа на 1,5 мл.

4. Используя часовые пинцеты, тщательно очищали тимус от кровеносных сосудов и прополаскивали в Рингере.

5. Переносили тимус в 35 мм чашку Петри (на льду), в которую было предварительно налито около 0,5 мл Рингера, и расщипывали его пинцетами до получения однородной массы. Раствор при этом становится мутным – это тимоциты выходят из стромы тимической ткани. (Эту стадию можно делать и на обычном тефлоновом блоке).

6. Насаживали на конец шприца нейлоновую сетку и фиксировали ее кусочком гибкой силиконовой трубки. На измельченный тимус наносили около 0,5 мл раствора Рингера, переносили все это в шприц и отфильтровывали, протолкнув взвесь через сетку с помощью пестика шприца.

7. Суспензию осаждали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 5 минут. Супернатант сливали, а осадок промывали 1 раз раствором Рингера и ресуспендировали клетки в 0,5 мл Рингера.

8. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева и суспензию разводили до конечной концентрации 100 млн кл/мл раствором. Клетки хранили на льду.

*Примечания.* Нейлоновую сетку (нарезанную на квадратики размером около 3х3 см) надо промыть водой, затем спиртом, и дать

спирту высохнуть, оставив на воздухе на несколько часов (или на ночь). Готовую суспензию нужно проверить под микроскопом на наличие сгустков (погибшие клетки). Если они есть, то после ресуспендирования взвесь оставить на льду на 15-20 мин (чтобы сгустки осели) и отобрать верхнюю часть. При осторожном выделении сгустков практически не бывает.

#### **§2.4. Описание клеточных линий, использованных в экспериментах ПЭТЧ-кламп**

Линию клеток L929 и L929-TNF фибросаркомы мыши выращивали в среде RPMI 1640 (Nissui Pharmaceutical, Токио, Япония), в которую дополнительно были добавлены 0,1 мг/мл стрептомицина и 40 Ед/мл пенициллина, а также 10 % эмбриональной сыворотки теленка. Клеточные линии мышей C127 (рак молочной железы), C1300 (нейробластома) и B16 (меланома) культивировались в среде ДМЕМ с добавкой 5-10% сыворотки зародыша теленка. Клетки содержались при 37°C в инкубаторе в среде 5% CO<sub>2</sub>. Линия моноцитов человека U937 культивировалась в условиях, аналогичных L929. По мере необходимости, клетки пассировались каждые 2-4 дня.

Для проведения электрофизиологических экспериментов клетки отслаивались от подложки легкой трипсинизацией (10 с) и пипетированием, переносились в стерильные плоскодонные стеклянные сосуды на 10 мл и культивировались в суспензии при осторожном перемешивании. Клетки использовались в течение 3-5 часов. В некоторых экспериментах клетки высаживались на стеклянные покровные стекла, вырезанные по размеру электрофизиологической ячейки, и использовались в прикрепленном к подложке состоянии. Клетки U937 исходно находятся в суспензии и, следовательно, вносились в экспериментальную ячейку в виде аликвоты среды культивирования после легкого пипетирования.

Рандомный мутагенез клеток L929-TNF проводился с помощью ретровирусной трансфекции вектором pDisrup как описано ранее (Wang et

al., 2001; Ono et al., 2004). Все работы по получению мутантных клеток с выбитыми генами были проведены в лаборатории профессора Ко Оно (Koh Ono) из Киотского Университета, Япония.

### **§2.5. Определение жизнеспособности тимоцитов**

Метод основан на том, что нейтральный водорастворимый краситель трипановый синий не проникает через клеточную мембрану и поэтому способен окрашивать цитозоль только погибших клеток (у которых мембрана уже не может выполнять роль барьера), но не в здоровые клетки. Следует однако учитывать, что и в нормальных клетках с определенной скоростью происходит захват внеклеточных веществ с помощью эндоцитоза, поэтому окрашивание трипановым синим следует проводить достаточно быстро. Трипановый синий использовали в виде 0,2% раствора в Рингере или в фосфатном буфере, дополнительно содержащим 3 мМ азида натрия. Раствор трипанового синего готовили продолжительным перемешиванием, после которого агрегаты красителя удаляли центрифугированием (10 мин при 3000 об/мин).

*Ход определения.* В стандартную пробирку вносили 10 мкл клеточной взвеси, разведенной до концентрации около  $10 \times 10^6$  клеток/мл и 10 мкл раствора трипанового синего. Ресуспендировали клетки пипетированием. Без промедления вносили каплю клеточной взвеси в камеру Горяева и оставляли примерно на 1 мин, чтобы клетки осели на дно. В течение следующих 3 мин подсчитывали 100 клеток, отмечая голубые (погибшие) и неокрашенные (живые) тимоциты. Обычно клеточные суспензии содержали не более 5% погибших клеток.

### **§2.6. Регистрация объема клеток по светопропусканию**

Метод регистрации клеточного объема по величине светопропускания (Hempling et al., 1977; Sabirov et al., 1993; Kurbannazarova et al., 2003) основан на том, что суспензия клеток рассеивает свет, проходящий через нее, в результате чего интенсивность прошедшего света ( $I$ ) значительно меньше интенсивности входящего

света ( $I_o$ ). Светопропускание ( $T$ ) суспензии клеток определяется соотношением:

$$T = \frac{I}{I_o} \times 100\% \quad (2.2)$$

При изменении объема клеток происходит изменение эффективного сечения клеток, что отражается на величине светопопускания. Поскольку некоторые типы клеток могут поглощать свет в видимой области спектра (например, эритроциты окрашены в красный свет вследствие поглощения в области 540 нм), то для регистрации изменений клеточного объема использовали более длинноволновую область ( $> 600$  нм). Мы регистрировали объем тимоцитов в проходящем свете с помощью микроколориметра МКМФ-1. Использовали светофильтр с максимумом пропускания при 610 нм. Общая схема установки показана на рис. 2.1. Изменение объема тимоцитов регистрировали в проходящем свете в термостатированной кювете, и сигнал, измеренный с помощью микроколориметра, усиливали с помощью усилителя У5-11, оцифровывали с помощью аналого-цифрового преобразователя GO!Link (Qubit Systems, Канада) и записывали на жёсткий диск компьютера (Pentium IV) с помощью программы Logger Lite (Qubit Systems, Канада) при частоте стробирования 100 Гц.

В ходе эксперимента, 900 мкл среды, содержащей нормальный раствора Рингера (контроль), либо другие тестируемые растворы, вносили в стеклянную или кварцевую кювету, термостатированную при 25°C с помощью проточной бронзовой рубашки, соединенной с водяным термостатом (U-3, Германия). После уравнивания в течение 10 мин, в ячейку вносили аликвоту (100 мкл) клеточной суспензии (конечная концентрация клеток  $10 \times 10^6$  кл/мл). Блокаторы и ингибиторы добавлялись из концентрированных исходных растворов в ДМСО.

Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,1%, и при этой концентрации сам растворитель не оказывал никакого эффекта на регистрируемые параметры. Эффект растворителя в данной используемой концентрации проверялась в контрольных экспериментах.

Водорастворимые ингибиторы, такие, как например хлористые барий и гадолиний добавляли из концентрированных (в 100-1000 раз) растворов в воде или Рингере.

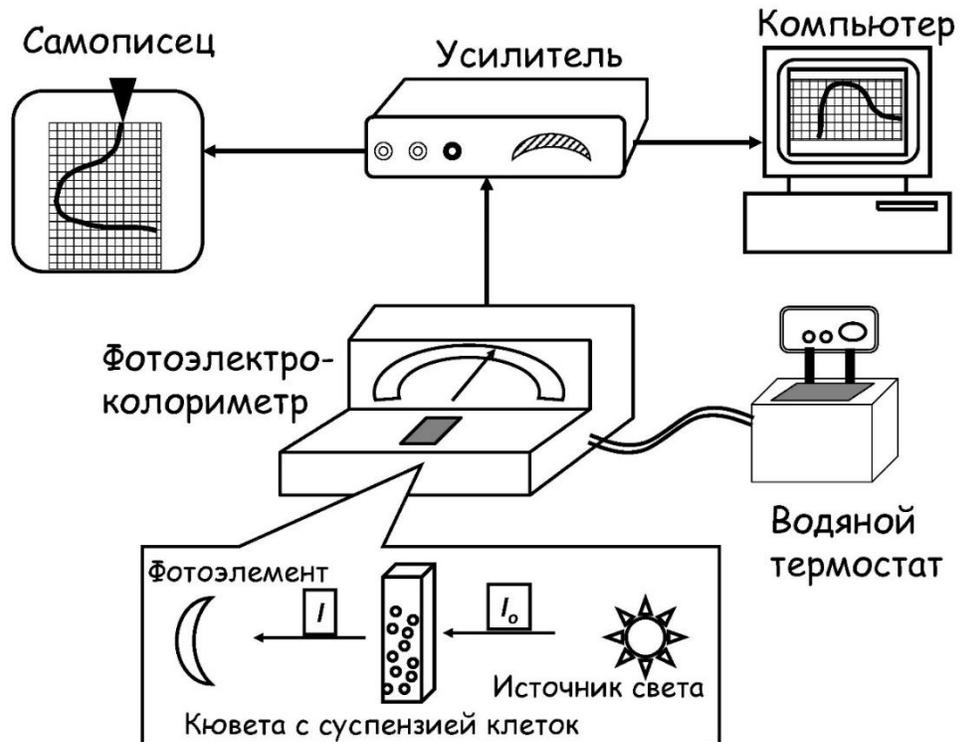


Рис. 2.1.

**Схематическое изображение установки для регистрации изменения клеточного объема путём измерения светопропускания клеточной суспензии.**

### §2.7. Метод микролокального отведения ионных токов (пэтч-кламп).

Пэтч-кламп электроды были изготовлены из боросиликатного стекла с использованием механической кузницы PP-830 (Narishige, Япония) или P-97 (Sutter Instrument, Novato, США) и имели, после заполнения пипеточным раствором, сопротивление кончика 2-5 МΩ. Мембранные токи измерялись с помощью операционного усилителя EPC-9 Patch-Clamp системы (HeKa- Electronics, Lambrecht/Pfalz, Германия). Мембранный потенциал контролировался путем смещения потенциала пипетки и считался положительным для *whole-cell* конфигурации и отрицательным

для cell-attached и inside-out конфигураций. Токи фильтровались с частотой 1 кГц и оцифровывались с частотой 5-10 кГц. Запись и анализ данных проводились с помощью программного обеспечения Pulse+PulseFit (Нека-Electronics, Германия). Во всех экспериментах со сменой раствора, при которых менялась концентрация ионов хлора, использовался электрод сравнения с солевым мостиком, содержащим 3 М KCl в 2% агарозном геле, что сводило к минимуму артефакты, связанные с диффузионными потенциалами жидкостного контакта, возникающие при смене растворов с различным ионным составом. Потенциалы жидкостного контакта между пипеточными растворами и растворами в ячейке рассчитывались с использованием программы pCLAMP 8.1 (Axon Instruments, Foster, CA, США) и компенсировались либо по ходу эксперимента, либо при обработке экспериментальных данных.

Все эксперименты проводились при комнатной температуре (23 - 25°C).

## **§2.8. Получение общего экстракта флавоноидов и определение их концентрации**

### *Получение экстракта.*

Отвешивали 0,5 г сухого хорошо измельченного растительного сырья. Помещали его в круглодонную колбу на 50 мл и заливали 10 мл 80% го этанола. Встряхивали примерно 1 мин и затем помещали в ультразвуковую баню на 20-30 мин. Взвесь отфильтровывали через бумажный фильтр и использовали фильтрат для дальнейшей работы.

### *Определение общего содержания флавоноидов.*

Метод определения содержания флавоноидов в экстрактах адаптировали по ранее опубликованным методикам (Zhishen et al., 1999; Marinova et al., 2005; Samatha et al., 2012).

Реагенты (использовали пластиковые пробирки на 14 мл):

- 1) 10 %  $AlCl_3$ : 1 г соли + 9 мл  $H_2O$ .
- 2) 5 %  $NaNO_2$ : 0,5 г соли + 9,5 мл  $H_2O$ .

- 3) 1М NaOH: 400 мг NaOH + 10 мл H<sub>2</sub>O.  
 4) Стандарт кверцетина: 1 мг + 1 мл 80% го этанола=1000 мкг/мл

*Микрометод:*

100 мкл экстракта (или стандартного раствора кверцетина, 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл) вносили в стеклянную пробирку (или эппендорф на 1,5 мл), содержащую 400 мкл воды. Затем добавляли 30 мкл 5%го раствора нитрита натрия (NaNO<sub>2</sub>). Через 5 минут добавляли 30 мкл 10%го раствора треххлористого алюминия (AlCl<sub>3</sub>). Через 6 минут добавляли 200 мкл 1 М NaOH, доводили общий объем до 1 мл водой и тщательно перемешивали. В присутствии флавоноидов раствор окрашивается в красновато-жёлтый цвет. В контрольную пробирку вносили все компоненты за исключением кверцетина. Измеряли оптическое поглощение при 510 нм относительно контроля. По разным концентрациям кверцетина строили калибровочную кривую. Общее содержание флавоноидов выражали в миллиграммах кверцетинового эквивалента на мл экстракта и рассчитывали по формуле:

$$C_{экстр} = C_{кв} (A_{экстр}) / (A_{кв}) \quad (2.3)$$

Здесь:  $C_{экстр}$  – концентрация флавоноида в экстракте,  $C_{кв}$  – концентрация кверцетина,  $A_{экстр}$  – оптическая плотность экстракта  $A_{кв}$  – оптическая плотность кверцетина.

## §2.9. Математическая обработка результатов экспериментов

Амплитуды одиночных каналов измерялись вручную, установкой курсора на открытые и закрытые уровни каналов. Потенциалы реверсии были рассчитаны путем построения вольтамперных  $i$ - $V$  характеристик и их аппроксимацией полиномом второго порядка так, как описано ранее (Sabirov and Okada, 2004):

$$i = A + B_1 V + B_2 V^2 \quad (2.3)$$

где  $i$  – ток,  $V$  – потенциал.

Потенциалы реверсии ( $E_{rev}$ ) рассчитывались решением квадратного уравнения:

$$A + B_1 V + B_2 V^2 = 0 \quad (2.4)$$

$$E_{rev} = 2 A / [-B_1 - (B_1^2 - 4 B_2 A)^{1/2}] \quad (2.5)$$

где  $A$ ,  $B_1$  и  $B_2$  – параметры полинома.

В некоторых случаях (например, для рамп-ответов) потенциалы реверсии определялись напрямую из зависимости тока от напряжения.

Отношение проницаемости для органического аниона  $X^-$  (глутамат $^-$ , глутатион $^-$ ) рассчитывалось из сдвига потенциала реверсии в ответ на замену ионов с использованием уравнения Гольдмана-Ходжкина-Каца следующего вида:

$$E_{rev} = -RT/F \ln [(P_{Cl}[Cl]_o + P_X[X]_o)/(P_{Cl}[Cl]_i + P_X[X]_i)] \quad (2.6)$$

где  $E_{rev}$  – потенциал реверсии;  $[Cl]_o$  и  $[Cl]_i$  – концентрации ионов  $Cl^-$  во внеклеточной и внутриклеточной среде, соответственно;  $[X]_o$  и  $[X]_i$  – концентрации органического аниона  $X^-$  во внеклеточной и внутриклеточной среде, соответственно (см. составы растворов в соответствующих экспериментальных условиях);  $P_{Cl}$  и  $P_X$  – коэффициенты проницаемости для  $Cl^-$  и органического аниона  $X^-$ , соответственно.

Концентрационные зависимости влияния испытуемых экстрактов на регуляцию объема тимоцитов аппроксимировали с помощью уравнения Хилла следующего вида:

$$RVD = RVD_{min} + (RVD_{max} - RVD_{min}) / (1 + (C/C_{50})^h) \quad (2.7)$$

Здесь:  $RVD_{min}$  и  $RVD_{max}$  – минимальная и максимальная величина регуляторного уменьшения объема тимоцитов (%),  $C$  – концентрация вещества (мкМ),  $C_{50}$  – концентрация вещества, оказывающая полумаксимальный эффект (мкМ),  $h$  – коэффициент Хилла.

Экспериментальные данные анализировались с использованием программы Origin, версии 5-8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка для  $n$  экспериментов. Сравнения между двумя экспериментальными группами проводились с использованием t-теста Стьюдента или вариационного анализа (стандартный алгоритм ANOVA программы Origin). Различия считались статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

## **ГЛАВА III. ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ ИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА**

Плюрипотентные клетки костного мозга, попадая из кровотока в тимус, проходят сложный и до конца не изученный процесс положительного и отрицательного отбора, в ходе которого нереактивные и аутореактивные клетки отбраковываются и гибнут путем апоптоза, а зрелые неаутореактивные клетки, экспрессирующие на своей поверхности Т-рецептор, функционируют далее в качестве периферических Т-лимфоцитов. При прохождении по мелким сосудам, обволакивающим нефроны, легочный или кишечный эпителию, лимфоциты испытывают осмотический дисбаланс различной степени и поэтому должны поддерживать постоянство объема с помощью сложной системы регуляции клеточного объема. В условиях гипоосмотичности зрелые периферические лимфоциты быстро набухают и затем медленно сжимаются с помощью системы регуляторного уменьшения объема. Хотя наличие системы регуляции объема незрелых тимоцитов и было показано ранее, ионные механизмы этого процесса остаются мало изученными. Имеющиеся в литературе данные предполагают, что в случае тимоцитов набухание приводит к активации системы электронейтрального котранспорта ионов калия и хлора.

### **§3.1. Роль внеклеточных одновалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе**

Ионный состав внеклеточной среды является определяющим фактором в регуляции клеточного объема. Ионы натрия – основные внеклеточные катионы и, совместно с противоионами (в основном это хлорид), определяют внеклеточную осмотичность. В изотонической среде, содержащей 135 мМ NaCl (нормальный раствор Рингера), клетки имели стабильный объем, который не менялся на протяжении всего эксперимента (20-30 мин), как это показано на рис. 3.1: А. Следует отметить, что стабильное значение величины светопропускания суспензии

тимоцитов в изотоническом растворе в течение 20-30 мин указывает на то, что скорость осаждения клеток незначительна и не вносит вклад в регистрируемую величину светопропускания в наших экспериментальных условиях. Так как осмотическое набухание клеток и последующее регуляторное уменьшение объема происходит в пределах этого временного интервала, мы не использовали активное перемешивание клеточной суспензии, которое могло приводить к механическому повреждению клеток и к артефактам, связанным с механо-зависимым выбросом внутриклеточных метаболитов, таких как АТФ, аминокислоты, глутатион, и др.

При попадании в среду с низким содержанием NaCl и, соответственно, низкой тоничностью, клетки сначала набухают, затем медленно восстанавливают свой объем. Этот процесс проиллюстрирован на рис. 3.1: А. Как набухание клеток, так и их последующее сжатие зависело от величины осмотического градиента через плазматическую мембрану.

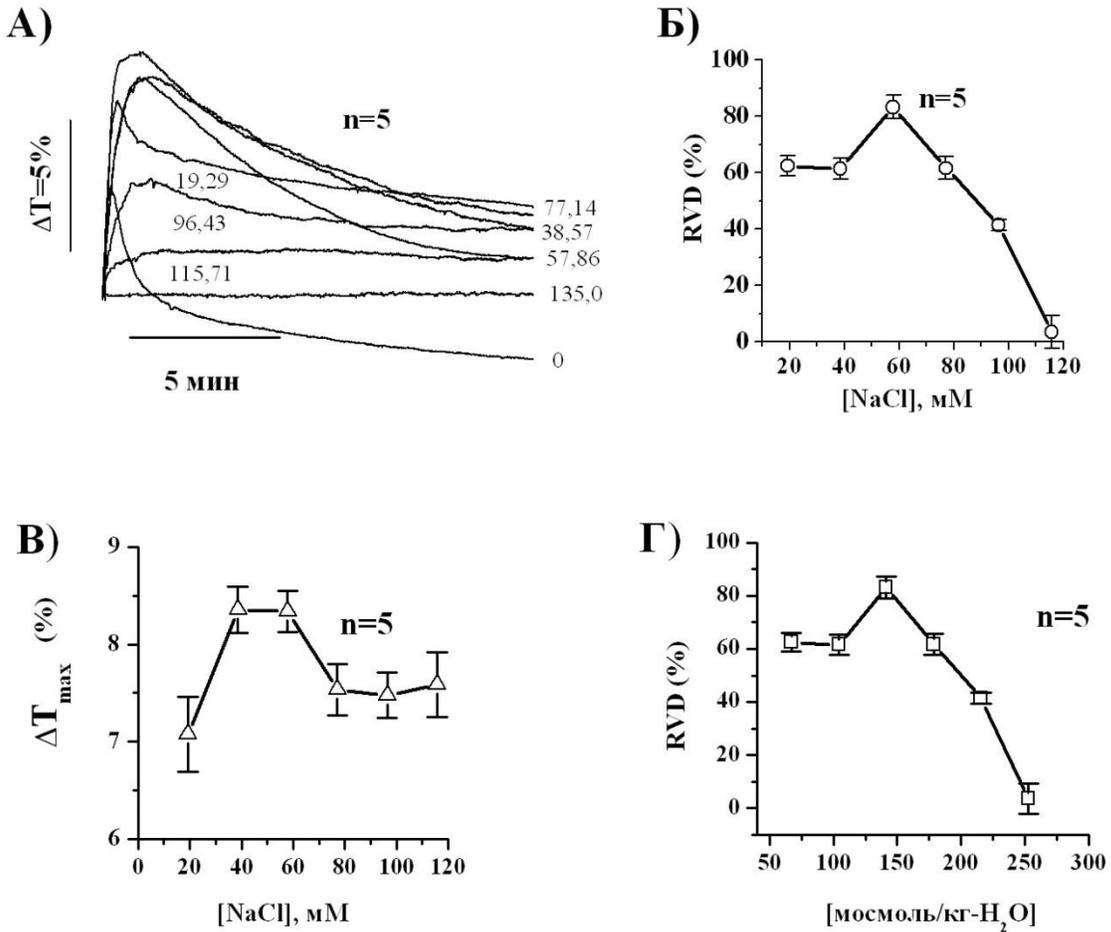
Для количественной характеристики процесса восстановления клеточного объема в условиях гипоосмотического стресса мы использовали параметр RVD, который рассчитывался по следующей формуле:

$$RVD = \frac{T_{\text{макс}} - T_{15}}{T_{\text{макс}} - T_0} \times 100\% \quad (3.1)$$

где  $T_0$  и  $T_{\text{макс}}$  - начальное и максимальное значение светопропускания,  $T_{15}$  - значение светопропускания, измеренное через 15 мин после начала гипотонического стресса. При полном восстановлении клеточного объема до исходного уровня  $RVD=100\%$ . При полном подавлении регуляции объема  $RVD=0$ .

Зависимость эффективности восстановления объема тимоцитов от концентрации во внеклеточной среде NaCl была немонотонной и имела выраженный пик при  $[NaCl]=57,9$  мМ (рис. 3.1: Б). Как уменьшение, так и увеличение содержания в среде NaCl по сравнению с этим оптимальным значением приводило к заметному ухудшению эффективности регуляции

объема клеток. Интересно, что максимальное измеренное в эксперименте увеличение объема (пропорциональное величине  $\Delta T_{\max}$  на рис. 3.1: В) также не было монотонным и имело максимум при  $[\text{NaCl}] = 40\text{--}60$  мМ.



**Рис. 3.1.**

**Роль ионов натрия в регуляции объема тимоцитов.**

Изменение клеточного объема регистрировалось в нормальном растворе Рингера и в растворах Рингера с различным содержанием NaCl (концентрация указана у соответствующих записей и отложена на абсциссе панелей Б и В). Здесь и далее  $\Delta T_{\max}$  означает максимальное изменение светопропускания при набухании. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2016)

Такая зависимость отличается от ожидаемого изменения объема согласно закону Вант-Гоффа, который предсказывает монотонный рост:

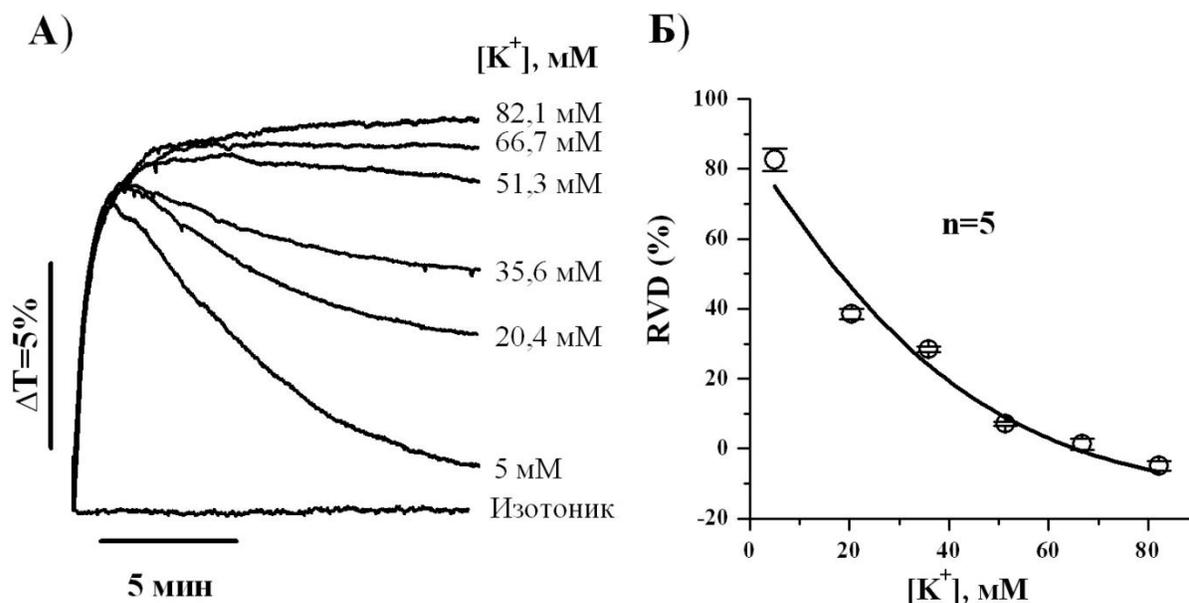
$$\pi(V_c - b) = nRT \quad (3.2)$$

$V_c$  и  $b$  - осмотически активная и неактивная часть клеточного объема;  $n$  — число молей осмотически активного компонента цитоплазмы;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура.

Причина отклонения зависимости  $\Delta T_{\max}$  от  $[\text{NaCl}]$  и, соответственно, от осмотического давления среды, заключается, по нашему мнению, в наличии системы регуляторного уменьшения объёма, которая не даёт клетке достигнуть максимального объема, не совместимого с её целостностью и выживанием в условиях гипоосмотического стресса. Зависимость параметра RVD от осмотичности среды (рис. 3.1: Г) полностью повторяла форму зависимости этого параметра от концентрации хлорида натрия, что свидетельствует о том, что ионы натрия и хлора являются основными внеклеточными осмолитами в этих экспериментальных условиях и что они практически не проникают через плазматическую мембрану тимоцитов и полностью отражаются от нее, что соответствует коэффициенту отражения Ставермана  $\sigma$  см. (Sabirov et al., 1993; Hoffmann et al., 2009) близкому к единице.

В большинстве животных клеток движущей силой процесса восстановления объема клетки в гипоосмотических условиях является градиент ионов калия (Wehner et al., 2003; Hoffmann et al., 2009). В наших экспериментах мы наблюдали постепенное уменьшение эффективности регуляторного уменьшения клеточного объема в гипоосмотической среде при замене ионов натрия на эквимоллярное количество калия. При этом, полное исчезновение фазы восстановления клеточного объема наблюдалось при концентрации ионов калия в среде 66,7 мМ (рис. 3.2). Таким образом, наши данные подтверждают более ранние наблюдения на тимоцитах о решающей роли калиевого градиента как движущей силы

процесса восстановления объема при гипоосмотическом стрессе (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993).



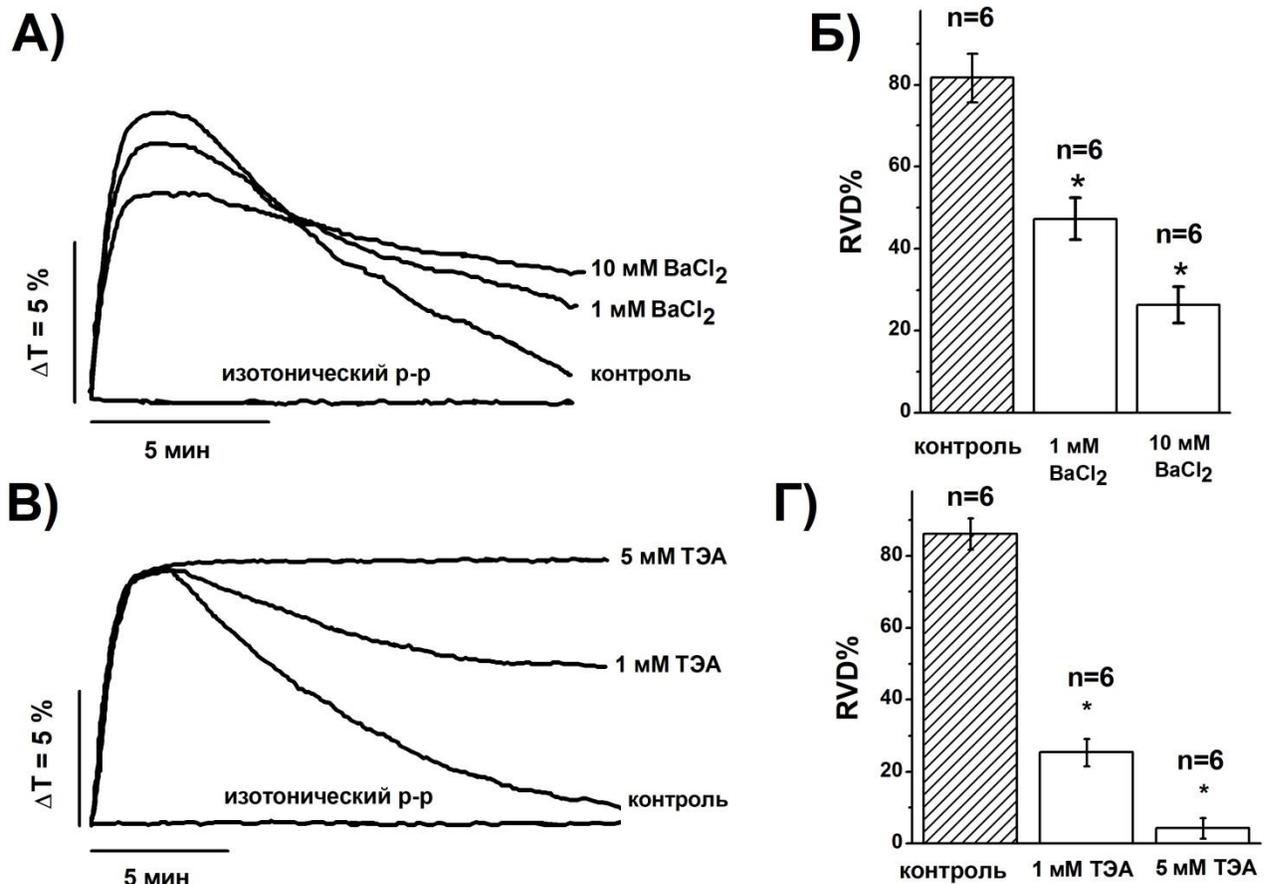
**Рис. 3.2.**

**Роль ионов калия в регуляции объема тимоцитов.**

Использованы растворы, состав которых описан в таблице 2.2.

(Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2016)

Полное подавление регуляции клеточного объема в высококалийевых средах свидетельствует о том, что нетто-поток ионов калия и сопряженный поток анионов (хлорида и других внутриклеточных анионов) и эквивалентный этому потоку перенос воды приводят к активному сжиманию клетки после ее пассивного осмотического набухания. Ключевым является вопрос о транспортных путях, обеспечивающих эти нетто-потоки. Ионы K<sup>+</sup> могут транспортироваться как по ионным каналам, так и с помощью транспортеров, таких как системы сопряженного ко-транспорта K/Cl или Na/K/2Cl.



**Рис. 3.3.**

**Влияние блокаторов калиевых каналов, ионов  $Ba^{2+}$  (А, Б) и ТЭА (В, Г), на регуляцию объема тимоцитов.**

Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3). Звёздочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2008)

В наших экспериментах мы использовали блокаторы калиевых каналов широкого спектра действия: ионы бария и тетраэтиламмония. Было установлено, что 1 mM  $BaCl_2$  значительно подавлял фазу сжатия тимоцитов после гипотонической стимуляции (рис. 3.3: А и Б). Ионы ТЭА<sup>+</sup> по эффективности превосходили ионы  $Ba^{2+}$  и при 5 mM полностью останавливали регуляторное уменьшение объема (рис. 3.3: В и Г). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что ионы калия при

гипотонической стимуляции выбрасываются через селективные калиевые каналы. Этот вывод противоречит гипотезе о ключевой роли сопряженного K/Cl котранспортера в этом процессе, сделанный ранее на основе анализа сопряженных потоков  $K^+$  и  $Cl^-$  и эффективном подавлении процесса регуляции объема тимоцитов единственным доступным в настоящее время избирательным ингибитором системы сопряженного K/Cl котранспортера – соединением DIOA (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993).

### **§3.2. Роль внеклеточных двухвалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе**

Тимоциты, помещенные в гипотоническую Ca-содержащую среду, быстро набухали и затем медленно восстанавливали свой объем (рис. 3.1: А). В среде без кальция клетки сохраняли способность регулировать свой объем, однако эффективность этого процесса была несколько понижена (рис. 3.4: А и Б). Регуляторное уменьшение объема, определенное спустя 15 мин после начала стимуляции, монотонно росло с повышением концентрации ионов кальция во внеклеточной среде вплоть до 10 мМ. При этом степень максимального набухания тимоцитов (параметр  $\Delta T_{max}$ ) была практически не чувствительна к ионам кальция в исследованном диапазоне концентраций (рис. 3.4: В). В случае ионов магния поведение тимоцитов было другим. Эффективность регуляторного уменьшения объема была максимальной при нормальном содержании магния во внеклеточной среде (1 мМ) и ухудшалась как при понижении, так и при повышении концентрации магния (рис. 3.5: А и Б). Вопреки ожиданиям, степень максимального набухания тимоцитов (параметр  $\Delta T_{max}$ ) закономерно росла с увеличением концентрации ионов  $Mg^{2+}$  в среде (рис. 3.5: В). Причина такого поведения клеток остается неизвестной. Мы предполагаем, что внеклеточный магний может активировать транспортные пути для ионов натрия, что будет приводить к понижению эффективного внеклеточного осмотического давления вследствие понижения коэффициента отражения Ставермана  $\sigma$ . Это приведет к

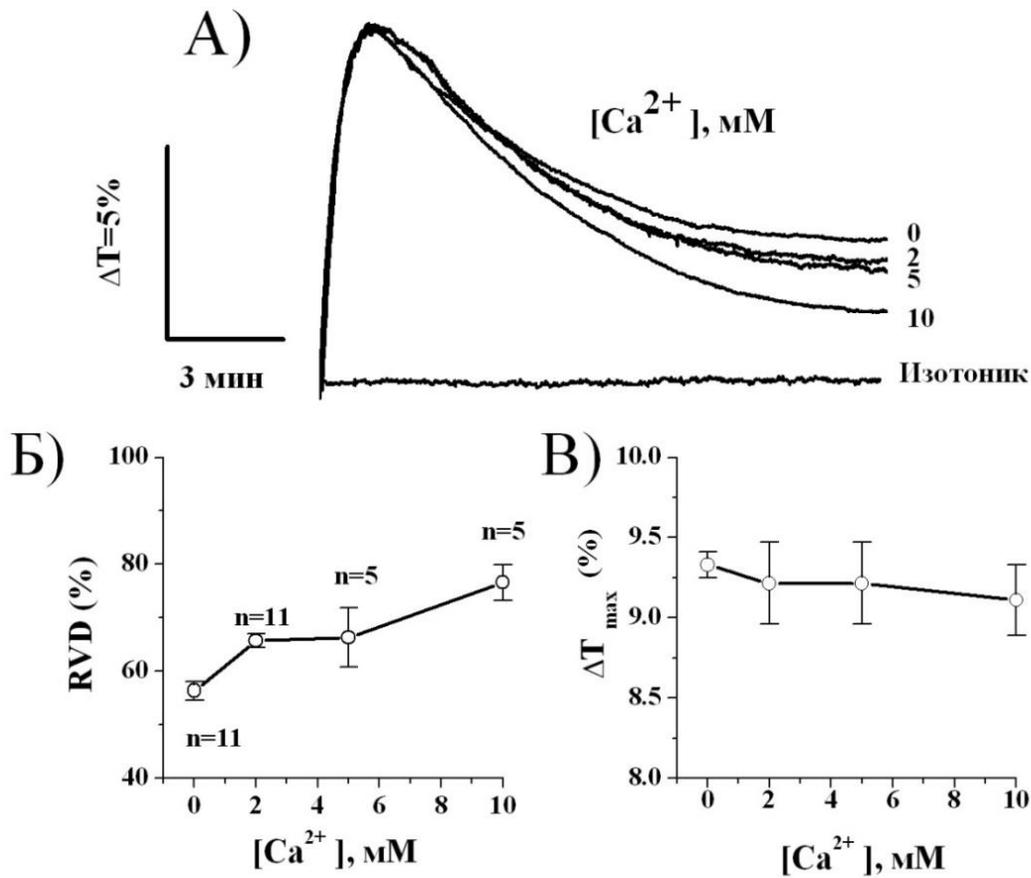
увеличению эффективного осмотического градиента и, соответственно, к большей степени набухания клеток.

Роль внутриклеточных ионов кальция исследовали в экспериментах по хелатированию с помощью комплексона ВАРТА. Отметим, что в этой серии экспериментов, мы использовали мембранопроникающую эстрифицированную форму комплексона (ВАРТА-АМ), которая, после гидролиза внутриклеточными гидролазами, переходит в активную непроникающую форму (ВАРТА), которая удерживается внутри клетки. Поэтому, влиянием комплексона на внеклеточную концентрацию ионов кальция можно было пренебречь. Обработка клеток ВАРТА-АМ приводила к доза-зависимому подавлению регуляции объема тимоцитов (рис. 3.6: А и В). Так, параметр RVD снизился примерно на 20% при инкубации клеток в присутствии 50 мкМ ВАРТА, и примерно на 50% при концентрации ВАРТА 100 мкМ (рис. 3.6: В).

Активация процесса регуляции клеточного объема внеклеточными ионами  $Ca^{2+}$  и его подавление хелатированием внутриклеточного  $Ca^{2+}$  свидетельствует о том, что гипотонический стресс вызывает активацию транспортных путей для ионов кальция через плазматическую мембрану. Одним из путей поступления ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоль могут быть кальциевые каналы плазматической мембраны тимоцитов. В наших экспериментах мы использовали два типа блокаторов кальциевых каналов: это дигидропиридиновое производное нифедипин, и верапамил, который относится к фенилалкиламинам. Нифедипин слабо, но статистически значимо ослаблял способность тимоцитов регулировать свой объём (рис. 3.7: А и Б). Верапамил был более эффективен и при концентрации 100 мкМ практически полностью предотвращал фазу сжимания клеток (рис. 3.7: В и Г).

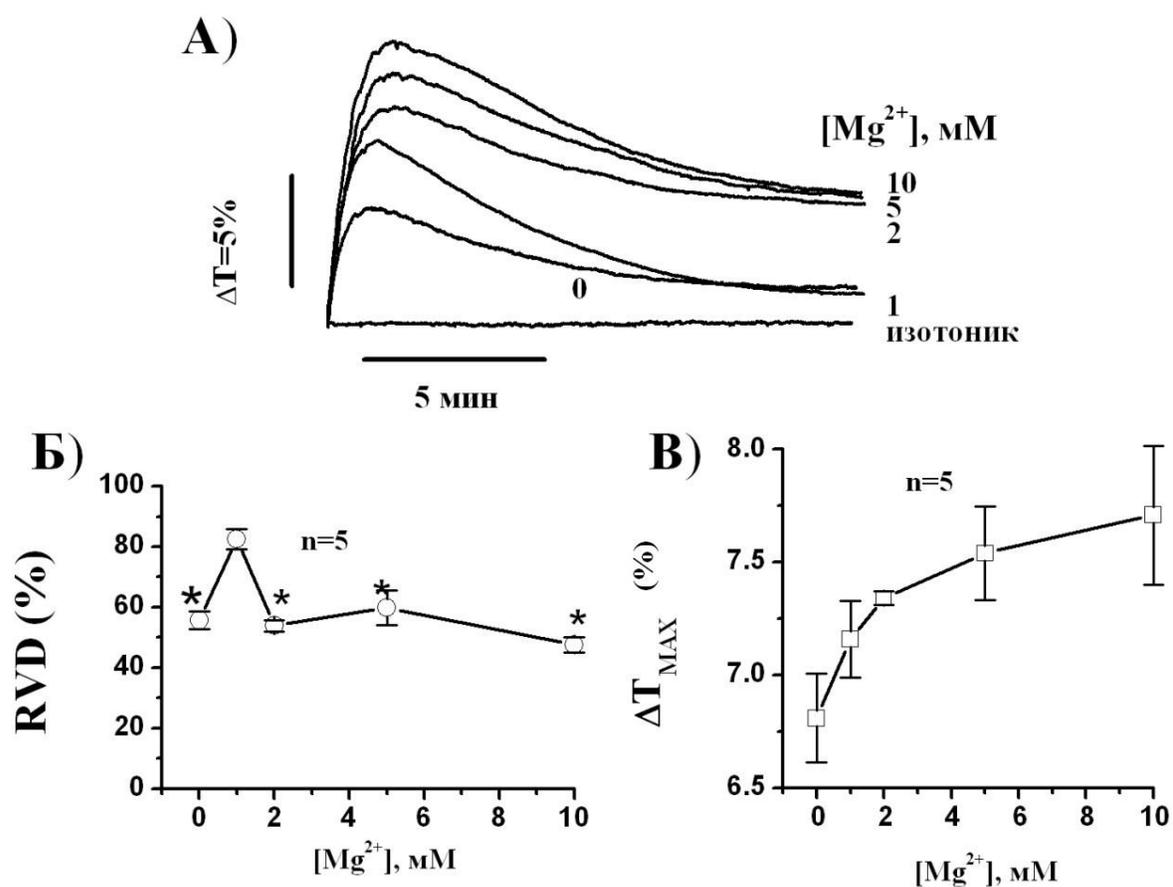
Так как оба вещества являются блокаторами Са-каналов L-типа, мы предполагаем, что именно этот тип каналов участвует в повышении цитозольного кальция при гипотоническом стрессе, однако тот факт, что нифедипин оказывал лишь небольшое влияние на общий процесс может указывать на вклад также и других Са-проводящих каналов (таких например, как неселективные катионные каналы типа CRAC или TRP,

либо на высвобождение кальция из внутриклеточных депо эндоплазматического ретикулума и/или митохондрий.



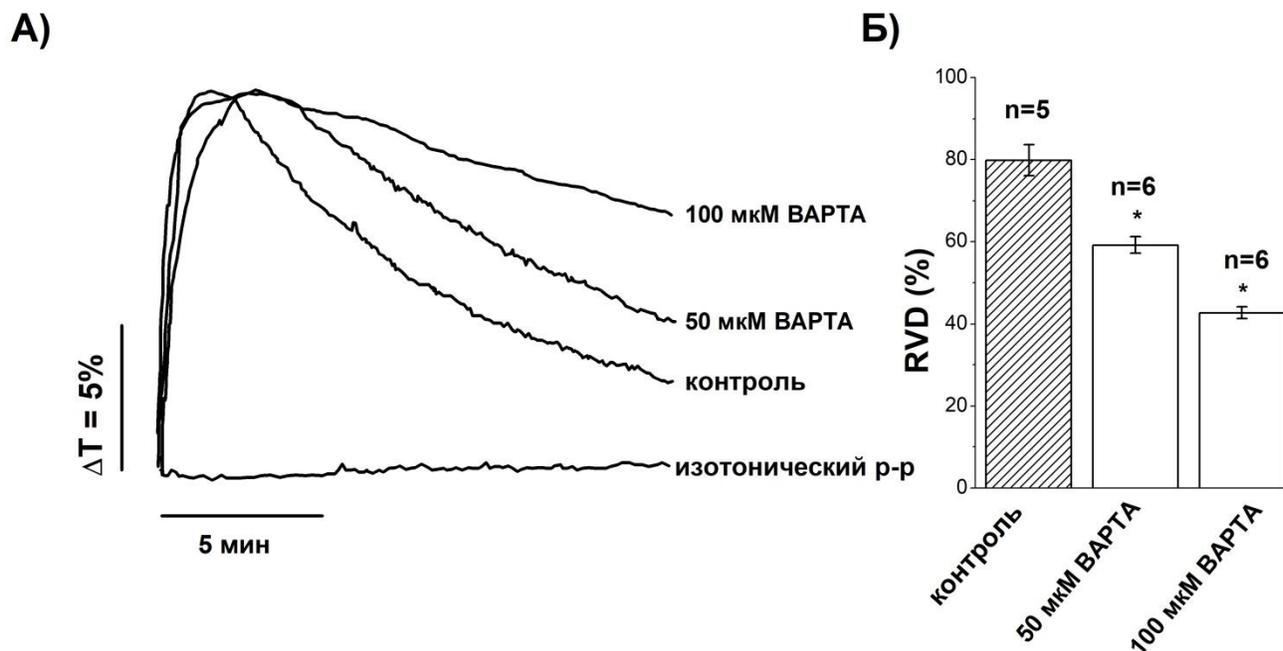
**Рис. 3.4.**

**Роль внеклеточных ионов кальция в регуляции объема тимоцитов.** Использован раствор №5 из таблицы 2.1, в котором концентрация ионов кальция варьировалась от 0 до 10 мМ. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2017b)



**Рис. 3.5.**

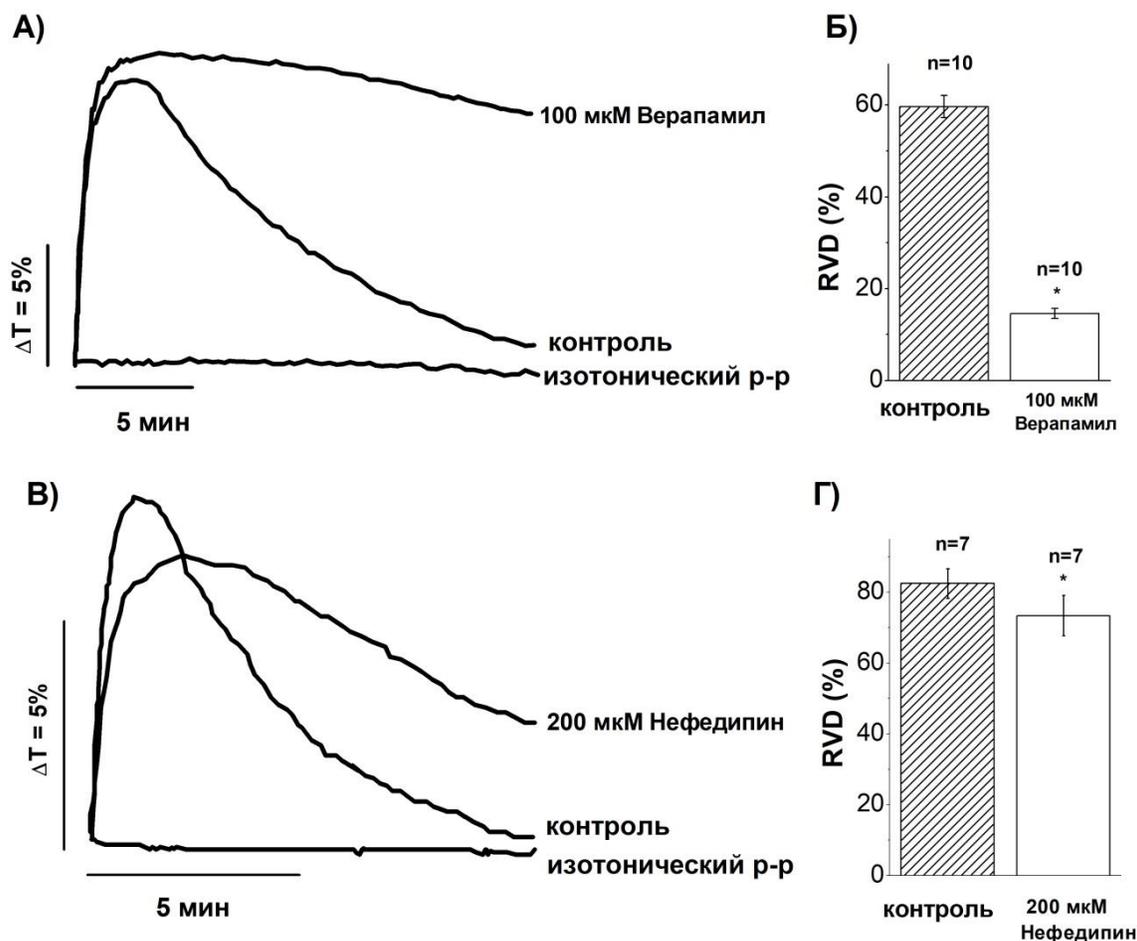
**Роль внеклеточных ионов магния в регуляции объема тимоцитов.**  
 Использован раствор №5 из таблицы 2.1, в котором концентрация ионов магния варьировалась от 0 до 10 мМ. Звёздочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от нормального содержания магния (1 мМ) на уровне  $P < 0,05$ ;  $n$  – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2017b)



**Рис. 3.6.**

**Эффект хелатирования внутриклеточных ионов кальция на регуляцию объема тимоцитов.**

Слева – оригиналы записей изменения светопропускания суспензии тимоцитов во времени в изотонической среде (кривая 1), в контрольной гипотонической среде (кривая 2), в гипотонической среде после преинкубации клеток в течение 10 мин в присутствии ВАРТА-АМ (кривая 3 – 50 мкМ и кривая 4 – 100 мкМ). Справа – средние величины регуляторного уменьшения объема тимоцитов, измеренного после 15 мин инкубации клеток в присутствии ВАРТА-АМ в указанных концентрациях. Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3). Звёздочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2007)



**Рис. 3.7.**

**Влияние блокаторов кальциевых каналов на регуляцию объема тимоцитов.**

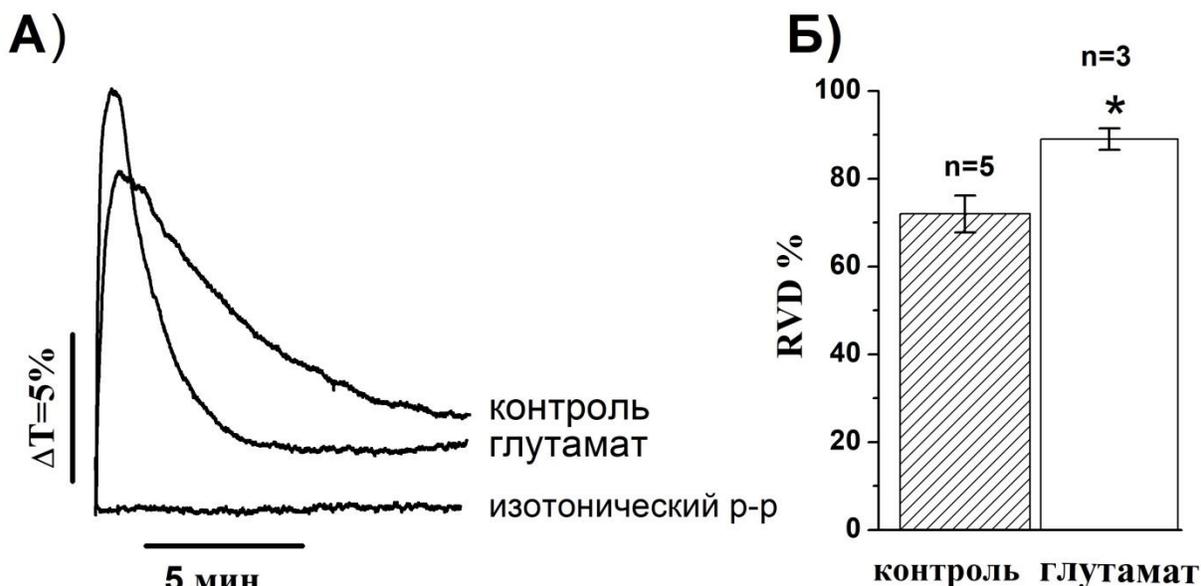
Слева - оригиналы записей изменения светопропускания суспензии тимоцитов во времени в изотонической среде, в контрольной гипотонической среде и в гипотонической среде в присутствии 100  $\mu\text{M}$  верапамил (А) и 200  $\mu\text{M}$  нифедипин (В). Справа – средние величины регуляторного уменьшения объема тимоцитов, измеренного после 15 мин инкубации клеток в гипотонической среде, содержащей верапамил (Б) и нифедипин (Г). Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3). Звёздочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2007)

### **§ 3.3 Роль внеклеточных анионов и анионного транспорта в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.**

Направленный наружу нетто поток катионов при гипоосмотическом стрессе невозможен без параллельного потока анионов в том же направлении в силу необходимости соблюдения принципа электронейтральности. Поэтому следует ожидать, что содержание анионов во внеклеточной среде будет влиять на эффективность регуляции объема клеток.

Действительно, в наших экспериментах эквимоллярная замена ионов хлора на анион глутамата во внеклеточной среде приводила к заметному повышению степени восстановления клеточного объема (рис. 3.8). Содержание ионов хлора в цитоплазме тимоцитов составляет 70-85 мМ, что существенно выше уровня, ожидаемого для электрохимического равновесия при мембранном потенциале около  $-55$  мВ, который должен быть близок к 16 мМ (Garcia-Soto and Grinstein, 1990). Анализ потоков ионов хлора и ингибиторный анализ свидетельствуют о том, что на тимоцитарной мембране присутствует протонный градиент величиной примерно 0,2 единицы рН, который является движущей силой для аккумуляции хлорида внутри клетки через систему хлор/бикарбонатного обмена, чувствительного к производным стильбена (SITS и DIDS). Таким образом, при нормальном содержании ионов хлора во внеклеточной среде (около 150 мМ в нормальном Рингере) небольшой градиент хлора направлен внутрь клетки. Однако, нетто поток анионов (в основном – хлорида) при этом направлен наружу, так как калиевый градиент (примерно 135-150 мМ внутри клетки по (Yurinskaya et al., 2005) против 5 мМ в нормальном Рингере) существенно превышает хлорный. Выбросу анионов также способствует и отрицательный знак мембранного потенциала в цитозоле. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что усиление RVD при замене хлорида на глутамат, наблюдавшееся в наших экспериментах (рис. 3.8), по-видимому, связано с тем, что удаление ионов хлорида из внеклеточной среды приводит к переориентации хлорного градиента на обратный, направленный наружу.

Как и в случае с ионами калия и кальция, встает вопрос о природе транспортных путей для переноса анионов. Для получения ответа на этот вопрос мы исследовали влияние широкого спектра доступных фармакологических агентов. Производные стильбена являются широко известными ингибиторами хлорного транспорта.



**Рис. 3.8.**

**Влияние эквимоллярной замены ионов хлора на непроникающий анион глутамата на регуляцию объема тимоцитов.**

Использован раствор №5 из таблицы 2.1. Звездочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов.

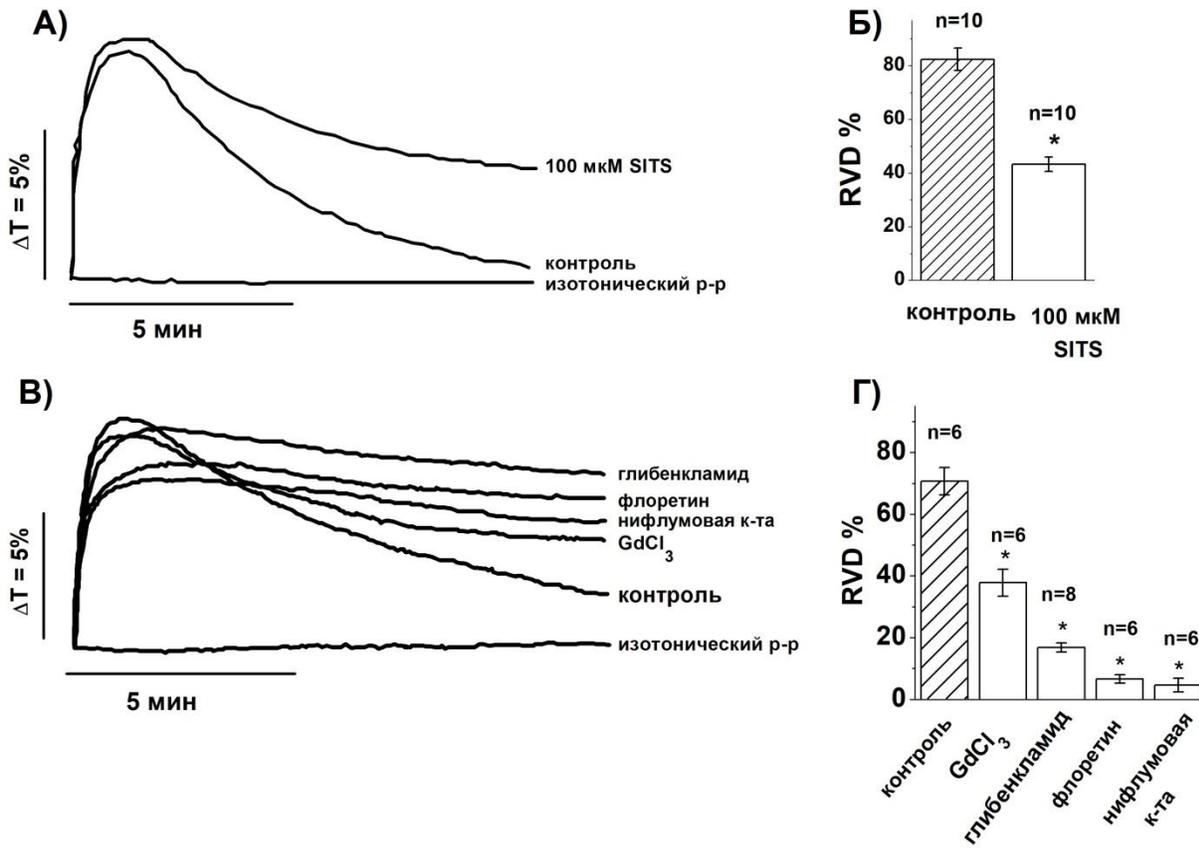
В наших экспериментах, SITS при концентрации 100 мкМ оказывал значительное ингибирующее влияние на регуляцию объема тимоцитов (рис. 3.9: А и Б). Известно, что SITS блокирует не только анионные каналы, но и хлор-бикарбонатный обменник, который, как мы упоминали выше, обеспечивает аккумуляцию хлора внутри клетки. С другой стороны, блокаторов хлорных каналов с высокой специфичностью в настоящее время не существует. Поэтому мы изучили ряд различных ингибиторов, известных своей способностью подавлять те или иные

хлорные каналы. В наших экспериментах, ионы трехвалентного гадолиния эффективно ингибировали регуляцию объема тимоцитов (рис. 3.9: В и Г). Хотя известно, что этот катион ингибирует механочувствительные неселективные катионные каналы, недавно было показано, что макси-анионные каналы, экспрессированные в Т-лимфоцитах, также блокируются этим катионом (Nam et al., 2006) см. обзор (Sabirov et al., 2016). Таким образом, наш результат может указывать на то, что в транспорте хлора через мембрану набухших тимоцитов могут участвовать хлорные каналы большой амплитуды (макси-анионные каналы).

По своей эффективности глибенкламид и флоретин превосходили ионы гадолиния (рис. 3.9: В и Г). Эти ингибиторы не блокируют макси-анионные канал, но сильно подавляют объем-зависимый хлорный канал наружного выпрямления. Можно предположить, что этот канал вносит существенный вклад в анионную проницаемость тимоцитов при гипотонической стимуляции. Отметим, что флоретин, в отличие от глибенкламида, не действует на цАМФ-активируемые хлорные каналы. Поэтому, можно полагать, что последний тип каналов не вносит большого вклада в общую анионную проницаемость. Нифлумовая кислота блокирует различные типы хлорных каналов. Соответственно, это вещество оказалось наиболее эффективным ингибитором регуляции объема тимоцитов (рис. 3.9: В и Г). Таким образом, проведенный нами фармакологический анализ влияния блокаторов Cl<sup>-</sup> каналов на RVD свидетельствует о том, что по-крайней мере один, а скорее всего несколько типов хлорных каналов, могут принимать участие в выбросе ионов хлора из набухших тимоцитов. Наиболее вероятными кандидатами на эту роль, по-видимому, являются два типа каналов: это макси-анионный канал большой проводимости и объем-зависимый канал наружного выпрямления .

Таким образом, проведенное нами исследование ионных механизмов регуляции тимоцитарного объема с помощью фармакологических агентов показало, что тимоциты, будучи незрелыми лимфоцитами, все же

обладают всеми необходимыми компонентами объем-регулирующей системы, такими как Ca-транспортирующая, калиевые и хлорные каналы.



**Рис. 3.9.**

**Влияние ингибиторов анионного транспорта на регуляцию объема ТИМОЦИТОВ.**

Глибенкламид и флоретин использованы в концентрации 200 мкМ. Гадолиний и нифлумовая кислота добавлены в концентрации 100 мкМ. Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3). Звёздочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2008)

Анализ этого процесса позволяет предположить, что хлорные каналы, активируемые при осмотическом набухании тимоцитов, относятся к известным двум типам: вероятно, это макси- анионный канал,

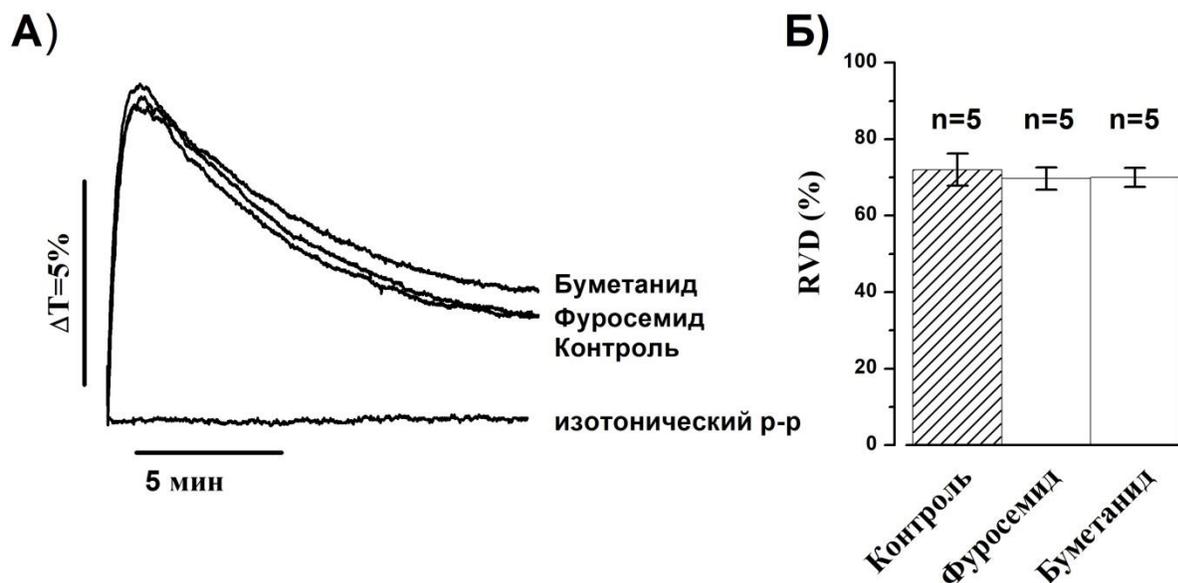
чувствительный к гадолинию, и объем-зависимый хлорный канал наружного выпрямления, ингибируемый глибенкламидом, флоретином и нифлумовой кислотой. В главе IV изложены наши результаты, полученные методом пэтч-кламп, которые прямо свидетельствуют о том, что наша гипотеза о наличии этих двух типов анионных каналов в мембране набухших тимоцитов оказалась правильной.

### **§3.4. Роль систем сопряженного транспорта ионов калия и хлора в регуляторном уменьшении объема тимоцитов в ответ на гипоосмотических стресс.**

Выброс осмолитов из цитозоля наружу при гипотоническом стрессе может происходить как путём активации ионных каналов, так и через системы сопряженного транспорта катионов и анионов, такие как Na/K/2Cl или K/Cl котранспорт. В наших экспериментах, ни фуросемид, ни буметанид в концентрациях до 100 мкМ не оказывали заметного влияния на процесс регуляторного уменьшения объема тимоцитов при гипоосмотической стимуляции (рис. 3.10). Этот результат свидетельствует о том, что система сопряженного котранспорта Na/K/2Cl не принимает участия в регуляции объема тимоцитов в гипотонических условиях.

В настоящее время единственным ингибитором, селективно подавляющим систему сопряженного котранспорта K/Cl является [(2-н-бутил-6,7-дихлоро-2-циклопентил-2,3-дигидро-1-оксо-1-инден-5-ил)-оксиацетат (DIOA). В наших экспериментах, это вещество уже при концентрации 1 мкМ заметно подавляло стадию восстановления объема после осмотического набухания, а в концентрации 10 мкМ DIOA полностью предотвращал фазу сжимания (рис. 3.11).

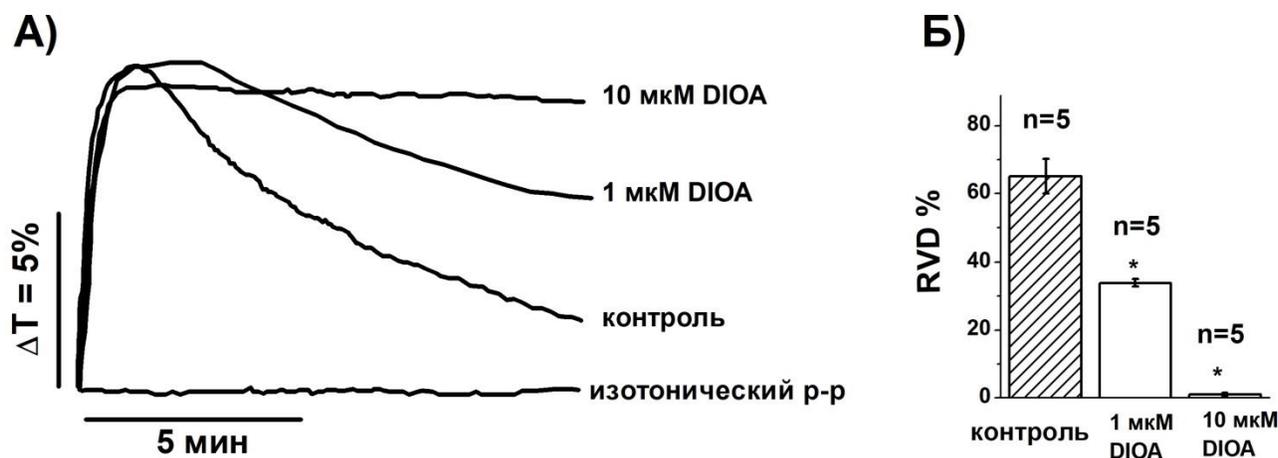
Таким образом, DIOA является очень эффективным ингибитором регуляции объема тимоцитов. Аналогичный результат был получен в работах (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993), которые предположили, что в незрелых лимфоцитах тимуса клеточный объем регулируется за счет функционирования этого переносчика, а при созревании, этот механизм заменяется на другой, основанный на работе ионных каналов для калия и хлора.



**Рис. 3.10.**

**Влияние ингибиторов сопряженного котранспорта Na/K/2Cl, фуросемида и буметанида, на регуляцию объема тимоцитов.**

Слева - оригиналы записей изменения светопропускания суспензии тимоцитов во времени в изотонической среде, в контрольной гипотонической среде и в гипотонической среде в присутствии фуросемида (100 мкМ) и буметанида (100 мкМ). Справа – средние величины регуляторного уменьшения объёма тимоцитов, измеренного после 15 мин инкубации клеток в гипотонической среде, содержащей фуросемида и буметанида. Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3).



**Рис. 3.11.**

**Влияние ингибитора сопряженного котранспорта K/Cl (DIOA) на регуляцию объема тимоцитов.**

**А** - оригиналы записей изменения светопропускания суспензии тимоцитов во времени в изотонической среде, в контрольной гипотонической среде и в гипотонической среде в присутствии DIOA в указанных концентрациях. **Б** – средние величины регуляторного уменьшения объема тимоцитов, измеренного после 15 мин инкубации клеток в гипотонической среде, содержащей DIOA. Использован гипотонический раствор Рингера-140 (№5 из таблицы 2.3). Звездочки (\*) обозначают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ ; n – число экспериментов. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2007)

Однако в наших экспериментах мы обнаружили сильное ингибирующее действие блокаторов калиевых и хлорных каналов, как это описано в данной главе. Трудно предположить, что все исследованные нами модуляторы ионных каналов являются также и ингибиторами K/Cl котранспортера. Поэтому, более вероятным объяснением, на наш взгляд, представляется ингибирование DIOA ионных каналов, ключевых для процесса регуляции объема, таких, как калиевые и/или хлорные каналы. Очевидно, что только исследование ион-транспортирующих систем, активируемых при гипоосмотическом стресс методами электрофизиологии может пролить свет на это кажущееся противоречие.

В главе IV мы покажем, что DIOA в указанных дозах является сильным ингибитором объем-зависимых анионных каналов наружного выпрямления, что является убедительным свидетельством в пользу канал-опосредованного механизма регуляции клеточного объема тимоцитов.

### §3.5. Обсуждение.

Таким образом, наши эксперименты свидетельствуют о том, что процесс регуляции объёма тимоцитов при гипоосмотическом стрессе является сложным процессом, в котором принимает участие целый ряд транспортных систем. Самым первым этапом в цепочке событий, инициируемых гипотоническим стрессом, является пассивный ответ клеток как осмометров. Однако, этот ответ отличается от ожидаемого согласно закону Вант-Гоффа вследствие наличия системы активной регуляции объема. Движущей силой уменьшения объема после пассивного набухания тимоцитов является градиент ионов калия, а сам калий выходит через калиевые каналы, которые блокируются ионами бария и ТЭА. Очевидно, что калий переносится через кальций-зависимый транспортный путь, о чем свидетельствует подавление скорости восстановления объема как при хелатировании внутриклеточного кальция, так и в безкальциевой среде, а также эффект блокаторов кальциевых каналов. Нетто-перенос ионов калия требует транспорта эквивалентного количества противоионов, в качестве которых служат ионы хлора и, возможно, другие отрицательно заряженные осмолиты цитоплазмы. Действительно, наши фармакологические данные свидетельствуют о вкладе двух типов анионных каналов – это макси-анионный канал и объем-зависимый анионный канал наружного выпрямления. Кроме ионных каналов, перенос осмолитов может также обеспечиваться системой сопряженного транспорта ионов. Согласно нашим данным, система сопряженного котранспорта  $\text{Na/K/2Cl}$  не принимает участия в регуляции объема тимоцитов в гипотонических условиях. В то же время, блокатор котранспорта  $\text{K/Cl}$  – DIOA полностью подавлял процесс восстановления объема тимоцитов, что может свидетельствовать о вкладе этой системы. Основные транспортные пути, активируемые при

гипоосмотическом стрессе на мембране тимоцитов и вносящие вклад в общий процесс восстановления объема клетки, показаны на рис. 3.12. Очевидно, что доказательство того или иного механизма транспорта осмолитов при гипоосмотическом стрессе возможно только в прямых экспериментах по электрофизиологической регистрации ионных потоков. Следующая глава посвящена именно этим исследованиям.

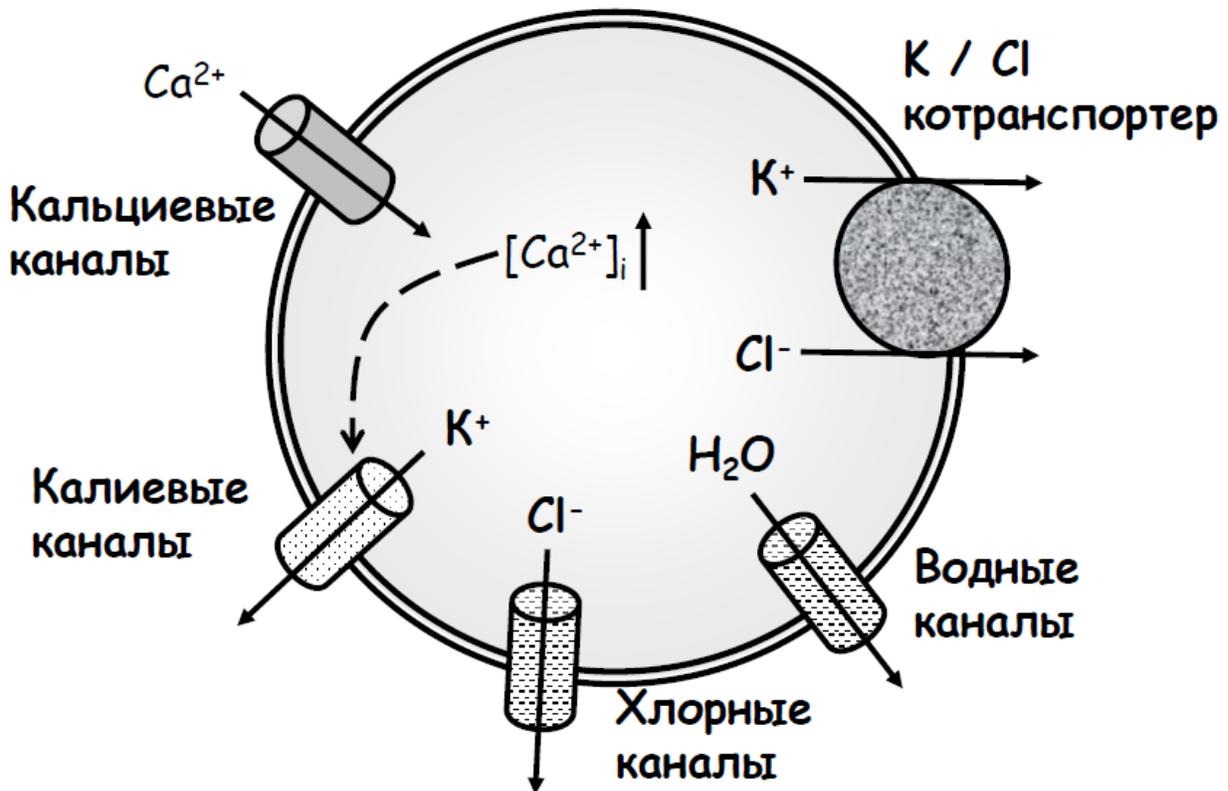


Рис. 3.12.

**Механизм регуляции клеточного объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.**

Показаны основные транспортные пути – ионные каналы и транспортеры, участие которых выявлено при фармакологическом исследовании процесса регуляторного уменьшения объема клеток при гипоосмотическом стрессе. Пояснения в тексте. (Приводится по: Курбанназарова с соавт., 2010).

## ГЛАВА IV. БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ, АКТИВИРУЕМЫХ В МЕМБРАНЕ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

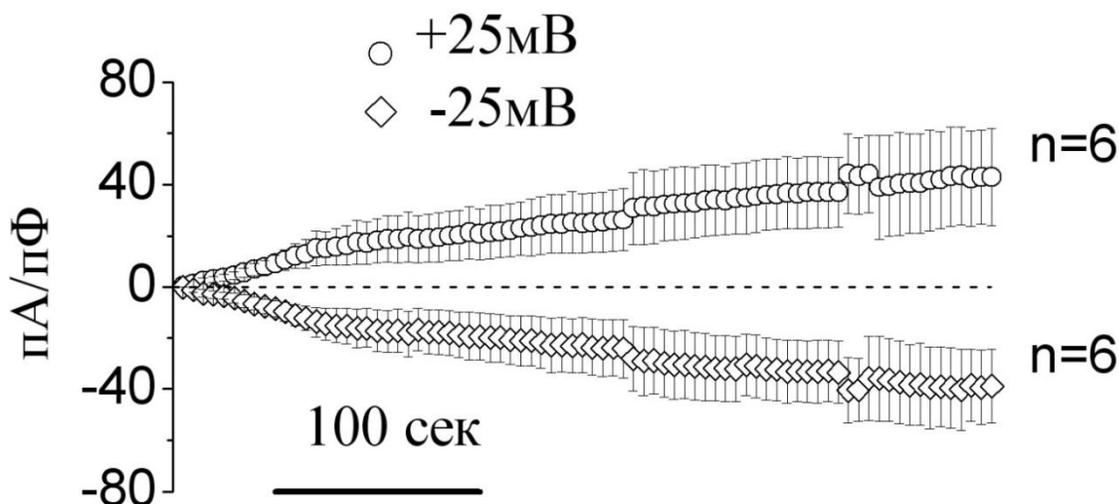
Наши результаты, изложенные в предыдущей главе, свидетельствуют о том, что ионные каналы, проницаемые для ионов калия и хлора, должны обеспечивать основной транспортный путь для выброса KCl из осмотически стрессованных тимоцитов. Однако, разумеется, единственным доказательством присутствия этих каналов в плазматической мембране тимоцитов и их объем-зависимой активации будет прямое определение их активности методом микролокального отведения ионных токов – пэтч-кламп, который является в настоящее время «золотым стандартом» электрофизиологических исследований. Активность потенциал-зависимых кальциевых и калиевых каналов была продемонстрирована ранее в ряде зарубежных исследований (Dobrovinskaya et al., 2015; Jha et al., 2015). Поэтому, мы в нашей работе исследовали активность анионных каналов, активируемых на плазмалемме тимоцитов при осмотическом набухании. В нашем исследовании мы использовали три конфигурации метода пэтч-кламп: 1) *whole-cell* –отведение от всей клетки для исследования макроскопических интегральных токов; 2) *on-cell* (или *cell-attached*) – отведение от небольшого мембранного фрагмента без нарушения целостности клеточной мембраны (при этом цитоплазматическая сторона мембраны обращена в цитоплазму и недоступна для манипуляций); 3) *inside-out* – отведение от небольшого фрагмента мембраны после его отрыва от клетки (при этом цитоплазматическая сторона мембраны обращена в экспериментальную ячейку и доступна для манипуляций).

#### §4.1. Кинетика активации макроскопической ионной проводимости плазматической мембраны тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса

В наших предварительных экспериментах, мы попытались измерить макроскопические токи, индуцированные в мембране клеток с помощью обычного метода уменьшения внеклеточной осмолярности. Однако, в экспериментах с изотоническим раствором внутри пипетки, клетки спонтанно увеличивались в объёме вследствие наличия градиента онкотического давления, создаваемого малоподвижными внутриклеточными компонентами, такими, как белки, нуклеиновые кислоты и некоторые метаболиты. В то же время, даже небольшая гипотоничность раствора внутри пипетки, которая обычно используется для предотвращения спонтанного набухания клеток (Kubo and Okada, 1992), приводила к заметному уменьшению размеров тимоцитов и часто к их коллапсу. В большинстве случаев, последующая перфузия гипоосмотическим раствором разрушала клетки и не индуцировала воспроизводимых активированных набуханием макроскопических ионных токов. В отличие от этого, когда мы вызывали набухание клеток путем заполнения пипеток слегка гипертоническим раствором с добавлением в него маннитола, *whole-cell* конфигурация была более стабильной и можно было зарегистрировать воспроизводимые макроскопические мембранные токи. Поэтому в настоящем исследовании мы в дальнейшем индуцировали клеточное набухание с помощью пипеток, заполненных гипертоническим раствором.

В наших экспериментах, сразу после прорыва мембранного фрагмента и получения конфигурации *whole-cell*, измеряемые макроскопические токи были невелики и составляли  $0,04 \pm 0,01$  пА/пФ и  $0,005 \pm 0,002$  пА/пФ при +25 мВ и -25 мВ, соответственно. Мембранные токи постепенно увеличивались по мере набухания клеток (которое можно было наблюдать визуально под микроскопом при увеличении 200-400 раз) и через 6 мин достигали значений  $40,2 \pm 19,9$  пА/пФ и  $-38,3 \pm 15,7$  пА/пФ при +25 мВ и -25 мВ, соответственно (рис. 4.1). Более

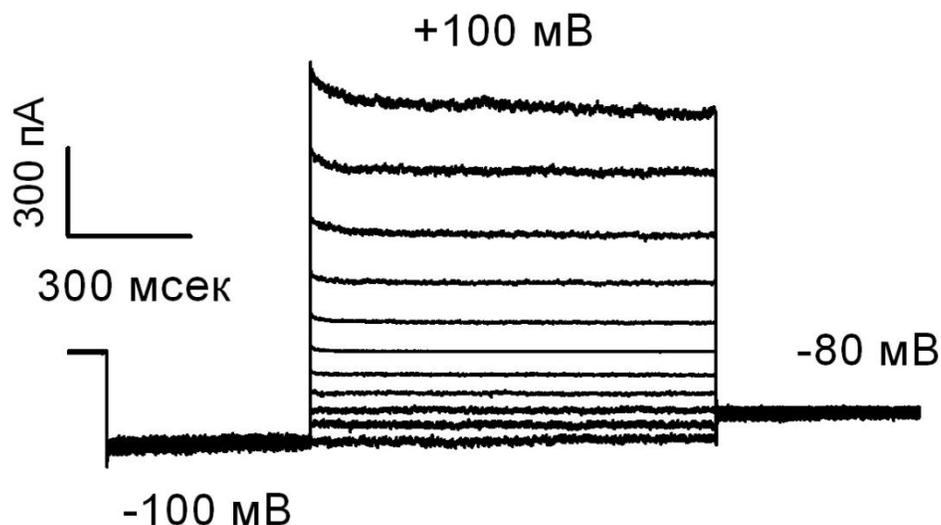
продолжительное набухание тимоцитов обычно приводило к повреждению клеток. Токвый ответ на ступенчатое увеличение фиксируемого мембранного потенциала демонстрировал время-зависимую инактивацию при положительных потенциалах выше +80 мВ (рис. 4.2).



**Рис. 4.1.**

**Макроскопические ионные токи, активируемые при осмотическом набухании тимоцитов в режиме *whole-cell*.**

Пипеточный раствор содержал 3 мМ АТФ, Токи регистрировались в ответ на прямоугольные тест-импульсы переменной полярности от 0 до  $\pm 25$  мВ (каждые 5 сек). По оси ординат отложена плотность тока (ток, нормализованный на ёмкость целой клетки). (Данные на рис. 4.1–4.9 приводятся по: Kurbannazarova et al., 2011)

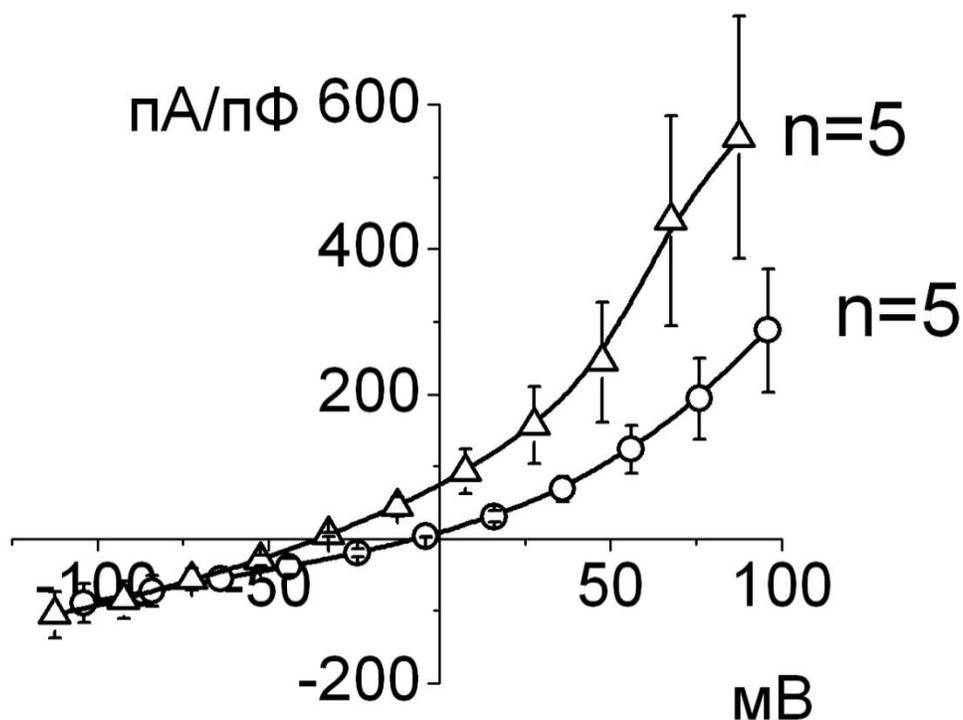


**Рис.4.2.**

**Типичные записи тока, зарегистрированного после максимальной активации в режиме *whole-cell*.**

Пипеточный раствор содержал 3 мМ АТФ, Базовый фиксированный потенциал был 0 мВ; после предварительного импульса до -100 мВ (500 мс), мембранный потенциал фиксировался ступенчато на уровне от -100 до +100 мВ с шагом 20 мВ и продолжительностью 1000 мс. Затем потенциал фиксировался при -80 мВ.

Вольтамперные характеристики имели наружное выпрямление и потенциал реверсии, равный  $-4,4 \pm 1,7$  мВ (рис. 4.3: светлые кружочки). Потенциал реверсии ВАХ сдвигался до значения  $-33,7 \pm 1,6$  мВ при уменьшении концентрации  $\text{Cl}^-$  в пипетке с 125 мМ до 25 мМ (рис. 4.3: светлые треугольники), что указывает на анионную селективность макроскопической проводимости, активированной на мембране клеток при осмотическом набухании. Расчетное отношение проницаемости аспартата к проницаемости по ионам хлора составило  $P_{\text{Asp}}/P_{\text{Cl}} = 0,08 \pm 0,02$ . Эти характеристики типичны для  $\text{Cl}^-$  тока через каналы типа ОЗАК (Okada, 1997).



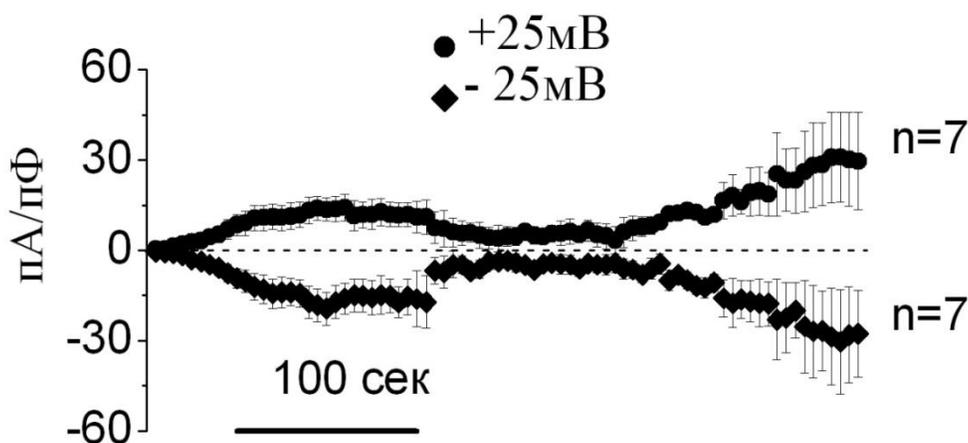
**Рис. 4.3.**

**Мгновенные вольтамперные характеристики, измеренные в начале тестовых импульсов (таких, как показано на рис. 4.2) после максимальной активации тока.**

Пипеточный раствор содержал 125 мМ  $\text{Cl}^-$  (светлые кружочки) или 25 мМ  $\text{Cl}^-$  (светлые треугольники).

Наряду с хлорным током каналов ОЗАК-типа, клеточное набухание, как известно, вызывает активацию и других типов анионной проводимости, которые характеризуются меньшим или полным отсутствием выпрямления и потенциал-зависимой инактивацией при небольших потенциалах порядка  $\pm 20\text{-}30$  мВ. Каналы, проводящие этот ток, имеют очень большую проводимость порядка 300-400 пСм и называются макси-анионными каналами (Sabirov and Okada, 2009; Sabirov et al., 2016). Высокая внутриклеточная концентрация АТФ, как известно, способствует активации  $\text{Cl}^-$  каналов типа ОЗАК, тогда как метаболический стресс благоприятствует активации макси-анионных

каналов (Sabirov et al., 2001; Dutta et al., 2004; Liu et al., 2006). В наших экспериментах, использование пипеточного раствора без АТФ приводило к двухфазному увеличению макроскопических *whole-cell* токов. Мембранный ток увеличивался от начального близкого к нулевому уровня до  $14,2 \pm 4,3$  пА/пФ ( $n=7$ ) и  $-17,2 \pm 5,4$  пА/пФ ( $n=7$ ) при +25 мВ и -25 мВ, соответственно. Затем мембранный ток уменьшался примерно до 25-35% от пикового значения и снова увеличивался, достигая уровня  $26,1 \pm 13,4$  пА/пФ ( $n=7$ ) и  $-25,4 \pm 15,4$  пА/пФ ( $n=7$ ) при +25 мВ и -25 мВ, соответственно, после 6 мин набухания (рис. 4.4).



**Рис. 4.4.**

**Макроскопические ионные токи, активируемые при осмотическом набухании тимоцитов в режиме *whole-cell*.**

Пипеточный раствор не содержал АТФ, Токи регистрировались в ответ на прямоугольные тест-импульсы переменной полярности от 0 до  $\pm 25$  мВ (каждые 5 сек). По оси ординат отложена плотность тока (ток, нормализованный на ёмкость целой клетки).

Более продолжительное набухание обычно приводило к повреждению клеток. Токвый ответ на ступенчатое увеличение фиксируемого мембранного потенциала демонстрировал хорошо выраженную и зависящую от времени инактивацию при отрицательных потенциалах ниже -20 мВ (рис. 4.5).

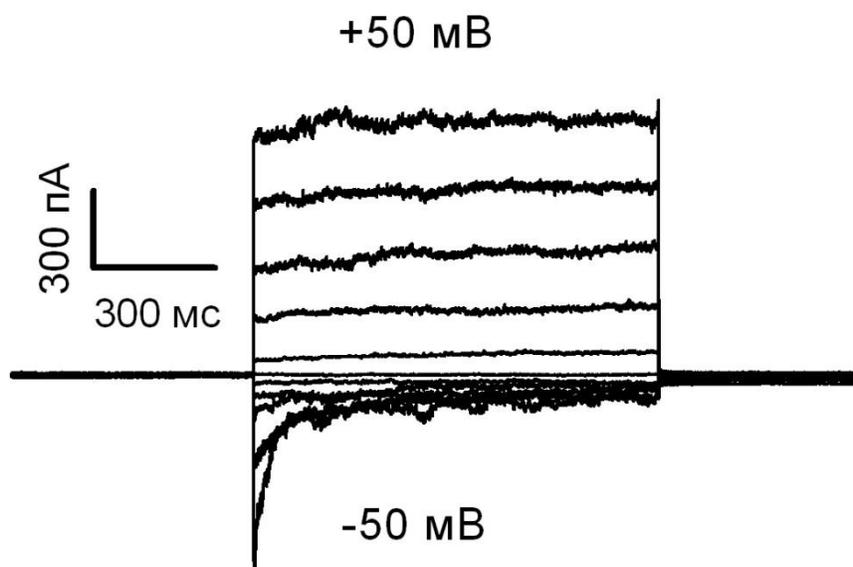


Рис. 4.5.

**Типичные записи тока, зарегистрированного после максимальной активации при отсутствии АТФ в пипетке в режиме *whole-cell*.**

Базовый фиксированный потенциал был 0 мВ; Мембранный потенциал фиксировался ступенчато на уровне от -50 до +50 мВ с шагом 10 мВ и продолжительностью 1000 мс. Затем мембранный потенциал возвращался на уровень 0 мВ.

ВАХ имели наружное выпрямление, а потенциал реверсии был равен  $-4,7 \pm 0,8$  мВ (Рис. 4.6: тёмные кружочки). Потенциал реверсии сдвигался до значения  $-22,4 \pm 1,5$  мВ при уменьшении концентрации  $\text{Cl}^-$  в пипетке от 125 мМ до 25 мМ (рис. 4.6: тёмные треугольники), что указывает на анионную селективность макроскопической мембранной проводимости. Расчетное отношение проницаемости аспартата к проницаемости по ионам хлора для макроскопического тока, активированного в отсутствие АТФ в пипеточном растворе составило  $P_{\text{Asp}}/P_{\text{Cl}} = 0,29 \pm 0,04$ . Эти характеристики отличаются от хлорного тока ОЗАК-типа и более близки к макроскопическим  $\text{Cl}^-$  токам через макси-анионные каналы, которые наблюдались в клетках рака молочной железы C127 (Sabirov et al., 2001) и неонатальных кардиомиоцитов крысы в первичной культуре (Dutta et al., 2004). Это предположение было также подтверждено наблюдением, что на начальном участке второго этапа

роста макроскопического тока (спустя около 4 минут), мы зарегистрировали ступенчатые флуктуации тока амплитудой 8-10 пА при  $-25$  мВ, которые характерны для макси-анионных каналов. Пример такой записи показан на вставке к рисунку 4.6 (левая панель).

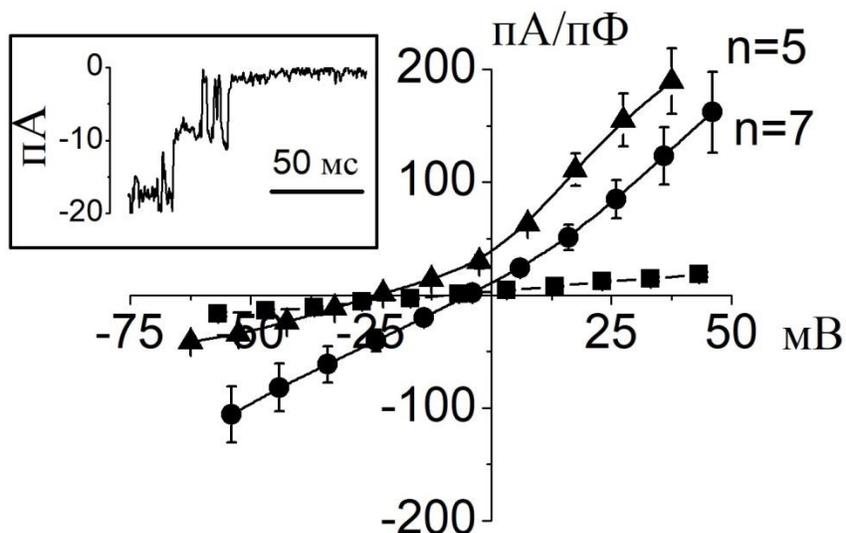


Рис. 4.6.

**Мгновенные ВАХ, измеренные в начале тестовых импульсов (таких, как показано на рис. 4.5) сразу же после получения *whole-cell* конфигурации (темные квадраты) и после максимальной активации тока (темные кружочки и треугольники).**

Пипеточный раствор содержал 125 мМ  $\text{Cl}^-$  (темные кружочки) или 25 мМ  $\text{Cl}^-$  (темные треугольники), соответственно. Вставка на левой панели показывает запись одиночного макси-анионного канала, зарегистрированного в *whole-cell* конфигурации.

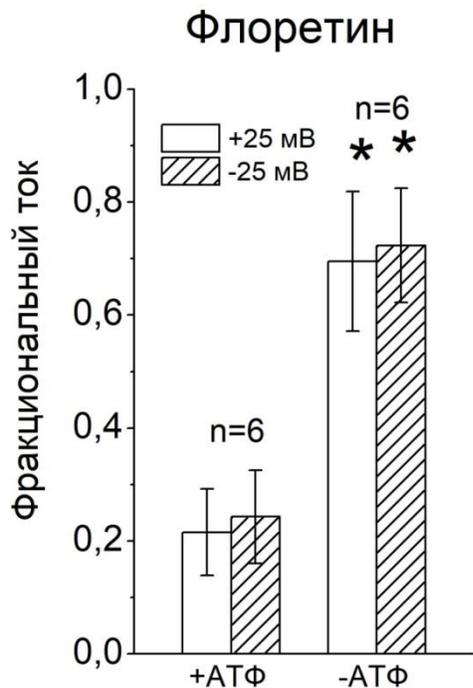
#### **§4.2. Фармакологический профиль макроскопических мембранных токов, активированных в тимоцитах в ответ на осмотическое набухание клетки**

В наших дальнейших экспериментах мы исследовали фармакологию макроскопических ионных токов, активированных на мембране тимоцитов при их осмотическом набухании. Как показано на рис. 4.7,

индуцированный набуханием макроскопический мембранный ток, полученный с помощью пипетки, заполненной АТФ-содержащим раствором, сильно ингибируется бисфенолом флоретином (200 мкМ), который, как известно, избирательно блокирует Cl<sup>-</sup> токи типа ОЗАК, но не влияет на Ca<sup>2+</sup>-активируемые и сАМР-активируемые Cl<sup>-</sup> каналы при концентрации, равной или меньше 100 мкМ (Fan et al., 2001). Здесь и далее фракциональный ток означает долю от контрольного значения макроскопического тока. Влияние флоретина было значительно меньше, когда АТФ не добавлялся в пипеточный раствор (рис. 4.7), что указывает на меньший вклад Cl<sup>-</sup> каналов ОЗАК в макроскопическую проводимость в отсутствие АТФ.

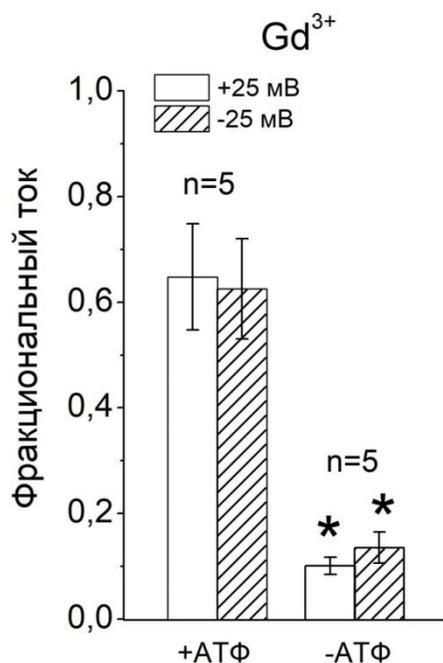
Известно, что среди анионных каналов только макси-анионный канал чувствителен к катионам гадолиния Gd<sup>3+</sup>. В наших экспериментах мы установили, что индуцированный набуханием *whole-cell* ток был значительно более чувствителен к Gd<sup>3+</sup> в отсутствие АТФ в пипеточном растворе по сравнению с током, измеряемым с помощью пипетки, содержащей АТФ (рис. 4.8). Таким образом мы предполагаем, что именно макси-анионный канал составляет основную часть проводимости, активированной на мембране набухших тимоцитов в отсутствие внутриклеточного АТФ.

К нашему удивлению и вопреки ожиданиям, ингибитор K/Cl котранспортера, DIOA, также подавлял индуцированные набуханием макроскопические ионные токи (рис. 4.9) с эффективностью, более выраженной в присутствии АТФ в пипетке по сравнению с без-АТФными пипеточными растворами. Так как K/Cl котранспортер является электронейтральным, мы предполагаем, что индуцированные набуханием анионные каналы также могут быть чувствительны к этому препарату, который считается специфичным в отношении K/Cl котранспортера.



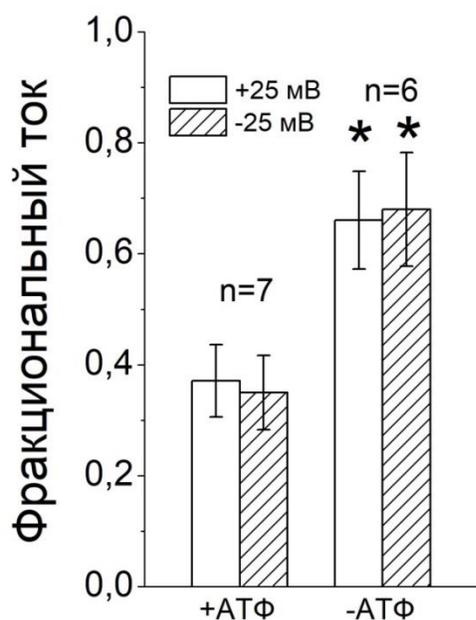
**Рис. 4.7.**  
**Влияние 200 мкМ флоретина на усредненный ток, записанный при +25 мВ (светлые столбики) и -25 мВ (заштрихованные столбики).**

Данные нормированы на средний ток, измеренный до добавки ингибиторов. Каждый столбик представляет собой среднее  $\pm$  SEM (вертикальная черта). \*Статистически значимо отличается от среднего значения тока, измеренного пипеткой, заполненной АТФ содержащим пипеточным раствором, при  $P < 0,05$ .



**Рис. 4.8.**  
**Влияние 50 мкМ Gd<sup>3+</sup> на усредненный ток, записанный при 25 мВ (светлые столбики) и -25 мВ (заштрихованные столбики).**

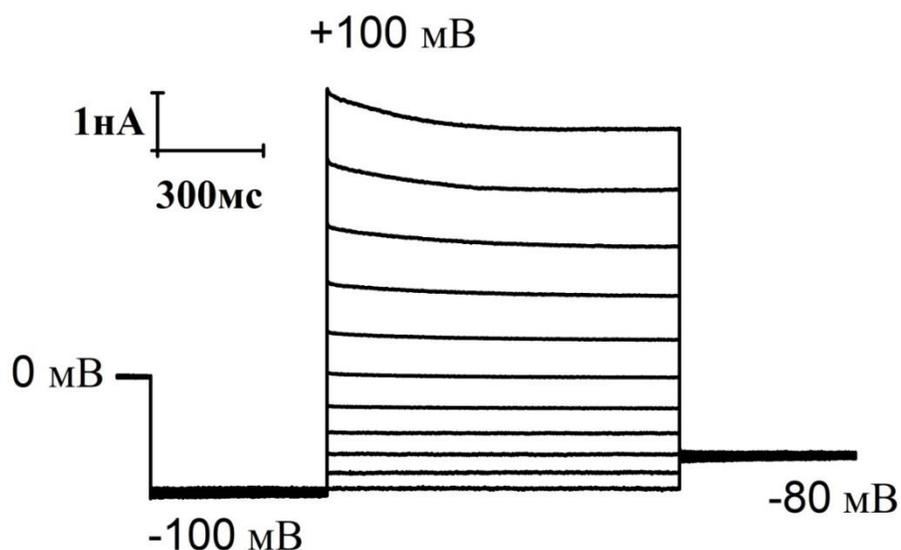
Данные нормированы на средний ток, измеренный до добавки ингибиторов. Каждый столбик представляет собой среднее  $\pm$  SEM (вертикальная черта). \*Статистически значимо отличается от среднего значения тока, измеренного пипеткой, заполненной АТФ содержащим пипеточным раствором, при  $P < 0,05$ .



**Рис. 4.9.**  
**Влияние 10 мкМ DIOA на усредненный ток, записанный при 25 мВ (светлые столбики) и -25 мВ (заштрихованные столбики).**

Данные нормированы на средний ток, измеренный до добавки ингибиторов. Каждый столбик представляет собой среднее + SEM (вертикальная черта). \*Статистически значимо отличается от среднего значения тока, измеренного пипеткой, заполненной АТФ содержащим пипеточным раствором, при  $P < 0,05$ .

Клеточная линия U937 была получена из гистолитической лимфомы человека и нашла широкое применение в качестве модели дифференциации моноцитов в макрофаги. В наших дальнейших экспериментах мы использовали эту линию для того, чтобы выяснить, способен ли ингибитор K/Cl котранспорта DIOA подавлять активность объем-зависимого канала, экспрессированного в этих клетках, или его эффект специфичен только для незрелых лимфоцитов тимуса. В наших экспериментах, набухание клеток при использовании гипертонического раствора того же состава, что и для тимоцитов (и содержащего АТФ, который необходим для поддержания каналов ОЗАК в активном состоянии), приводило к росту проводимости плазматической мембраны и активации ионного тока с профилем (рис. 4.10), очень похожим на профиль тока, регистрируемого на тимоцитах.

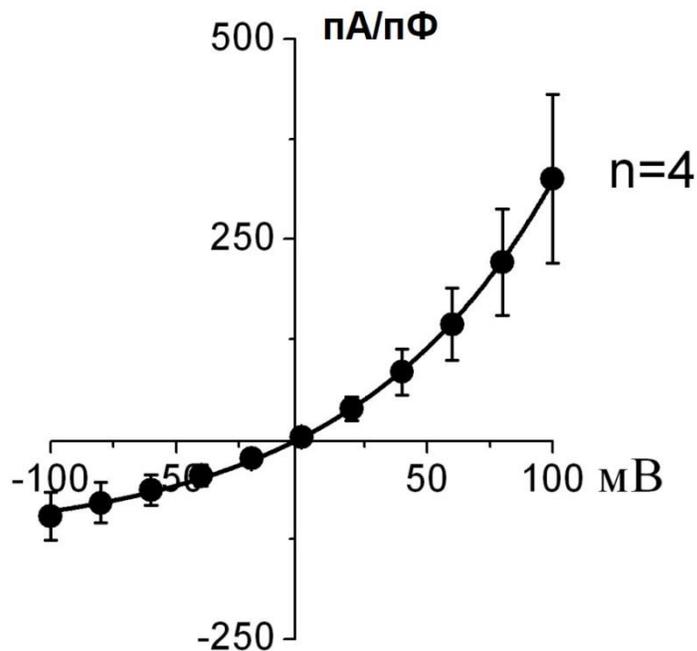


**Рис. 4.10.**

**Профиль объем-зависимого макроскопического тока на клетках U937. Типичные записи тока, зарегистрированного после максимальной активации в режиме whole-cell.**

Пипеточный раствор содержал 3 мМ АТФ, Базовый фиксированный потенциал был 0 мВ; после предварительного импульса до -100 мВ (500 мс), мембранный потенциал фиксировался ступенчато на уровне от -100 до +100 мВ с шагом 20 мВ и продолжительностью 1000 мс. Затем потенциал фиксировался при -80 мВ. (Данные на рисунках 4.10–4.11 приводятся по (Okada et al., 2019))

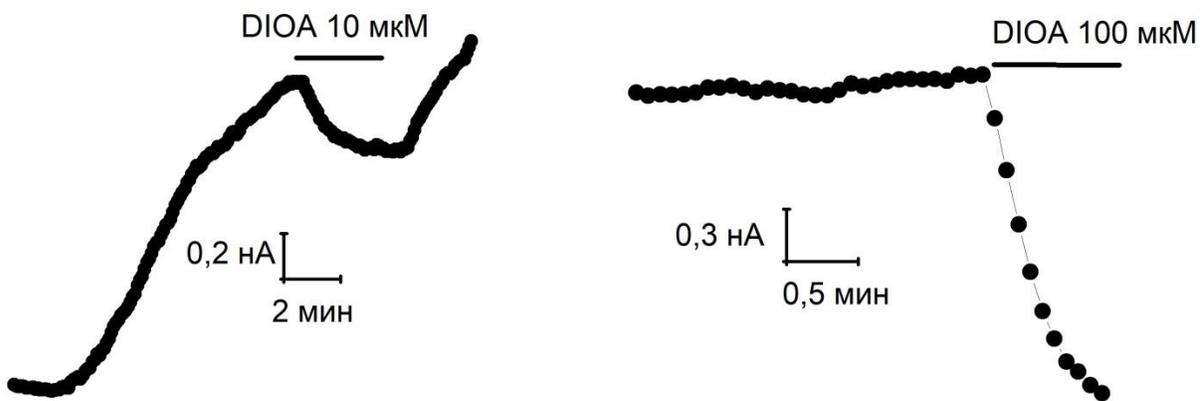
Ионный ток имел ярко выраженное наружное выпрямление с выходящим током, намного превосходящим входящий (рис. 4.11). При внесении во внеклеточную среду DIOA в концентрации 10 мкМ наблюдалось небольшое и обратимое подавление проводимости (рис. 4.12: левая запись). При использовании DIOA в концентрации 100 мкМ ионный ток подавлялся практически полностью (рис. 4.12: правая запись). Таким образом, ингибитор K/Cl котранспорта DIOA способен подавлять объем-зависимый анионный ток не только на тимоцитах, но и на других типах клеток. Механизм и биологическая значимость этого феномена предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.



**Рис. 4.11.**

**Мгновенные вольтамперные характеристики, измеренные на клетках U937 в начале тестовых импульсов (таких, как показано на рис. 3.10) после максимальной активации тока.**

Пипеточный раствор содержал 125 мМ Cl<sup>-</sup>.



**Рис. 4.12.**

**Подавление макроскопического объем-зависимого тока в клетках U937 ингибитором K/Cl котранспорта DIOA.**

Концентрация препарата равна 10 мкМ (левая запись) и 100 мкМ (правая запись).

### **§4.3. Биофизические свойства микролокальных (одиночных) ионных токов, регистрируемых на мембране тимоцитов в условиях осмотического стресса**

Мембранные фрагменты, изолированные методом пэтч-кламп на плазмалемме покоящихся клеток в нормотоническом растворе, практически не проявляли активности одиночных ионных каналов. Одиночные события, регистрируемые в этих условиях, носили спорадический характер и, по-видимому, отражали активность фоновых неселективных катионных каналов. Мембрана тимоцитов содержит достаточно большое количество калиевых каналов, однако в наших экспериментальных условиях их активность была подавлена добавлением в пипеточный раствор ионов цезия в большой концентрации (см. Материалы и Методы). Набухание клеток после формирования гигаомного контакта также не вызывало активацию ионных каналов, что согласуется с опубликованными ранее наблюдениями о том, что участок мембраны, изолированный при формировании контакта между стеклом пипетки и плазмалеммой, оказывается осмотически неактивным (см. обзор (Okada, 1997)).

Для стимуляции клеток гипоосмотическим стрессом мы использовали гипотонический раствор с высоким содержанием ионов калия, так как, согласно нашим предыдущим наблюдениям (см. главу 3.1), в таких условиях клетки не способны восстанавливать свой объем и продолжительное время остаются в набухом состоянии. При формировании гигаомного контакта после того, как клетка была подвергнута гипоосмотическому стрессу и набухла, мы наблюдали высокую активность ионных каналов. При фиксации на мембране положительного потенциала 100-140 мВ, ионный ток достигал значений порядка 100-150 пА при использовании пипеток с сопротивлением около 2 МОм (рис. 4.13), что свидетельствует о том, что изолированный мембранный фрагмент содержит большое число активных ионных каналов. При фиксации на мембране высоких положительных потенциалов можно было наблюдать инактивацию тока и выключение

некоторых одиночных ионных каналов. Общий выходящий ток был больше входящего, что является следствием наружного выпрямления ионных каналов, присутствующих в изолированном мембранном фрагменте.

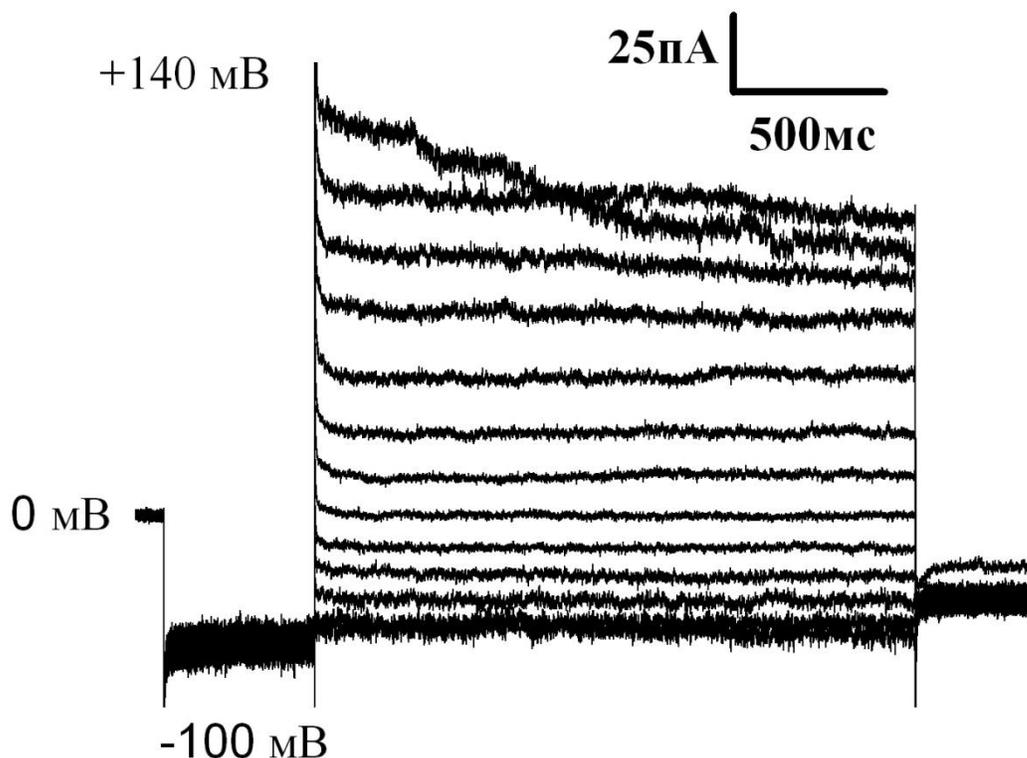


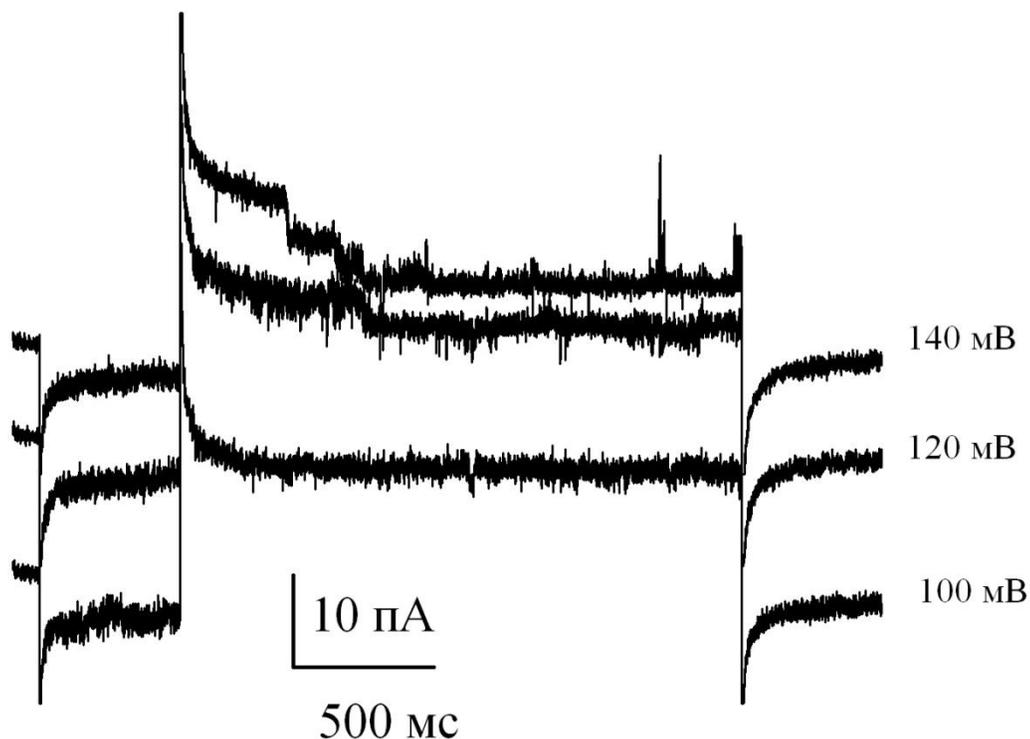
Рис. 4.13.

**Запись мембранного ионного тока, зарегистрированного на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов (режим *on cell*) после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия.**

Использована пипетка с сопротивлением 2 МОм. Потенциал фиксировался на уровне 0 мВ. При стимуляции тестовыми импульсами, мембрана гиперполяризовывалась в течение 0,5 с при  $-100$  мВ и затем потенциал сдвигался до уровня от  $-100$  мВ до  $+140$  мВ с шагом 20 мВ в течение 2 с. Затем мембранный потенциал фиксировался на уровне  $-80$  мВ 0,5 с.

Для увеличения разрешения мы использовали более узкие пипетки с сопротивлением 3-5 МОм. В этих условиях можно было различить

одиночные события с амплитудой тока около 4-7 пА при фиксации потенциала 100-140 мВ (рис. 4.14), что соответствует хордовой проводимости около 40-50 пСм. При фиксации отрицательных потенциалов мы наблюдали активность каналов с амплитудой около 1-2 пА при -100 мВ, что соответствует проводимости 10-20 пСм.



**Рис. 4.14.**

**Запись активности одиночных ионных каналов, зарегистрированной на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов (режим *on cell*) после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия.**

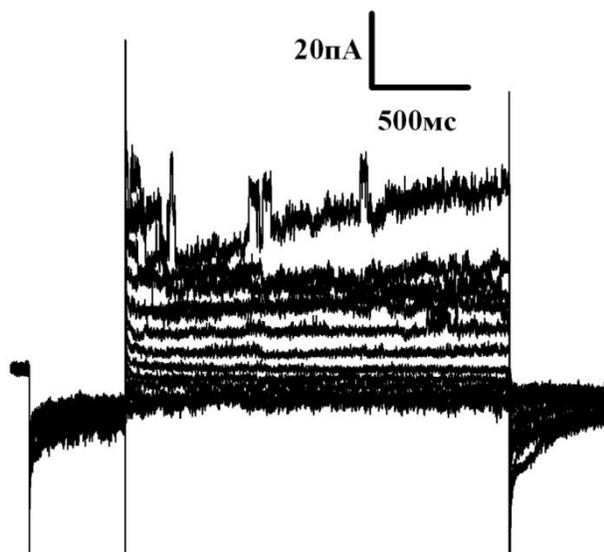
Использована пипетка с сопротивлением 3 Мом. Протокол для тестовых импульсов такой же, как на рис. 4.13. Показана стимуляция только до уровня 100 мВ, 120 мВ и 140 мВ.

Большая величина проводимости каналов при положительных потенциалах свидетельствует о выраженном наружном выпрямлении ион-транспортующего пути. Это согласуется с наружным выпрямлением

макропэтчей, изолированных пипетками с относительно большим отверстием (см. рис. 4.13). Следует отметить, что при осмотическом стрессе, кроме описанных выше событий типа ОЗАК, активировались также каналы с двойной амплитудой (рис. 4.15) и каналы с очень большой амплитудой порядка 30-40 pA при +100 мВ (рис. 4.16), что соответствует хордовой проводимости 300-400 пСм. Эти события, по-видимому, соответствуют активности макси-анионных каналов (см. обзоры (Oiki et al., 1994; Sabirov and Okada, 2009; Sabirov et al., 2016)). На некоторых пэтчах, при стимуляции мембраны небольшими по величине тест-импульсами (порядка  $\pm 25-50$  мВ) можно было наблюдать только активность каналов с большой проводимостью, как это показано на рис. 4.17. Каналы с амплитудой, вдвое больше каналов ОЗАК появлялись достаточно редко. Мы полагаем, что эти события соответствуют не отдельному типу каналов, а скорее отражают одновременное открывание двух каналов типа ОЗАК. Поэтому мы их в дальнейшем не исследовали, а сосредоточили внимание на одиночных каналах типа ОЗАК и на макси-анионных каналах.

Активность ионных каналов промежуточной проводимости и с наружным выпрямлением слабо зависела от мембранного потенциала в диапазоне от  $-100$  мВ до  $+140$  мВ. Это продемонстрировано на рис. 4.18. В то же время, макси-каналы были более активны при небольших величинах мембранного потенциала, не превышающих  $\pm 10-20$  мВ. При фиксации на мембране потенциалов порядка  $\pm 50$  мВ макси-анионные каналы эффективно инактивировались. Потенциал-зависимое закрывание макси-анионного канала продемонстрировано на рисунке 4.17.

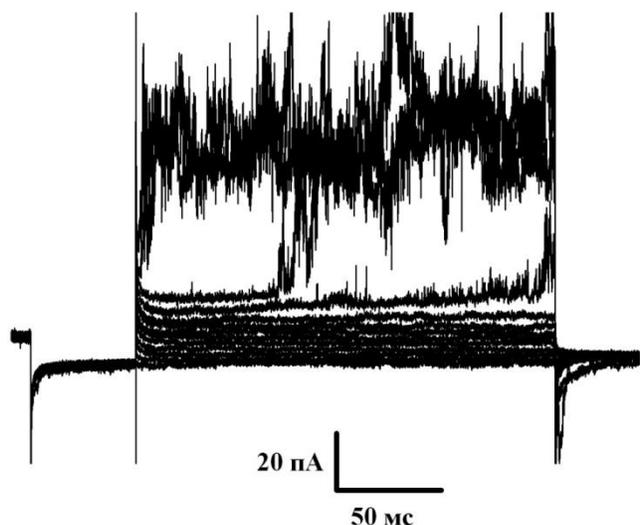
Для исследования вольтамперных характеристик одиночных ионных каналов, мы регистрировали иные токи при подаче на мембрану потенциалов в диапазоне от  $-100$  мВ до  $+140$  мВ с инкрементом 20 мВ. При этом использовались только пэтчи содержащие только 1-2 канала. Пример записи одиночных каналов, использованных для построения вольтамперных характеристик, приведен на рис. 4.18.



**Рис. 4.15.**

**Запись активности ионных каналов с амплитудой, вдвое превышающей амплитуду каналов на рис. 4.9.**

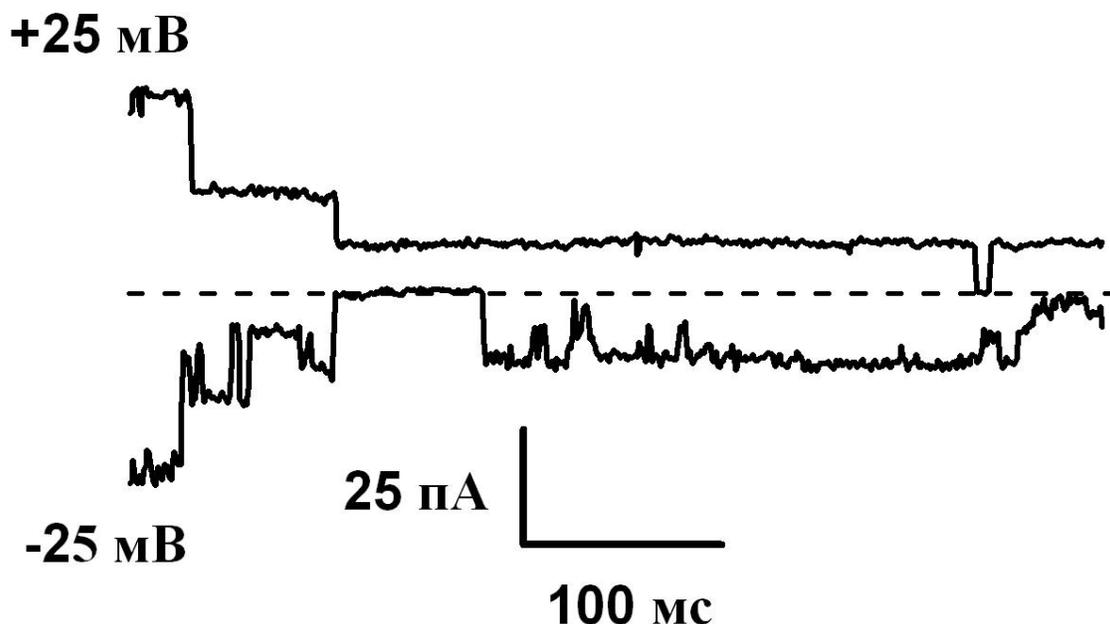
Токи измерены на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов (режим *on cell*) после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия (см. состав сред в разделе Материалы и Методы). Использована пипетка с сопротивлением 3 Мом. Протокол для тестовых импульсов такой же, как на рис. 4.13.



**Рис. 4.16.**

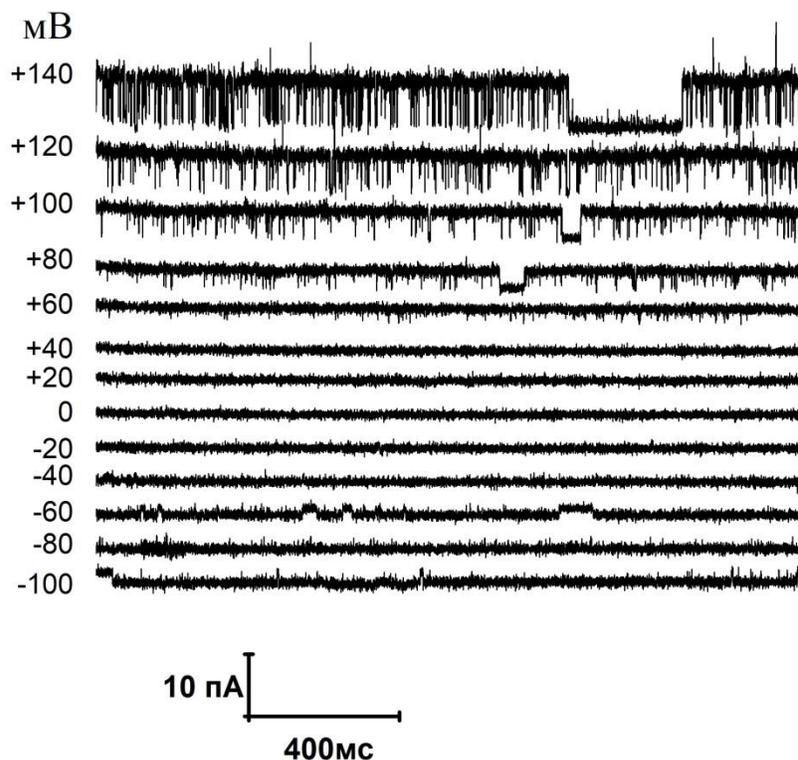
**Запись одновременной активности одиночных ионных каналов с промежуточной и большой амплитудой.**

Ионные токи измерены на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов (режим *on cell*) после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия (см. состав сред в разделе Материалы и Методы). Использована пипетка с сопротивлением 3 МОм. Протокол для тестовых импульсов такой же, как на рис. 4.13.



**Рис. 4.17.**

**Запись активности ионных каналов с большой амплитудой.** Ионные токи измерены на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия (см. состав сред в разделе Материалы и Методы). Использована пипетка с сопротивлением 3 Мом. Потенциал фиксировался на уровне 0 мВ. При стимуляции тестовыми импульсами, мембрана гиперполяризовывалась в течение 0,5 с при  $-25$  мВ и затем потенциал сдвигался до 0 мВ в течение 0,25 с. Затем мембранный потенциал фиксировался на уровне  $+25$  мВ в течение 0,5 сек. с последующим сдвигом до 0 мВ. (Данные на рис. 4.17–4.21 приводятся по: Kurbannazarova et al., 2011)

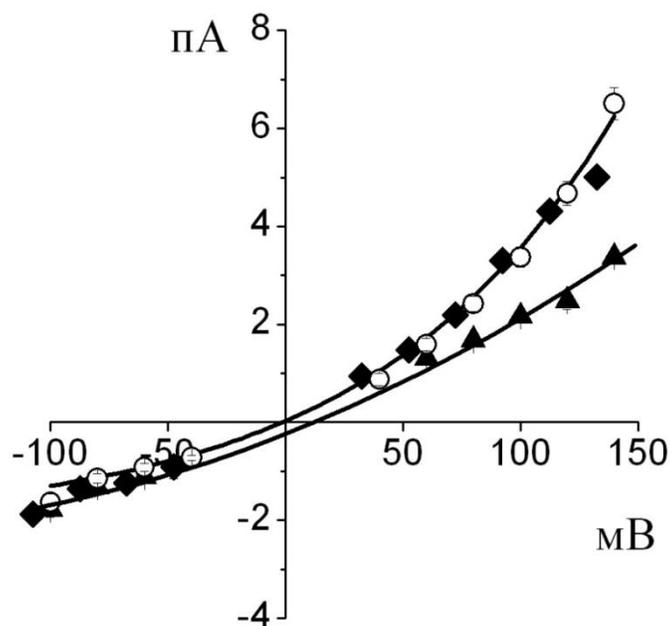


**Рис. 4.18.**

**Запись активности одного ионного канала, зарегистрированной на фрагменте плазматической мембраны тимоцитов после инкубации клеток в течение 10 мин в гипотонической среде с повышенным содержанием ионов калия.**

Состав сред в разделе Материалы и Методы. Использована пипетка с сопротивлением 5 Мом. Протокол для тестовых импульсов такой же, как на рис. 4.13.

Усредненные амплитуды, измеренные при различных мембранных потенциалах, представлены на рис. 4.19. Вольтамперные характеристики имели выраженное наружное выпрямление с отношением ионного тока при +100 мВ к току при -100 мВ, равному  $2,49 \pm 0,26$ . Средняя проводимость одиночных каналов для выходящего тока при +100 мВ составила  $43,1 \pm 1,2$  пСм, а для входящего тока при +100 мВ была равна  $18,8 \pm 0,8$  пСм при -100 мВ.



**Рис. 4.19.**

**Вольтамперные характеристики одиночных ионных каналов с промежуточной проводимостью, активируемых на мембране тимоцитов при осмотическом набухании.**

На графике указаны средние величины 5-29 значений, измеренных на 8-14 различных мембранных фрагментах. Условия регистрации аналогичны описанным на Рис. 4.18. Пипеточный раствор содержал 100 мМ CsCl (светлые кружочки), 100 мМ ТЭАСl (тёмные ромбики) или 30 мМ CsCl (тёмные треугольники). Полный состав пипеточных растворов приведен в Главе II.

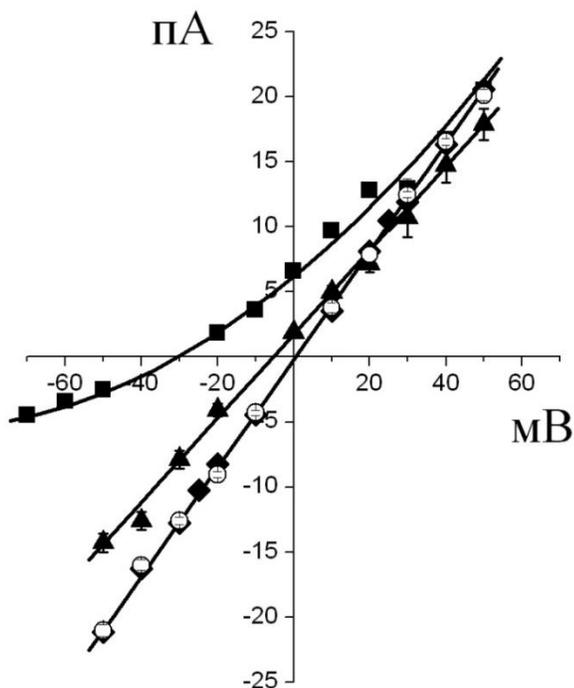
Для того, чтобы установить ионную избирательность зарегистрированных одиночных ионных каналов, мы провели эксперименты по замещению ионов. Когда мы заменили одновалентные катионы в пипеточном растворе на объёмный катион ТЭА<sup>+</sup>, проводимость канала ОЗАК-типа и его вольтамперная характеристика практически не изменились (рис. 4.19: тёмные ромбики). В тоже время, когда мы уменьшили концентрацию хлористого цезия в пипеточном растворе со 100 мМ до 30 мМ, мы наблюдали понижение выходящего ионного тока до  $52 \pm 5 \%$  и сдвиг потенциала реверсии в сторону деполяризации на  $11 \pm 5$

мВ (рис. 4.19: тёмные треугольники). Эти данные однозначно свидетельствуют об анионной избирательности ионных каналов промежуточной проводимости, активируемых на мембране тимоцитов при осмотическом набухании клеток. Таким образом, наружное выпрямление, промежуточная проводимость и анионная избирательность соответствует фенотипу анионных каналов типа ОЗАК, наблюдавшихся ранее в клетках I407 эпителия тонкого кишечника (Okada et al., 1994; Tsumura et al., 1996; Okada, 1997; Ternovsky et al., 2004) и других типах клеток (Jackson and Strange, 1995; Strange et al., 1996; Nilius et al., 1997; Sabirov et al., 2000).

Аналогичные эксперименты были проведены и в отношении каналов большой проводимости. Эти каналы в конфигурации *on-cell* имели линейную вольтамперную характеристику без выпрямления (рис. 4.20: тёмные треугольники) с наклоном, соответствующим проводимости одиночного канала  $322 \pm 7,8$  пСм, что соответствует свойствам макси-анионного канала, описанным ранее. Небольшой сдвиг потенциала реверсии в сторону отрицательных напряжений, по-видимому, является следствием меньшей концентрации ионов хлора в цитоплазме клетки по сравнению с наружным раствором. Так как наиболее сильным стимулом для активации макси-анионного канала является отрыв пэтча, дальнейшие эксперименты проводились на оторванных мембранных фрагментах в конфигурации *inside-out*.

Пипетки заполнялись раствором Рингера, и экспериментальная ячейка также перфузировалась раствором Рингера. В этих условиях вольтамперные характеристики были симметричными и линейными (рис. 4.20: светлые кружочки) с наклоном, соответствующим проводимости одиночного канала  $418 \pm 3.2$  пСм. Замена ионов натрия на ионы ТЭА не вызвала заметных изменений в форме вольтамперных характеристик (рис. 4.20: тёмные ромбики). В то же время уменьшение концентрации ионов хлора с 146 мМ до 11 мМ путем эквимоллярной замены на анионы глутамата приводила к сдвигу потенциала реверсии в сторону отрицательных напряжений до значения  $-30,4 \pm 0,3$  мВ. Этот результат однозначно свидетельствует об анионной селективности каналов большой проводимости. Расчетное отношение проницаемости глутамата к

проницаемости по хлору было равно  $0,211 \pm 0,003$ . Таким образом, линейная ВАХ, большая проводимость одиночных каналов и анион избирательность соответствует фенотипу макси-анионного канала, описанного ранее на других типах клеток (Sabirov and Okada, 2009; Sabirov et al., 2016).



**Рис. 4.20.**

**Вольтамперные характеристики одиночных ионных каналов с большой проводимостью, активируемых на изолированном фрагменте мембраны тимоцитов при отрыве пэтча.**

На графике указаны усредненные величины 5-30 значений, измеренных на 7-10 различных мембранных фрагментах. Одиночные каналы регистрировались в режиме *cell-attached* с пипеточным раствором, содержащим 100 мМ ТЭАСl и 100 мМ КСl в ячейке (тёмные треугольники), либо в режиме *inside-out*, когда пипеточный раствор содержал 135 мМ NaCl (раствор Рингера), а ячейка была заполнена раствором Рингера (светлые кружочки), или раствором Рингера, в котором 135 мМ NaCl были эквимольно замещены на 135 мМ ТЭАСl (тёмные ромбики) или 135 мМ Na-глутамат (тёмные прямоугольники).

В соответствии с описанными в литературе данными и нашими собственными предыдущими наблюдениями, одиночные каналы типа ОЗАК должны эффективно подавляться флоретином, тогда как одиночные каналы макси-анионного типа должны блокироваться ионами  $Gd^{3+}$ . Действительно, в наших экспериментах активность каналов промежуточной проводимости практически полностью исчезла при добавлении в пипеточный раствор флоретина в концентрации 200 мкМ (рис. 4.21).

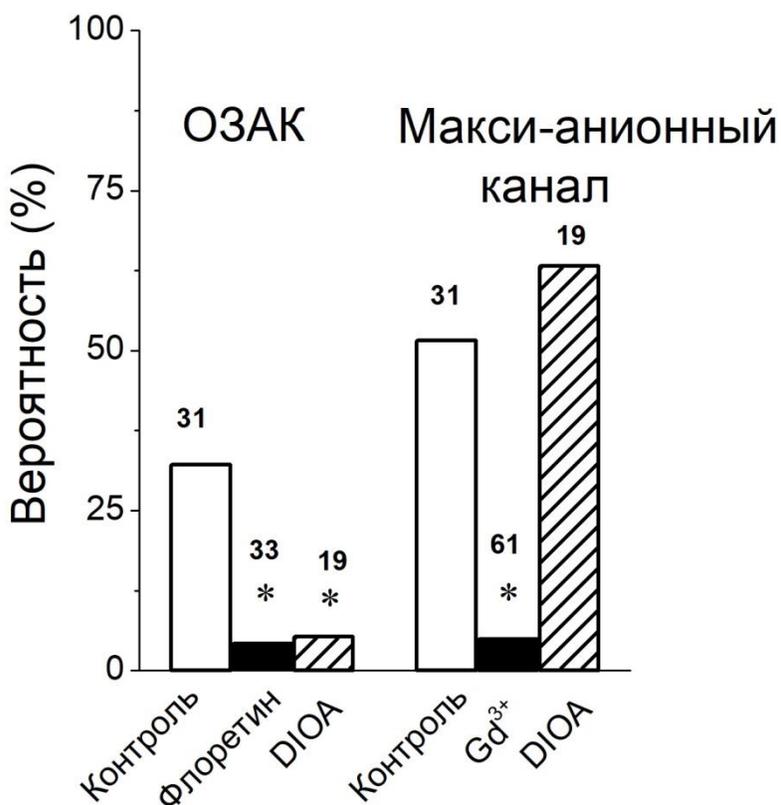


Рис. 4.21.

**Влияние флоретина, DIOA и ионов  $Gd^{3+}$  на активность каналов промежуточной амплитуды ОЗАК и каналы с большой амплитудой проводимости (макси-анионный канал).**

Цифры показывают количество пэтчей, содержащих каналы, деленное на общее число пэтчей. Звездочки (\*) – статистически значимое отличие от контроля при  $P < 0,05$ .

Ионы гадолиниума подавляли активность каналов большой амплитуды при концентрации 50 мкМ в пипетке (рис. 4.21). В наших

экспериментах, ингибитор  $K/Cl$  котранспортера DIOA, оказывал выраженное ингибирующее действие на активность одиночных ионных каналов типа ОЗАК. В то же время, общая активность макси-анионных каналы не подавлялась, а скорее даже возрастала в присутствии этого реагента (рис. 4.21). Эти данные находятся в хорошем соответствии с измерениями макроскопического мембранного тока, в которых DIOA оказывал ингибирующее действие на мембранный ток типа ОЗАК (измеренный с АТФ-содержащим пипеточным раствором) с гораздо большей эффективностью, чем на мембранный ток, измеренный при истощении внутриклеточного АТФ с помощью без-АТФных пипеточных растворов в режиме *whole-cell*.

#### §4.4. Обсуждение

В литературе обсуждаются различные транспортные пути, которые вносят вклад в процесс регуляции клеточного объема при осмотическом стрессе. При набухании клеток в гипоосмотической среде наблюдается выброс из клеток ионов  $K^+$  и  $Cl^-$ , который может осуществляться с помощью трех возможных механизмов (Lang et al., 1998; Wehner et al., 2003; Okada, 2004; Hoffmann et al., 2009):

1) сопряженный  $K/Cl$  котранспорт; 2) параллельная активация  $K^+/H^+$  и  $Cl^-/HCO_3^-$  обмена; 3) параллельная активация  $K^+$  and  $Cl^-$  каналов. Результаты наших электрофизиологических исследований, изложенные в данной главе, впервые дают твердые доказательства того, что тимоциты регулируют свой объем по третьему механизму. Однако ранее, путем применения радиоактивных изотопов и измерения сопряженных потоков ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  было показано, что эти потоки сопряжены (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993). Мы полагаем, что такое сопряжение может происходить в силу соблюдения принципа электронейтральности: нетто поток ионов калия может происходить только в том случае, когда он сопровождается эквивалентным потоком анионов, в данном случае – хлора, так как в противном случае будет возникать мембранный потенциал со знаком минус внутри клетки, который будет препятствовать

движению катионов  $K^+$  из клетки во внеклеточную среду. Одно из противоречий вышеупомянутых исследований с изотопами заключалось в чувствительности этих потоков к единственному доступному ингибитору сопряженного  $K/Cl$  котранспортера – соединению DIOA. Мы в наших экспериментах впервые показали, что этот ингибитор не является абсолютно селективным и способен подавлять также активность объём-зависимых хлорных каналов типа ОЗАК. Это было показано как на уровне макроскопических интегральных токов, так и на уровне активности одиночных ионных каналов. Таким образом, чувствительность каналов типа ОЗАК к DIOA органично объясняет противоречие в выводах, сделанных в работах (Arrazola et al., 1993; Soler et al., 1993) относительно роли сопряженного  $K/Cl$  котранспортера, и нашим выводом о ведущей роли калиевых и хлорных каналов в обеспечении регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.

Ранее в работе (Feraу et al., 2000) было показано, что при очень высоких концентрациях внеклеточного калия происходит массовый выброс ионов  $Mg^{2+}$  из тимоцитов, который подавлялся DIOA. Мы полагаем, что это наблюдение также может быть опосредовано чувствительностью каналов ОЗАК к этому соединению, так как принцип электронейтральности требует, чтобы поток ионов  $Mg^{2+}$  был сопряжен с эквивалентным потоком анионов, который может происходить через эти анионные каналы.

Известно, что атрофия тимуса и истощение тимоцитов при инфекционных заболеваниях и недостаточном питании приводят к иммунной недостаточности (Savino and Dardenne, 2000). Результаты наших исследований позволяют предполагать, что тимические хлорные каналы ОЗАК, известные также как ключевые регуляторы пролиферации и апоптоза, могут представлять собой перспективную мишень для иммуномодуляторов нового поколения. Макси-анионный канал является важным транспортным путем для АТФ и глутамата в процессах межклеточной сигнализации (Sabirov and Okada, 2005; Okada et al., 2009; Sabirov and Merzlyak, 2012; Sabirov et al., 2016) и поэтому также может быть мишенью для иммунотерапии.

## **ГЛАВА V. РОЛЬ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОГО АНИОННОГО ТРАНСПОРТА В ВЫБРОСЕ ГЛУТАТИОНА ИЗ ТИМОЦИТОВ ПРИ ГИПООСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

### **§5.1. Роль глутатиона в клеточных процессах и гипотетические пути его выброса при осмотическом стрессе**

Окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы и внеклеточной среды является одним из важнейших параметров, определяющих эффективность физиологических процессов. Клетка поддерживает высокий уровень восстановительного потенциала цитозоля, тогда как просвет эндоплазматического ретикулума, также как и внеклеточная среда, является более окисляющей, что очень важно для стабильности мембранных белков, структура которых стабилизируется за счет цистеин-цистеиновых дисульфидных связей. Глутатион является одним из основных восстановителей цитоплазмы. Глутатион – это трипептид  $\gamma$ -глутамилцистеилглицин; он существует в двух формах: восстановленного мономера и окисленного димера. Глутатион присутствует в цитоплазме клеток главным образом в редуцированной форме (90 – 95 % от общего количества). Концентрация внутриклеточного глутатиона в большинстве типов клеток составляет около 1-2 мМ. В клетках печени обычно содержится существенно большее количество глутатиона (порядка 10 мМ), что связано с тем, что эта молекула расходуется в больших количествах для детоксикации ксенобиотиков, которые (в форме конъюгатов с глутатионом) выбрасываются из клеток с помощью специальных АТФаз (таких как пи-гликопротеин) (Forman et al., 2009).

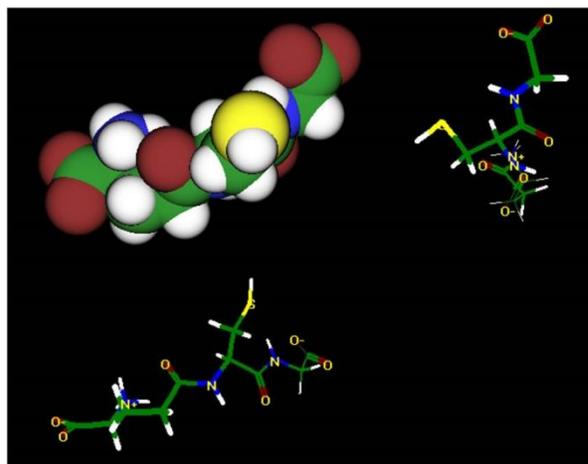
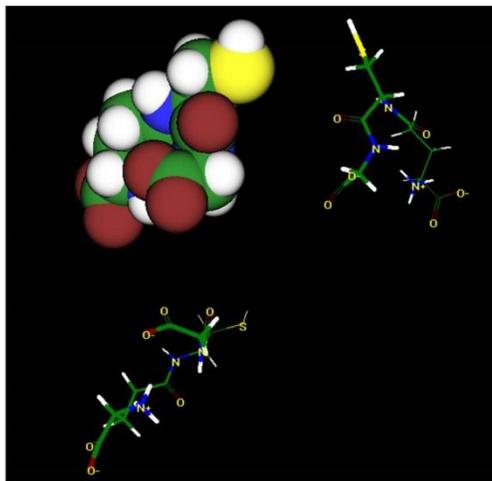
Небольшое количество глутатиона может находиться также и в межклеточной среде. В интерстициальной жидкости концентрация глутатиона составляет несколько мкМ, а в плазме эта величина обычно вдвое выше. В то же время, в тонком слое жидкости, покрывающей легочный эпителий, концентрация глутатиона приближается к 400 мкМ, что на два порядка выше, чем в обычном интерстициуме. Это связано с

тем, что на поверхности легочного эпителия происходит интенсивный газообмен, и как следствие, мощный окислительный стресс. Поэтому, эпителиальные клетки альвеол активно экскретируют глутатион во внеклеточную среду (Childers et al., 2007) и тем самым защищают себя от свободно-радикального окисления. Выброс глутатиона может происходить при различных, предположительно стрессовых) физиологических состояниях. Однако как стимулы, приводящие к выбросу из клеток глутатиона, так и пути его выхода из клеток в настоящее время остаются мало изученными. В наших недавних работах мы показали, что гипоосмотический стресс является мощным стимулом для массового выброса глутатиона из тимоцитов во внеклеточную среду, а фармакология этого процесса указывает на возможную роль объем-зависимого анионного канала, хотя анионные транспортеры, такие как SLCO/OATP и SLC22A/OAT, также, по-видимому, вносят заметный вклад в этот процесс, хотя вклад макси-анионного канала незначителен (Меланова с соавт., 2011). Молекула глутатиона несет на себе два отрицательных и один положительный заряд, и ее общий заряд равен  $-1$ . Результат нашего молекулярного моделирования с использованием пакета программ Molecular Modeling Pro (Norgwyn Montgomery Software Inc., North Wales, PA) показал, что отрицательно заряженная С-концевая карбоксильная группа глицина может формировать солевой мостик с положительно заряженной N-концевой амино-группой глутаминовой кислоты (рис. 5.1). Однако, так как молекула находится в водной среде, то гидратация заряженных групп должна препятствовать формированию стабильного солевого мостика, и поэтому молекула будет находиться в динамическом равновесии между этими двумя крайними формами. Эффективный радиус молекулы, рассчитанный как половина геометрического среднего ее линейных размеров, оказалась равной 0,52 нм для компактной формы и 0,56 нм для протяженной формы (рис. 5.1).

## Глутатион: $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеил-глицин (восстановленная форма)

*Компактная форма с солевым мостиком*

*Протяженная форма без солевых мостиков*



Размеры молекулы: 0.978x1.12x1.03 nm

Размеры молекулы: 1.47x1.01x0.956 nm

Эффективный радиус:

$$(1/2) (0.978 \times 1.12 \times 1.03)^{(1/3)} = 0.52 \text{ nm}$$

Эффективный радиус:

$$(1/2) (1.47 \times 1.01 \times 0.956 \text{ nm})^{(1/3)} = 0.56 \text{ nm}$$

**Рис. 5.1.**

**Молекулярная модель молекулы глутатиона в двух конформациях: компактной с одним солевым мостиком (левый рисунок) и протяженной без формирования солевого мостика.**

В водной среде гидратация заряженных групп будет препятствовать формированию стабильного солевого мостика, и поэтому молекула будет находиться в динамическом равновесии между этими двумя крайними формами. Размеры молекула определены с помощью пакета программ Molecular Modeling Pro (Norgwyn Montgomery Software Inc., North Wales, PA), эффективные радиусы рассчитаны как половина геометрического среднего значения молекулярных размеров.

Принимая во внимание, что эффективный радиус канала ОЗАК, определенный с использованием метода исключения нейтральных полимеров, был равен 0,63 нм (Ternovsky et al., 2004), можно было предположить, что именно ОЗАК может служить транспортным путем для

выброса глутатиона в условиях гипоосмотического стресса. Эту гипотезу мы проверили сначала в экспериментах по определению массового выброса глутатиона из тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса (эта часть экспериментов выполнена Мелановой Н.Р.), а затем в прямых экспериментах методом микролокального отведения токов (пэтч-кламп) в конфигурации whole-cell.

## **§5.2. Общая характеристика транспортных путей системы выброса глутатиона из тимоцитов.**

В наших экспериментах мы зарегистрировали заметные количества глутатиона во внеклеточной среде даже в отсутствии стимуляции при инкубации тимоцитов в нормальных изоосмотических условиях. При этом, количественное колориметрическое определение глутатиона проводили по методу, основанному на окислении GSH до дисульфида GSSG при взаимодействии с 5,5'-дитиобис 2-нитробензойной кислотой (5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid, DTNB), который при этом восстанавливается до 5-тио-2-нитробензойной кислоты (5-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB). Продукт реакции (TNB) имеет жёлтую окраску и определяется фотометрически при 425 нм. В присутствии глутатионредуктазы и НАДФН происходит непрерывная рециклизация GSSG, который при этом восстанавливается до исходного GSH. Поэтому, в комбинированной реакции глутатион играет роль катализатора в общей реакции восстановления DTNB до TNB за счет НАДФН, скорость которой прямо пропорциональна концентрации глутатиона в микромолярном диапазоне.

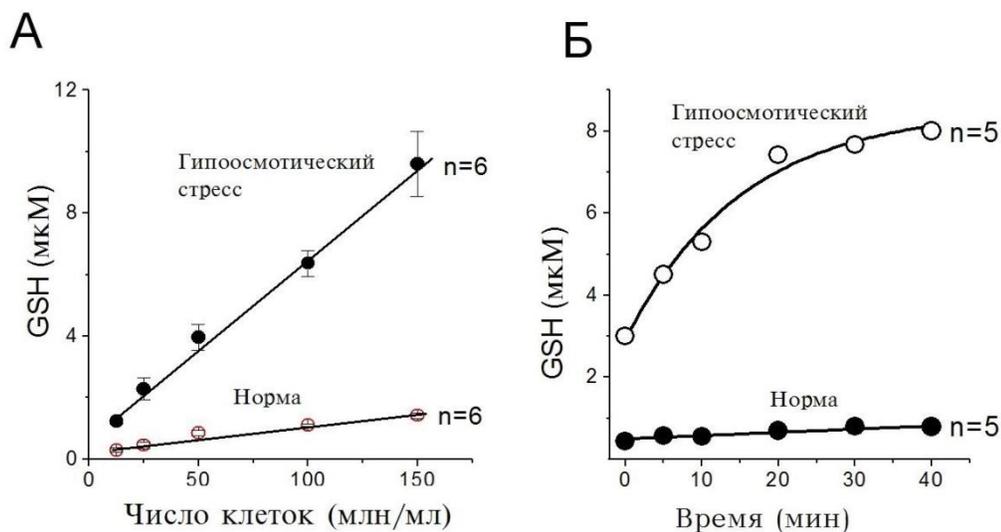
Базовый выход глутатиона составил  $0,29 \pm 0,07$  мкМ при концентрации клеток в суспензии, равной 12,5 млн/мл и  $1,11 \pm 0,04$  мкМ в суспензии, содержащей 100 млн/мл клеток после 10-мин инкубации. В условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) мы наблюдали резкое увеличение выброса глутатиона, который составил  $1,23 \pm 0,09$  мкМ и  $6,37 \pm 0,04$  мкМ в суспензии с концентрацией клеток 12,5 млн/мл и 100 млн/мл после 10-минутной инкубации, соответственно. Зависимость содержания глутатиона во внеклеточной среде от числа клеток в

суспензии была близка к линейной как при нормальных изотонических условиях, так и в условиях гипоосмотического стресса, как это показано на рис. 5.2: А. Это является доказательством того, что именно тимоциты являются источником глутатиона во внеклеточной среде в наших экспериментальных условиях.

Кинетика выхода глутатиона заметно отличалась в изотонических и гипотонических условиях. Так, если базовый выход глутатиона в нормальных условиях плавно увеличивался во времени, то при гипоосмотическом стрессе мы наблюдали, резкое скачкообразное увеличение содержания глутатиона в среде в начальный момент времени, которое затем сменялось плавным ростом до примерно постоянного уровня, которое достигалось после 20-минутной инкубации (рис. 5.2: Б). Такая двухфазная кинетика, по-видимому, может свидетельствовать о наличии, по крайней мере, двух механизмов выхода глутатиона из тимоцитов с различными кинетическими параметрами.

Температура среды инкубации оказывала существенное влияние на выход глутатиона как в нормальных условиях, так и в условиях гипоосмотического стресса. Выход глутатиона из тимоцитов плавно увеличивался с повышением температуры в диапазоне от 15°C до 37°C при обоих условиях эксперимента. При 42°C рост выхода глутатиона сменялся его падением, что возможно отражает нарушение функционирования системы выброса глутатиона в условиях температурного шока (рис. 5.3: А). Температурные зависимости в диапазоне 15-37°C были линейными в координатах Аррениуса, а кажущаяся энергия активации процесса составила  $11,1 \pm 1,8$  ккал/моль и  $5,4 \pm 0,6$  ккал/моль для базового выхода глутатиона и его выхода при гипоосмотическом стрессе, соответственно (рис. 5.3: Б).

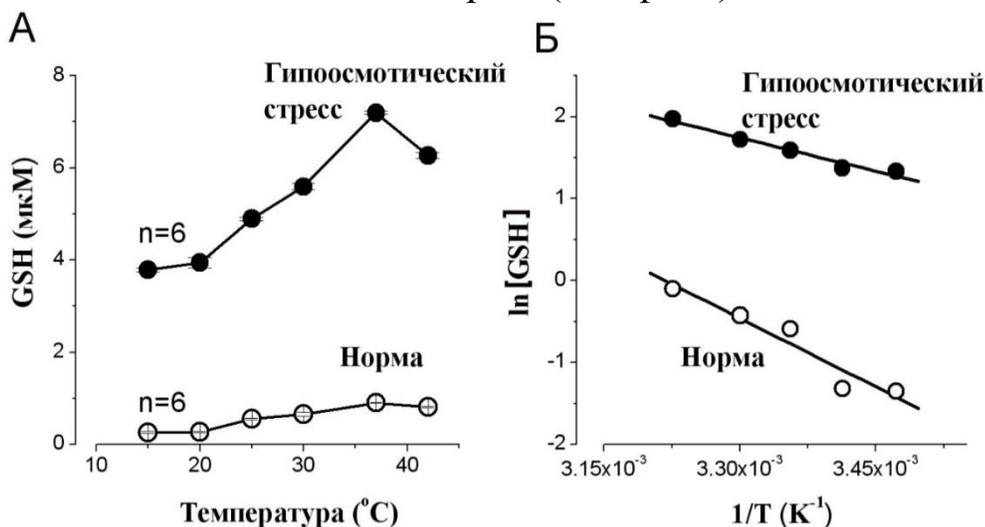
Столь различная величина энергии активации, по-видимому, свидетельствует о различии механизмов выхода глутатиона при этих двух условиях эксперимента. Относительно низкая энергия активации, полученная в гипоосмотических условиях, может свидетельствовать в пользу диффузионного механизма транспорта глутатиона через мембрану осмотически набухших клеток с участием ионных каналов.



**Рис. 5.2.**

**Выход глутатиона в нормальной изотонической среде и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) в зависимости от концентрации клеток в суспензии (А: время инкубации 10 мин) и времени (Б: концентрация клеток 100 млн/мл).**

Эксперименты проведены при 25°C. Во всех случаях  $P < 0,05$  относительно нормы (контроль).



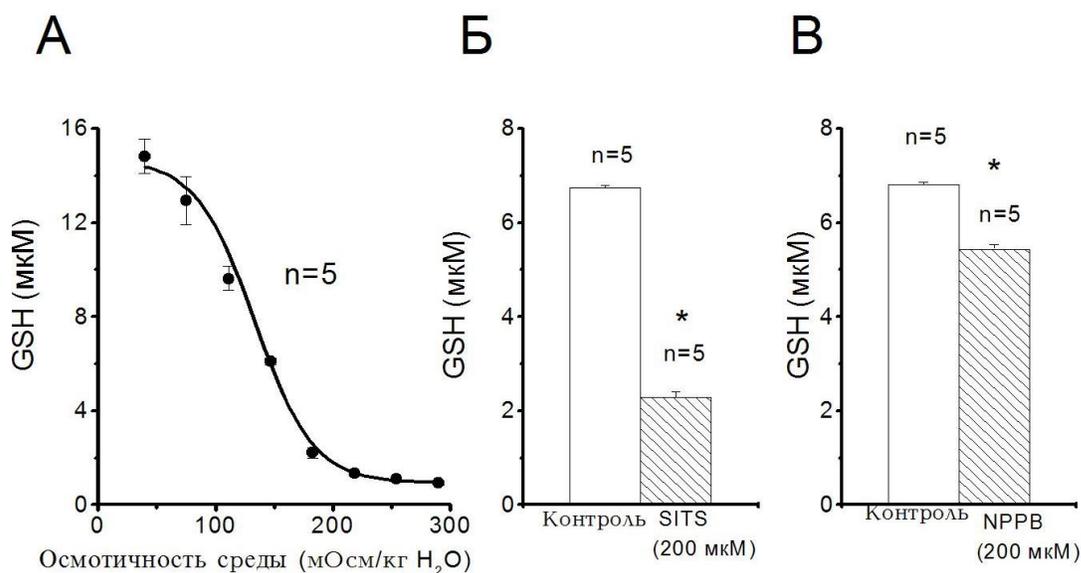
**Рис. 5.3.**

**Выход глутатиона в нормальной изотонической среде и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) в зависимости от температуры в обычных координатах (А) и координатах Аррениуса (Б).**

Концентрация клеток 100 млн/мл. Время инкубации 10 мин. Во всех случаях  $P < 0,05$  относительно контроля.

Зависимость выхода глутатиона от осмотического давления среды имела сигмовидный характер, а 50%-й выход глутатиона наблюдался при осмотичности среды, равной  $125,1 \pm 4,3$  мОсм/кг  $H_2O$  (Рис.5.4: А). В дальнейших экспериментах осмотичность гипотонического раствора составляла 147 мОсм/кг  $H_2O$ .

Молекула глутатиона имеет отрицательный заряд и поэтому теоретически может транспортироваться через системы анионного транспорта. Действительно, блокаторы анионного транспорта широкого спектра действия, SITS (4-ацетиамидо-4-изотиоцианатостиблен-2,2-дисульфоновая кислота) и NPPB (5 нитро-2-(3-фенилпропиламино)-бензойная кислота) значительно подавляли выход глутатиона в условиях гипоосмотического стресса. Так, выброс глутатиона ингибировался на  $66,0 \pm 5,3$  % и  $18,8 \pm 1,7$  % по сравнению с его контрольным значением в присутствии в среде SITS и NPPB при концентрации 200 мкМ, соответственно (Рис.5.4: Б и В).

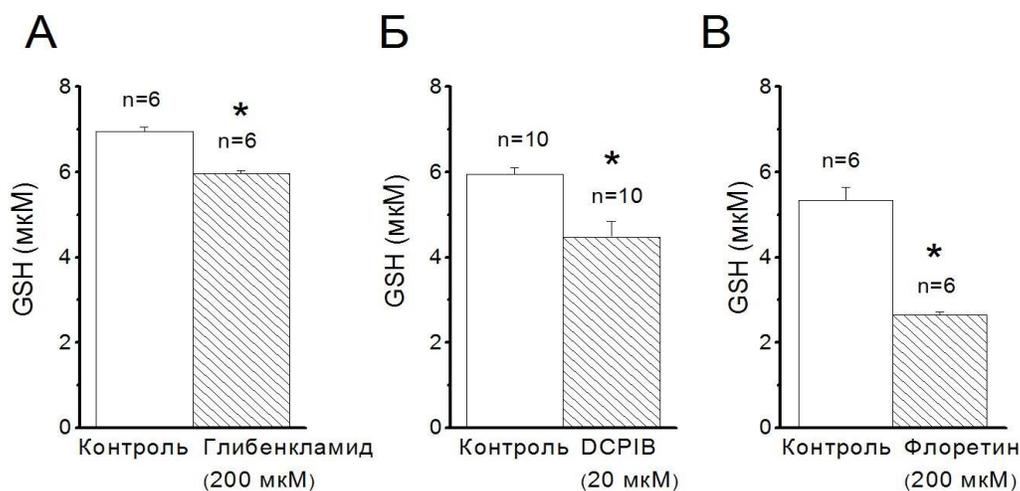


**Рис 5.4.**

**Зависимость выхода глутатиона от осмотического давления среды (А) и от присутствия в среде ингибиторов анионного транспорта SITS (200 мкМ) (Б) и NPPB (200 мкМ) (В).**

Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ .

Известно, что при осмотическом набухании клеток в основном активируются два типа анионных каналов: это объём-зависимый анионный канал наружного выпрямления с промежуточной проводимостью и макси-анионный канал. Ионы  $Gd^{3+}$  (50 мкМ), которые среди анионных каналов блокируют только макси-анионный канал, не оказывали существенного влияния на выброс глутатиона из тимоцитов, что указывает на то, что этот канал не участвует в процессе выхода глутатиона. В то же время, блокаторы объём-зависимого анионного канала наружного выпрямления – флоретин (200 мкМ), 4-(2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил 1-индан-1-он-5-ил)-оксимасляная кислота (ДСРІВ) (20 мкМ), и глибенкламид (200 мкМ) значительно подавляли выход глутатиона из тимоцитов. Так, выброс глутатиона ингибировался в присутствии в среде флоретина на  $61,9 \pm 2,3$  %, ДСРІВ на  $35,8 \pm 2,0$  %, и глибенкламида на  $14,2 \pm 1,2$  %, соответственно. (Рис. 5.5: А, Б и В). Этот результат прямо указывает на ведущую роль этого канала в транспорте глутатиона в гипоосмотических условиях.



Рис

### 5.5.

**Действие блокаторов объём зависимого анионного канала наружного выпрямления – глибенкламида (200 мкМ) (А), ДСРІВ (20 мкМ) (Б) и флоретина (200 мкМ) (В) на выход глутатиона из ТИМОЦИТОВ.**

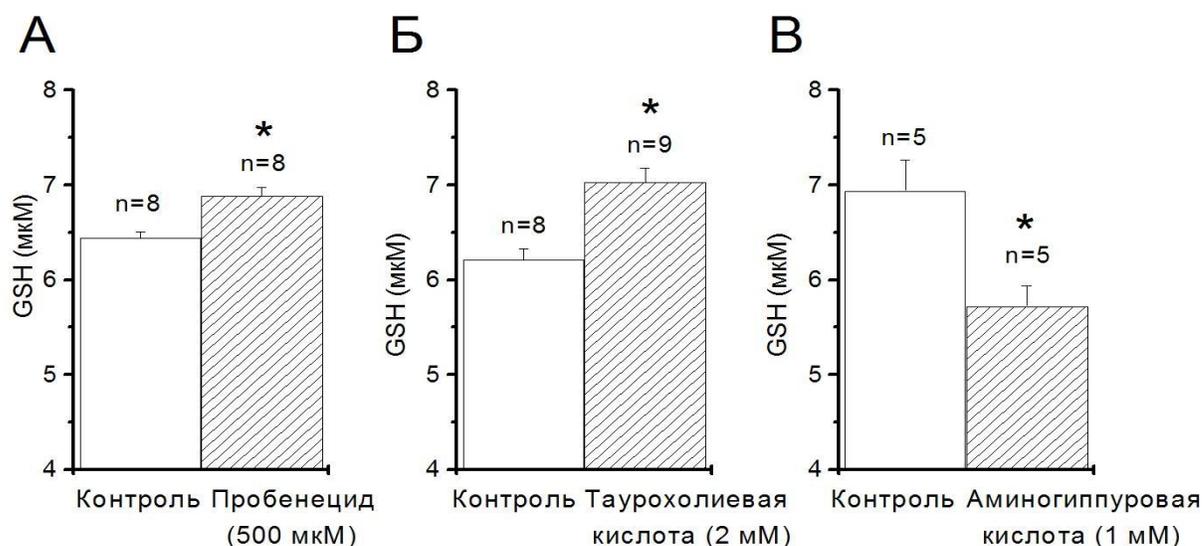
Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ .

В трансмембранном переносе глутатиона могут принимать участие не только ионные каналы, но также и анионные транспортеры. Так, известно, что мембранный белок АВСС/MRP является АТФазой, которая активно выбрасывает из клеток органические анионы за счет гидролиза АТФ. Однако в наших экспериментах, пробенецид, который является субстратом этого белка и способен подавлять его функцию при добавлении с внеклеточной стороны, приводил не к ингибированию, а к стимуляции выброса глутатиона на  $6,8 \pm 1,3\%$  (Рис. 5.6: А). Этот результат, с одной стороны, свидетельствует против роли АВСС/MRP в процессе выброса глутатиона, и с другой стороны, может указывать на присутствие другого анионного транспортера, а именно – обменника, активность которого будет расти в присутствии субстрата с внеклеточной стороны мембраны. Действительно, пробенецид является субстратом не только для АВСС/MRP, но и для транспортера органических анионов SLCO/OATP, который обменивает анионы с противоположных сторон от мембраны. Чтобы подтвердить роль этого транспортера, мы исследовали выброс глутатиона в присутствии другого субстрата SLCO/OATP – таурохолиевой кислоты. В наших экспериментах это вещество также вызывало транс-стимуляцию выброса глутатиона на  $13,2 \pm 2,1\%$  (Рис. 5.6: Б).

Мембранный белок SLC22A/OAT относится к группе натрий-зависимых транспортеров для анионов и ингибируется аминокислотной кислотой. В наших экспериментах, это вещество подавляло выброс глутатиона на  $17,5 \pm 3,8\%$  (Рис. 5.6: В).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что выход глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе осуществляется с участием нескольких транспортных путей. Ведущую роль в этом процессе играет объём-зависимый анионный канал наружного выпрямления, который может обеспечивать до 60% от всего выброса глутатиона. Остальная часть общего пула глутатиона может выходить из клеток через транспортеры, такие как SLCO/OATP и SLC22A/OAT. АТФаза АВСС/MRP, по-видимому, не принимает участия в выбросе глутатиона из клеток в наших экспериментальных условиях.

Известно, что аденилатциклазная система контролирует большинство внутриклеточных процессов. В наших экспериментах мы увеличивали концентрацию внутриклеточного цАМФ тремя различными способами: 1) путем внесения в среду мембранопроникающего аналога – дибутирил-цАМФ (0,1-1 мкМ), 2) путем активации аденилатциклазы форсколином (10 мкМ) и 3) путем ингибирования фосфодиэстеразы теофиллином (3 мМ). Во всех случаях мы наблюдали статистически значимое подавление выброса глутатиона, которое составило от 10% для теофиллина до 32% для дибутирил-цАМФ (0,1 мкМ). Этот результат свидетельствует о том, что имеется тесная связь между аденилатциклазной системой (а значит и цАМФ-зависимыми гормональными системами) и выбросом глутатиона при гипоосмотическом стрессе.



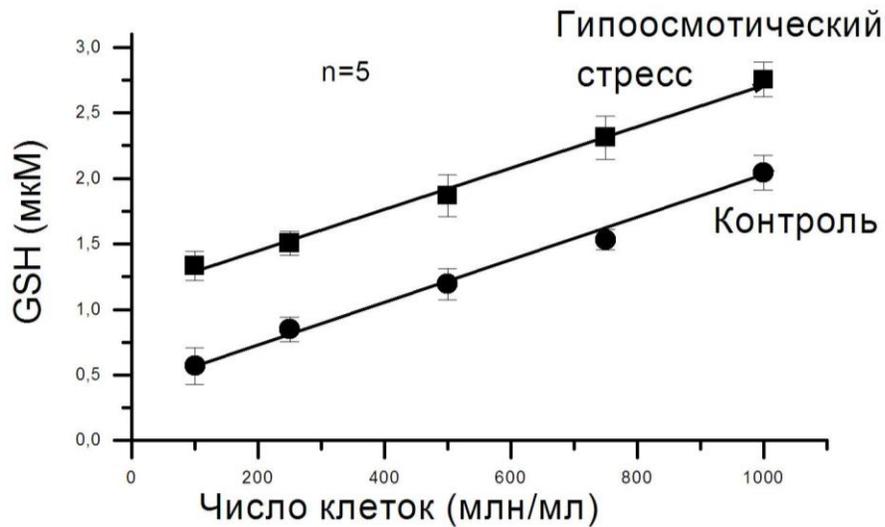
**Рис. 5.6.**

**Действие субстрата мембранного транспортера АВСС/MRP, пробенецида (500 мкМ) (А), субстрата мембранного транспортера SLCO/OATP, таурохолиевой кислоты (2 мМ) (Б) и ингибитора мембранного транспортера SLC22A/OAT, аминогиппуровой кислоты (1 мМ) (В) на выход глутатиона из тимоцитов.**

Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0,05$ . (Данные на рис. 5.2–5.6 приводятся по: Sabirov et al., 2013)

Изложенные выше результаты свидетельствуют о массовом выбросе глутатиона из тимоцитов во внеклеточную среду, как в нормальных условиях, так и при гипоосмотическом стрессе. Присутствует ли аналогичная система регулируемого выброса глутатиона в других типах клеток? Для ответа на этот вопрос мы исследовали выход глутатиона из нормальных человеческих эритроцитов после 20 минутной инкубации в среде с различной тоничностью при варьировании числа клеток в суспензии. Было установлено, что концентрация глутатиона во внеклеточной среде в суспензии эритроцитов с концентрацией 100 млн/мл составляет  $0,57 \pm 0,14$  мкМ ( $n=5$ ) при изотонических условиях и  $1,33 \pm 0,11$  мкМ ( $n=5$ ) в гипоосмотической среде. Концентрация внеклеточного глутатиона росла линейно с ростом числа клеток в суспензии в диапазоне от 100 млн/мл до 1 млрд/мл (Рис. 5.7).

В расчете на одну клетку, скорость выхода глутатиона из эритроцитов составила в нормальной среде  $0,09 \times 10^{-15}$  г/мин, а и при гипоосмотическом стрессе  $0,2 \times 10^{-15}$  г/мин. Для сравнения этих величин со скоростью выброса глутатиона из тимоцитов мы пересчитали данные, приведенные на рисунке 1А, в расчете на одну клетку. Анализ данных показал, что скорость выхода глутатиона из тимоцитов составляет  $0,34 \times 10^{-15}$  г/мин и  $1,96 \times 10^{-15}$  г/мин в нормальных и гипоосмотических условиях, соответственно. Сравнение этих величин с данными для эритроцитов показывает, что скорость выброса глутатиона из красных кровяных клетках примерно в 4 раза медленнее, чем из тимоцитов в нормальной среде и практически в 10 раз медленнее в условиях гипоосмотического стресса. Хотя скорость выброса глутатиона из эритроцитов оказалась достаточно низкой по сравнению с тимоцитами, однако, учитывая то, что эритроциты составляют основную массу форменных элементов крови, этой скорости, по-видимому, вполне достаточно для того, чтобы обеспечить физиологический уровень глутатиона в плазме. Высокая скорость выхода глутатиона из тимоцитов может свидетельствовать о важной роли этой молекулы в физиологических процессах, протекающих во внеклеточной среде тимуса.



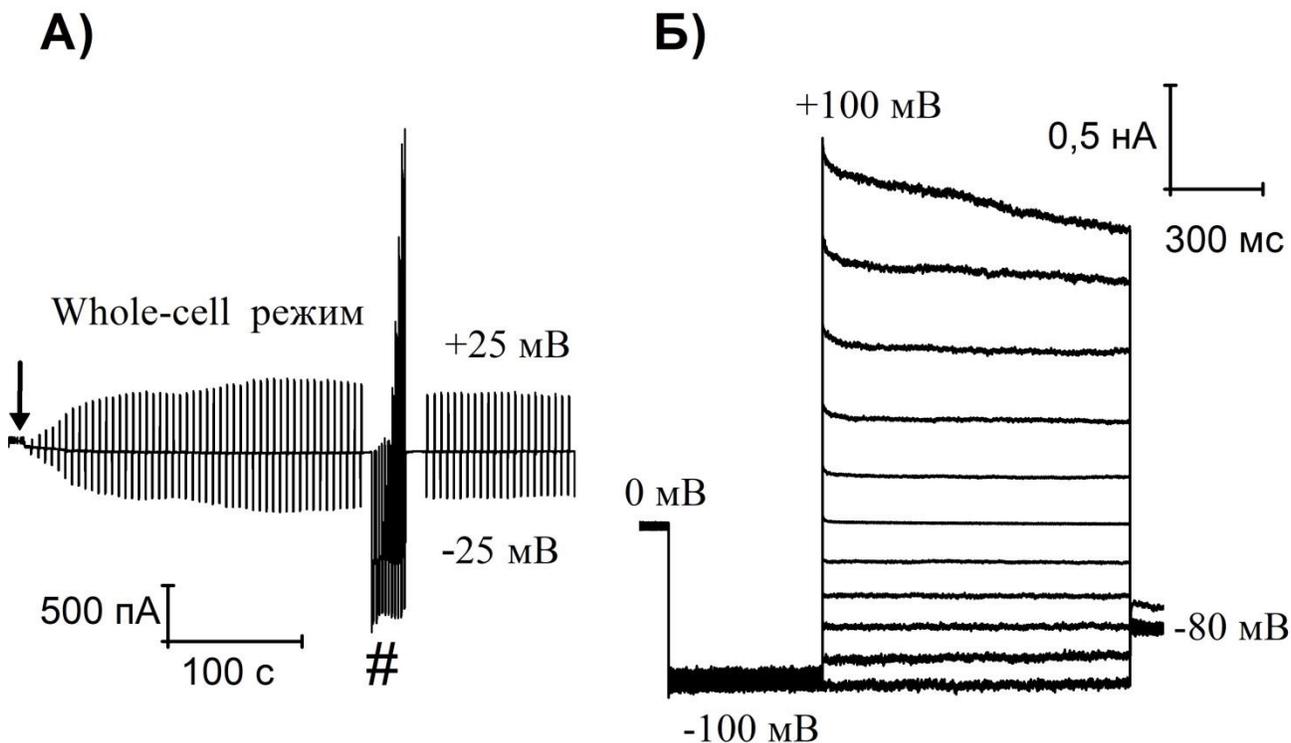
**Рис. 5.7.**

**Выход глутатиона из красных кровяных клеток человека в нормальном состоянии (290 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О).**

### **§5.3. Проницаемость объем-зависимого анионного канала к глутатиону при замене ионов хлора во внеклеточной среде на ионы глутатиона**

В наших дальнейших экспериментах мы протестировали возможность физического перемещения молекулы GSH через плазматическую мембрану набухших тимоцитов крыс с помощью метода пэтч-кламп. Как и в наших предыдущих экспериментах (см. раздел 4.1), в данной серии экспериментов мы индуцированное набухание клеток, используя гипертонический пипеточный раствор (добавлен маннитол), а не гипотонический раствор в экспериментальной ячейке, так как именно в этих условиях обеспечивалась стабильная конфигурация whole-cell получались воспроизводимые результаты по измерению макроскопического тока от всей клетки. Как показано на рис. 5.8: А, так же, как и в случае мышинных клеток, прорыв пэтча и образование конфигурации whole-cell сопровождалось увеличением ионного тока через мембрану тимоцитов крыс, которое шло параллельно визуально

наблюдаемому набуханию клеток. Стационарный уровень проводимости достигался примерно через 3 мин после прорыва мембраны и был близок к значениям, показанным на рис. 4.1 для тимоцитов мыши (см. раздел 4.1). Макроскопический ток инактивировался при больших положительных потенциалах (больше +80 мВ, рис. 5.8: Б).



**Рис. 5.8.**

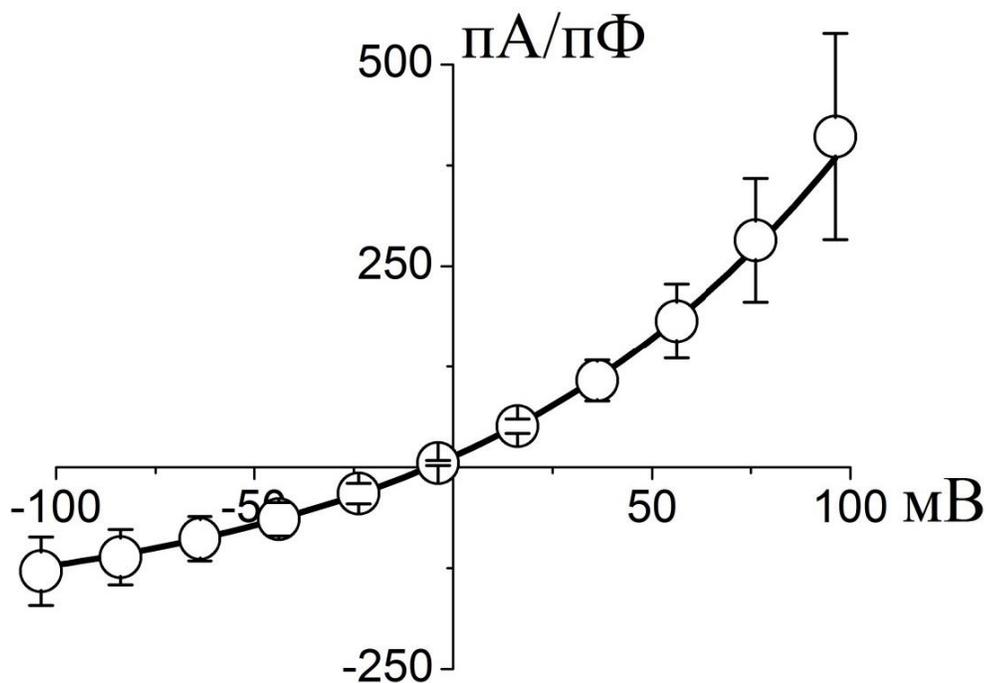
**Активация макроскопического тока *whole-cell* при набухании тимоцитов крыс.**

(А) Типичные записи *whole-cell* тока, активируемого в ответ на набухание клеток. Токи регистрировались в ответ на тестовые импульсы потенциала от 0 до  $\pm 25$  мВ (каждые 5 секунд). (Б) Ионный ток, записанный в стационарном состоянии в (А) (отмечено символом #). Потенциал фиксировался при 0 мВ; после предварительного импульса до  $-100$  мВ (500 мс), потенциал скачкообразно менялся от  $-100$  до  $+100$  мВ с интервалом 20 мВ (1 с) и затем фиксировался при  $-80$  мВ.

Мгновенные вольтамперные характеристики, измеренные сразу после ёмкостных отбросов, имели умеренное наружное выпрямление

(выходящий ток был больше входящего). Потенциалом реверсии был равен  $-4,2 \pm 1,6$  мВ (рис. 5.9), что близко к равновесному потенциалу Нернста для ионов хлора, который равен  $-2,8$  мВ в этих экспериментальных условиях. Стационарный макроскопический ток, измеренный при  $\pm 25$  мВ, значительно ингибировался блокаторами ОЗАК, такими, как флоретин (200 мкМ) и DCPiB (10 мкМ), как это показано на рис. 5.10.

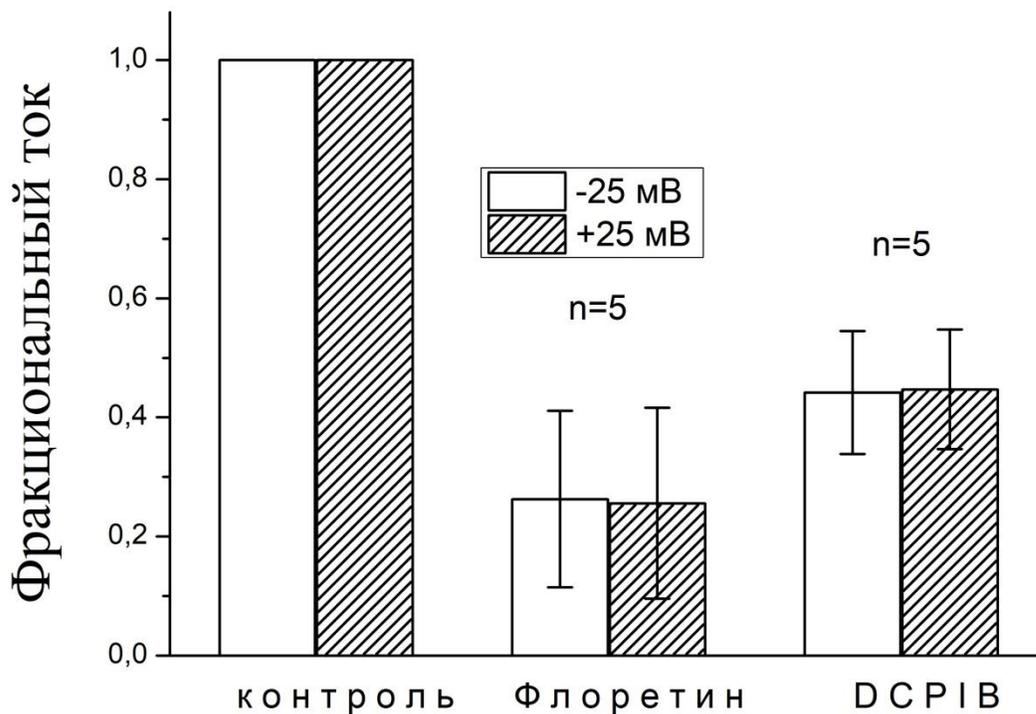
В следующей серии экспериментов, нашей задачей было определение сдвигов потенциала реверсии вольтамперных характеристик макроскопического тока при замене токопереносящих ионов. С этой целью мы сначала дожидались полной активации макроскопического тока при осмотическом набухании клеток, затем подавали треугольные импульсы (рампы) со скоростью развертки потенциала 1В/с и регистрировали токовые ответы на эти импульсы. Вольтамперные характеристики, полученные этим методом (рис. 5.11), имели умеренное наружное выпрямления и потенциал реверсии, близкий к полученным на мгновенных вольтамперных характеристиках. Когда клетка омывалась нормальным раствором Рингера, потенциал реверсии рамп-ответов составил  $-5,8 \pm 0,5$  мВ ( $n=5$ ). Когда мы эквимолярно заместили 135 мМ хлорида на анионы глутамата, потенциал реверсии сдвинулся в сторону положительных потенциалов на величину  $+25,4 \pm 5,9$  мВ ( $n=4$ ) (рис. 5.11). Направление сдвига указывает на анионную селективность макроскопической проводимости. Отношение проницаемости глутамата к хлориду, рассчитанное из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца (см. уравнение 2.6 в Главе II) было равно  $P_{\text{глутамат}}/P_{\text{Cl}} = 0,24 \pm 0,08$ . Эта величина близка к опубликованным ранее значениям проницаемости для канала ОЗАК (Okada et al., 2009; Akita and Okada, 2014).



**Рис. 5.9.**

**Вольтамперная характеристика макроскопического анионного тока, активированного на мембране тимоцитов при осмотическом набухании клеток.**

Ток был измерен после максимальной активации *whole-cell* тока на записях, аналогичных показанным на рис. 5.2: Б; пипеточный раствор содержал 125 мМ Cl<sup>-</sup>.



**Рис. 5.10.**

**Эффект блокаторов ОЗАК флоретина (200 мМ) и ДСРІВ (10 мМ), на *whole-cell* макроскопический ток, активированный на мембране тимоцитов при осмотическом набухании клеток.**

Белые и заштрихованные столбики соответствуют ионному току, измеренному при +25 мВ и -25 мВ, соответственно. Фракционный ток означает долю от контрольного значения макроскопического тока.

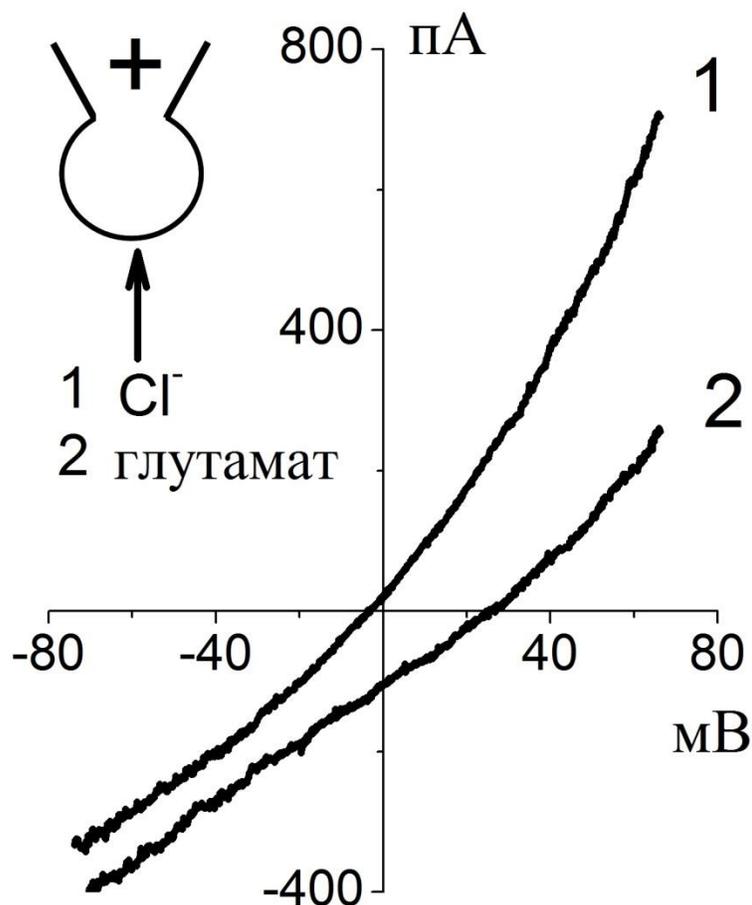


Рис. 5.11.

**Изменение потенциала реверсии макроскопического анионного тока, активированного на мембране тимоцитов при осмотическом набухании, после замены ионов хлора во внеклеточном растворе на глутамат.**

Whole-cell ток в ответ на рамповый импульс потенциала от  $-70$  до  $+70$  мВ до и после эквимольной замены внеклеточного  $\text{Cl}^-$  на глутамат. Пипеточный (внутриклеточный) раствор содержал  $125$  мМ  $\text{CsCl}$ ; внеклеточный раствор был либо нормальный Рингер (кривая 1) или раствор Рингера, в котором  $135$  мМ  $\text{NaCl}$ , был заменен на  $135$  мМ  $\text{Na}$ -глутамата (кривая 2).

Способен ли анион глутатиона проникать через мембрану осмотически набухших тимоцитов? Для ответа на этот вопрос мы провели серию экспериментов, в которой мы эквимоллярно заместили 135 мМ хлорида на анионы глутатиона  $\text{GSH}^-$ . При этом, потенциал реверсии сдвинулся со своего исходного значения, равного  $-4,7 \pm 0,5$  мВ ( $n=6$ ) в этой серии измерений, к значению, равному  $+20,7 \pm 2,5$  мВ ( $n=5$ ) (рис. 5.12). Также, как и в случае глутамата, направление сдвига указывает на анионную селективность макроскопической проводимости. Отношение проницаемости глутатиона к хлориду, рассчитанное из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца (уравнение 2.6 в Главе II) было равно  $P_{\text{GSH}} / P_{\text{Cl}} = 0,32 \pm 0,04$ . Таким образом, наши эксперименты свидетельствуют о том, глутатион проникает через ОЗАК примерно с той же эффективностью, что и глутамат. Однако, следует учитывать, что в этих экспериментах направление движения глутатиона было из внеклеточной среды внутрь клетки, что является обратным направлению потока глутатиона в экспериментах по его выбросу при гипоосмотическом стрессе. Поэтому, в следующей серии экспериментов мы определили проницаемость глутатиона при эквимоллярном замещении 100 мМ хлорида в пипеточном растворе на анионы глутатиона  $\text{GSH}^-$ . Такое замещение ионов привело к сдвигу потенциала реверсии со своего исходного значения, равного  $-5,1 \pm 1,8$  мВ ( $n=6$ ) в этой серии измерений, к значению, равному  $-34,8 \pm 1,1$  мВ ( $n=6$ ) (рис. 5.13). Следует отметить, что направление сдвига в этом случае было обратным тому, которое мы наблюдали при замене ионов снаружи клетки, что также хорошо согласуется с анионной селективностью макроскопической проводимости. Отношение проницаемости глутатиона к хлориду, рассчитанное из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца (уравнение 2.6 в Главе II) было равно  $P_{\text{GSH}} / P_{\text{Cl}} = 0,11 \pm 0,03$ . Эта величина несколько ниже той, которую мы определили для потока глутатиона внутрь клетки, что возможно является следствием наружного выпрямления канала ОЗАК (т.е., поток входящий поток анионов превалирует над выходящим потоком).

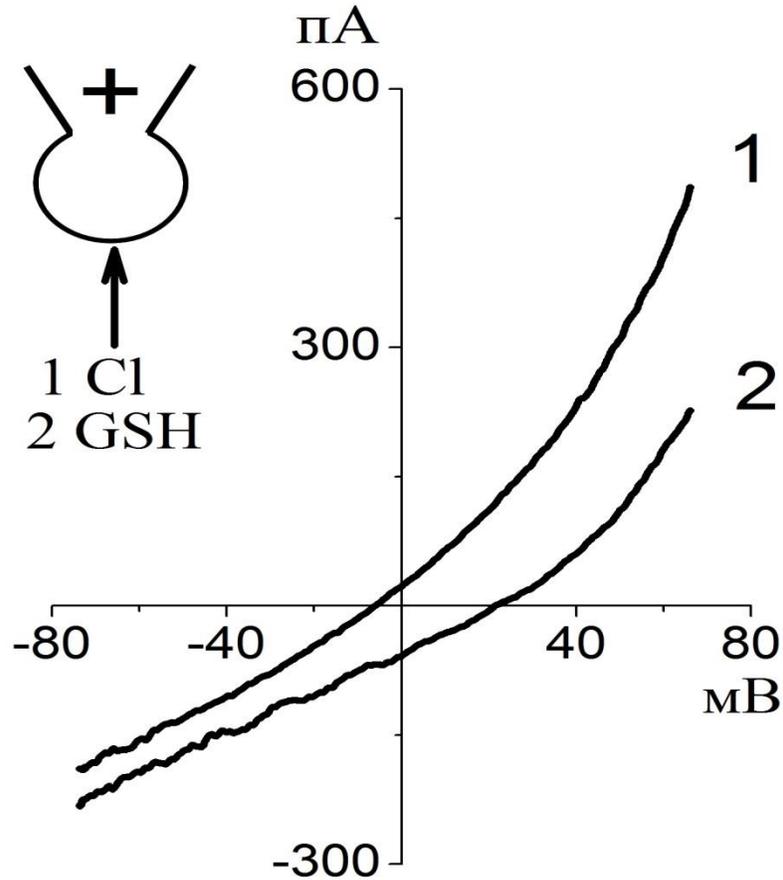


Рис. 5.12.

**Изменение потенциала реверсии макроскопического анионного тока, активированного на мембране тимоцитов при осмотическом набухании, после замены ионов хлора во внеклеточном растворе на глутатион.**

Whole-cell ток в ответ на рамповый импульс потенциала от  $-70$  до  $+70$  мВ до и после эквимольной замены внеклеточного  $\text{Cl}^-$  на глутатион. Пипеточный (внутриклеточный) раствор содержал 125 мМ CsCl; внеклеточный раствор был либо нормальный Рингера (кривая 1) или раствор Рингера, в котором 135 мМ NaCl, был заменен на 135 мМ Na-глутатиона (кривая 2).

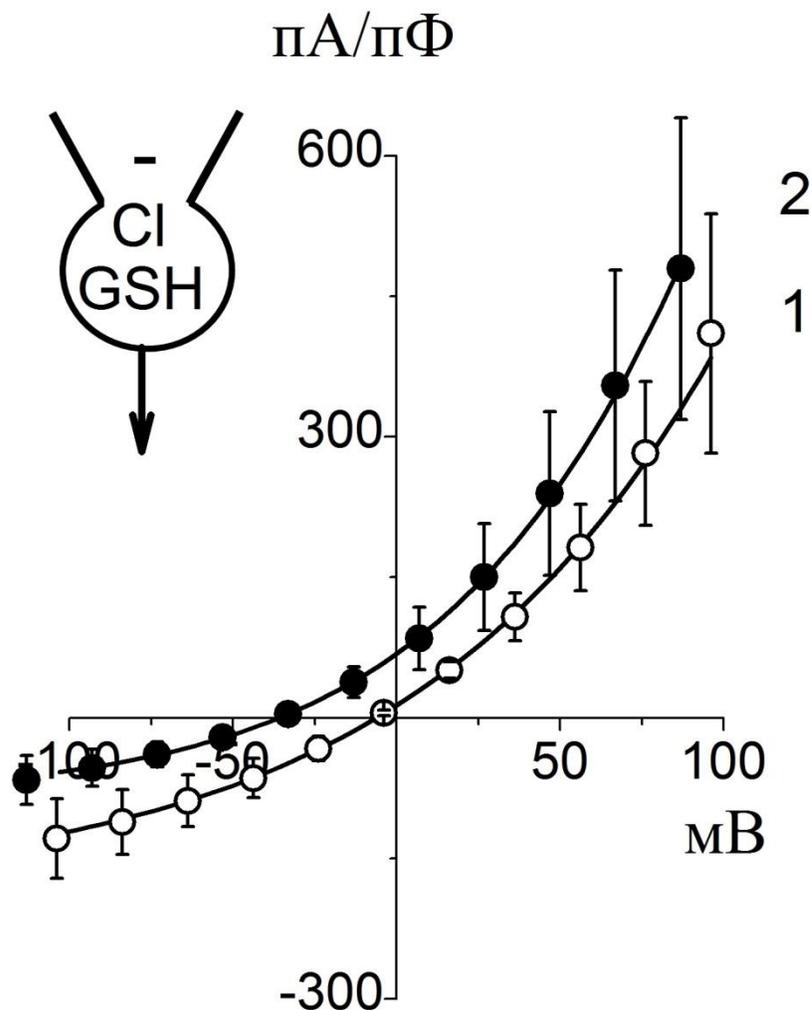


Рис. 5.13.

**Изменение потенциала реверсии макроскопического анионного тока, активированного на мембране тимоцитов при осмотическом набухании при замене ионов хлора во внутриклеточном растворе на глутатион.**

Внеклеточный раствор был нормальный Рингер. Пипеточный (внутриклеточный) раствор содержал 125 мМ CsCl (кривая 1) или раствор, в котором весь Cl<sup>-</sup> был заменен на GSH<sup>-</sup> (кривая 2).

Таким образом, наши экспериментальные данные однозначно свидетельствуют о том, что объем-зависимый анионный канал обладает значительной проницаемостью в отношении глутатиона и способен

обеспечивать физический путь для отрицательно заряженных молекул глутатиона при их движении изнутри клетки наружу в условиях гипоосмотического стресса.

#### §5.4. Обсуждение

Глутатион является основным антиоксидантом цитоплазмы клетки, который обеспечивает высокий уровень восстановительного потенциала во внутриклеточной среде. Внеклеточная среда также может содержать небольшое количество глутатиона, концентрация которого сильно варьирует в зависимости от физиологического состояния и типа клеток. Однако, не следует полагать, что внеклеточный глутатион является минорным компонентом интерстициального пространства. Дело заключается в том, что синтез глутатиона происходит внутри клетки, однако его деградация – исключительно во внеклеточном пространстве при посредничестве экто-фермента (т.е. фермента, связанного с наружной стороной плазматической мембраны) гамма-глутамил транспептидазы (Meister and Anderson, 1983). Этот процесс является важной составной частью гамма-глутамильного цикла, посредством которого некоторые аминокислоты транспортируются в клетки. Поэтому, транспорт глутатиона во внеклеточное пространство происходит постоянно и является неотъемлемым свойством большинства клеток как в желудочно-кишечном тракте, так и в иммунной системе. Разумеется, учитывая важность процесса переноса глутатиона во внеклеточную среду, природа не может ограничиваться лишь одной транспортной системой. Поэтому, даже в одном типе клеток (тимоциты) и для одного стимула (гипоосмотический стресс) вовлечены как анионные транспортеры так и электрогенный транспортный путь через ионные каналы (Меланова с соавт., 2011).

Наши эксперименты, проведенные методом пэтч-кламп, прямо показали, что объем-зависимый анионный канал действительно способен пропускать анион глутатиона, что обеспечивает биофизическую базу для этого процесса. Фармакологические эксперименты, проведенные в нашей лаборатории Мелановой Н.Р. показали, что канал ОЗАК может

обеспечивать до 60% от всего выброса глутатиона, а остальная часть может выходить из клеток через транспортеры, такие как SLCO/OATP и SLCO/OATP, как это также было показано для линии Т-лимфоцитов Jurkat (Franco and Cidlowski, 2006; Franco and Cidlowski, 2009). Транспортная АТФаза ABCС/MRP, по-видимому, не принимает участия в выбросе глутатиона из клеток при наших экспериментальных условиях, хотя она и является основным путем для транспорта глутатиона в печени (Ballatori et al., 2009). Роль внеклеточного глутатиона в иммунном ответе организма остается не изученной и явится предметом наших дальнейших исследований.

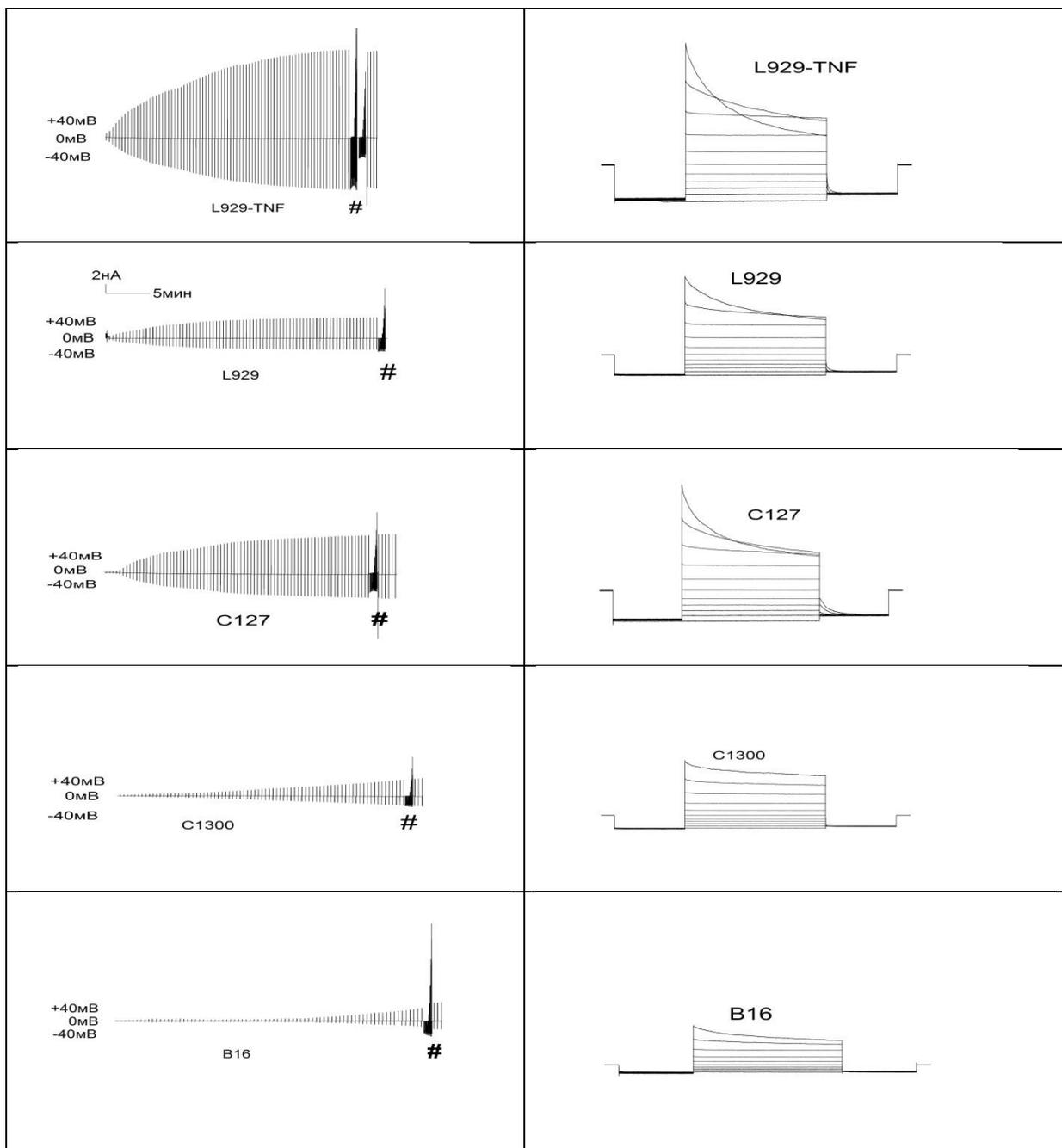
## ГЛАВА VI. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОЗАК В МУТАНТНЫХ КЛЕТКАХ L929 ФИБРОСАРКОМЫ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РАНДОМНОГО МУТАГЕНЕЗА

Объем-зависимый анионный канал промежуточной проводимости и наружного выпрямления занимает центральное место в регуляции клеточного объема при гипоосмотическом стрессе (Okada et al., 2004; Okada et al., 2009; Pedersen et al., 2016), а его подавление приводит к полному исчезновению фазы восстановления объема клетки после ее набухания. Несмотря на исключительную физиологическую важность ОЗАК, его молекулярная основа до настоящего времени остаётся спорной. Недавние исследования по уменьшению экспрессии генов группы белков, содержащих повторы, богатые лейцином LRRC8 (Leucine Rich Repeat Containing 8) и оверэкспрессии клонированных представителей этой группы показали, что эти белки могут быть компонентами ОЗАК (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). Реконструкция рекомбинантных белков семейства LRRC8 в искусственные бислойные мембраны, сформированные методом наносфер, позволило воспроизвести такие свойства ОЗАК, как чувствительность к набуханию и ионной силе (Syeda et al., 2016), что позволяет с большой долей уверенности говорить о том, что белки семейства LRRC8 действительно являются важной составной частью ОЗАК (Jentsch et al., 2016). Однако, оверэкспрессия LRRC8 приводит не к увеличению тока ОЗАК, а к его подавлению. Кроме того, реконструированный канал был активен даже в отсутствии АТФ, тогда как нативному ОЗАК требуется АТФ для его функционирования. Эти противоречия свидетельствуют о том, нативный ОЗАК является сложным белковым комплексом, в состав которого входят и другие белковые компоненты. Поэтому, в данной работе мы предприняли попытку получить клоны клеток с подавленной активностью ОЗАК с помощью методов рандомного мутагенеза.

В начале исследования мы оценили активность ОЗАК в пяти различных культурах клеток (L929, L929-TNF, C127, C1300 и B16) (рис. 6.1), и установили, что максимальной активностью ОЗАК обладают

клетки L929-TNF (Рис. 6.2), которые представляют собой клетки фибросаркомы с повышенной чувствительностью к фактору некроза опухолей TNF (Tumor Necrosis Factor). Следует отметить, что во всех линиях клеток мыши, исследованных в нашей работе, фенотип канала ОЗАК был близок к описанному в литературе, а именно, макроскопический ток имел выраженное наружное выпрямление (рис. 6.3) и потенциал-зависимую инактивацию при больших положительных потенциалах (см. правый ряд на рис. 6.1).

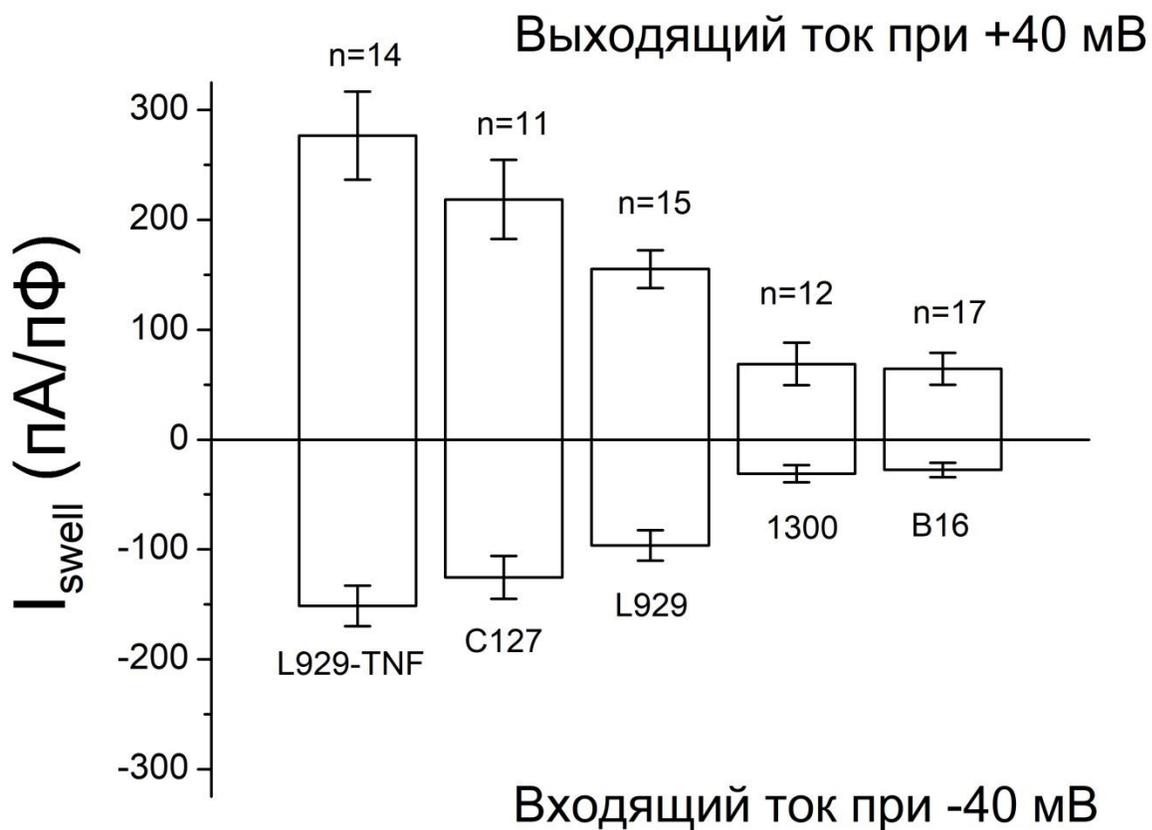
В нашей следующей серии экспериментов, мы оценили применимость методов рандомного мутагенеза с использованием специальным образом сконструированных ретровирусов, которые способны инактивировать гены в соотношении «один ген - одна клетка» (Ono et al., 2004), Совместно с др-ром К. Оно (Киотский Университет) были получены мутанты клеток L929-TNF (общее число 259), которые были подвергнуты первичному скринингу методом поглощения анионного красителя и по выбросу АТФ. В результате было идентифицировано двенадцать клонов, в которых было минимальное поглощение красителя и, следовательно, ожидалась минимальная активность ОЗАК. Все клоны были подвергнуты исследованию методом пэтч-кламп. Активность ОЗАК была количественно оценена по плотности тока после максимальной активации при +40 мВ. Активность ОЗАК варьировала от  $365 \pm 49$  пА/пФ для клона В180 до  $72 \pm 13$  пА/пФ для клона В32 (рис. 6.4). В клоне с минимальной активностью ОЗАК (В32), активация канала была несколько медленнее (рис. 6.5), однако макроскопический ток, хотя и меньший по амплитуде, сохранял характерное наружное выпрямление (рис. 6.6).



**Рис. 6.1.**

**Активность ОЗАК в пяти различных культурах клеток (L929, L929-TNF, C127, C1300 и B16).**

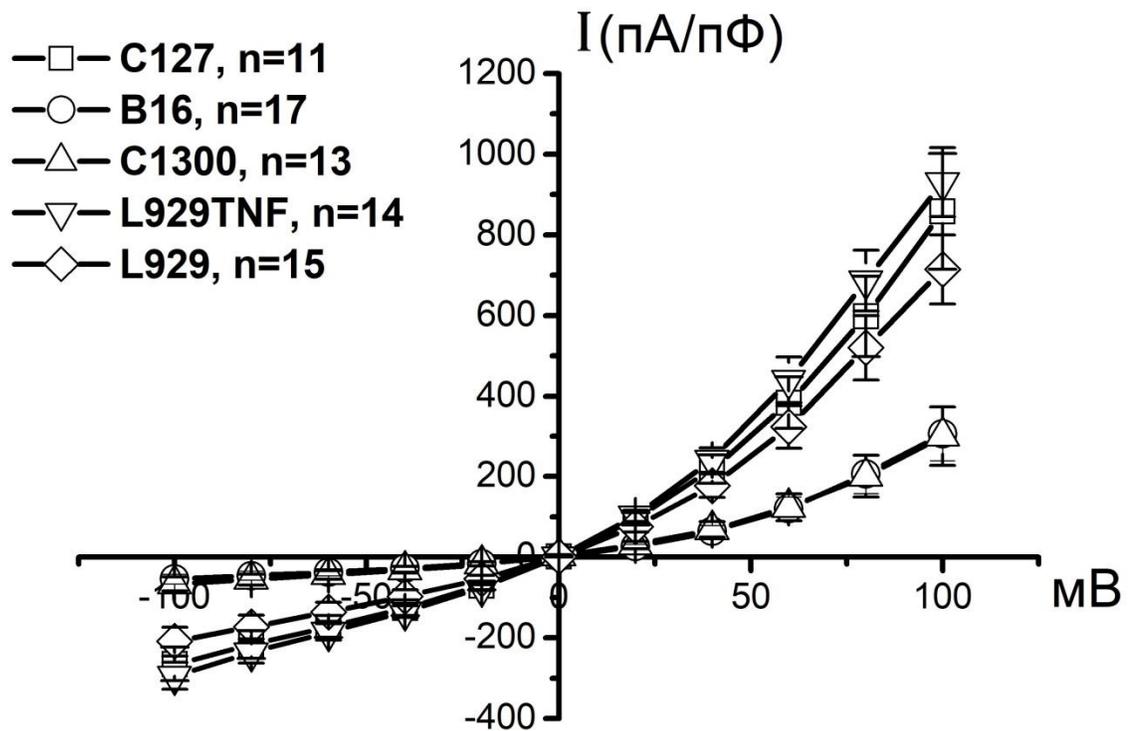
Слева – примеры записи активации ОЗАК при подаче тестовых импульсов  $\pm 40$  мВ. Справа – токовые ответы на импульсы от  $-100$  мВ до  $+100$  мВ с инкрементом 20 мВ; записи справа получены в моменты времени, обозначенные символом # на записях слева. (Данные на рисунках 6.1–6.6 приводятся по: Курбанназарова с соавт., 2017а).



**Рис. 6.2.**

**Активность ОЗАК в пяти различных культурах клеток L929, L929-TNF, C127, C1300 и B16.**

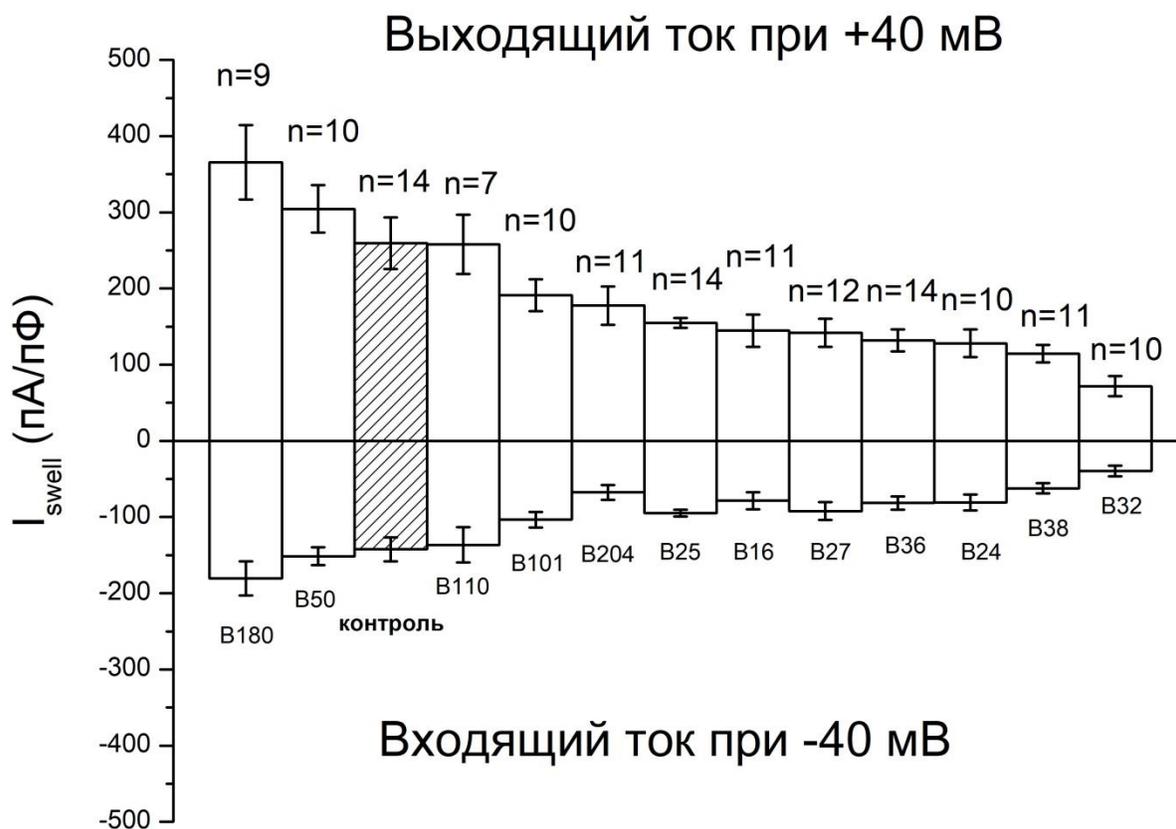
Показана плотность тока, измеренного после максимальной активации макроскопического тока при потенциале +40 мВ и -40 мВ.



**Рис. 6.3.**

**Активность ОЗАК в пяти различных культурах клеток L929, L929-TNF, C127, C1300 и B16.**

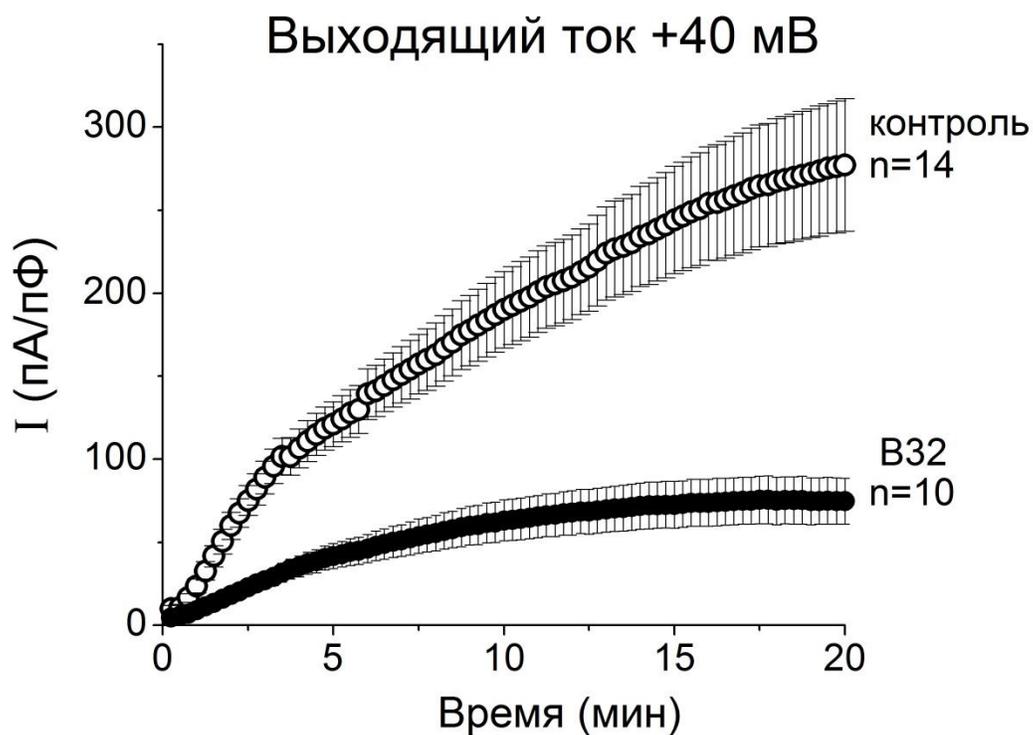
Вольтамперные характеристики макроскопического тока после его максимальной активации в условиях осмотического набухания клеток.



**Рис. 6.4.**

**Активность ОЗАК в контрольных клетках L929-TNF и в мутантных клонах, полученных путем случайного мутагенеза.**

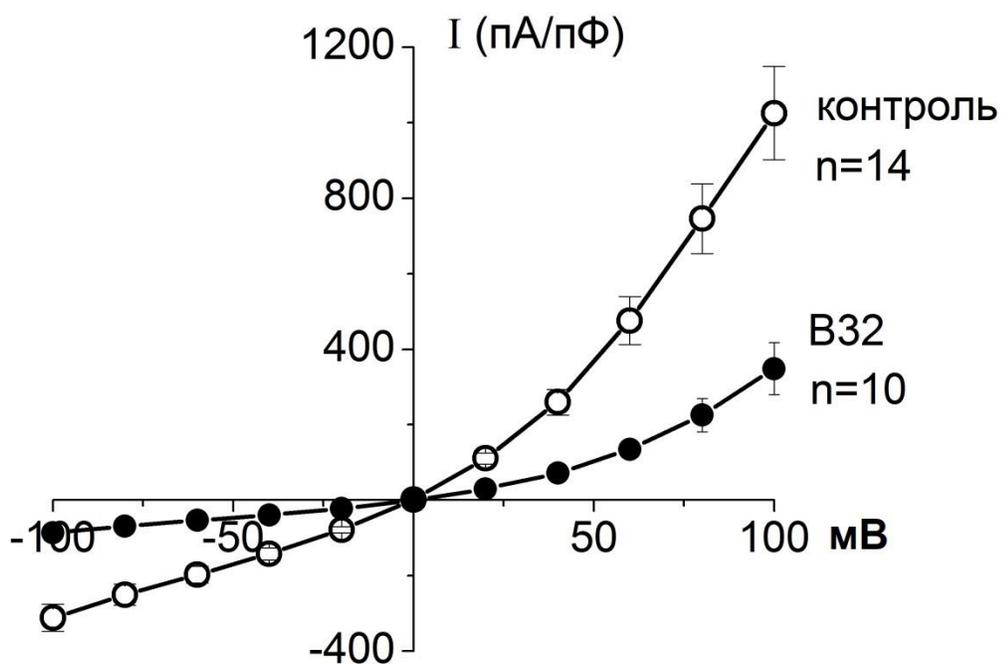
Плотность тока, измеренного после максимальной активации макроскопического тока при потенциале +40 мВ и -40 мВ для различных клонов клеток L929-TNF (контроль), полученных путем случайного мутагенеза.



**Рис. 6.5.**

**Активность ОЗАК в контрольных клетках L929-TNF и в мутантных  
клонах, полученных путем случайного мутагенеза.**

Кинетика активации макроскопического тока ОЗАК в контрольных клетках и в клетках клона В32.



**Рис. 6.6.**

**Активность ОЗАК в контрольных клетках L929-TNF и в мутантных клонах, полученных путем случайного мутагенеза.**

Вольтамперные характеристики макроскопического тока после его максимальной активации в контрольных клетках и в клетках клона B32.

Все клоны были в дальнейшем подвергнуты анализу методом RACE (Rapid amplification of cDNA ends, быстрая амплификация концов кДНК) для идентификации инактивированных генов (выполнено совместно с доктором Тошиаки Окада из Национального Института физиологии, Япония). Было идентифицировано 12 генов, среди которых было найдено 8 мембранных белков, часть которых является транспортерами или их регулируемыми компонентами. В настоящее время в Национальном Институте Физиологии (г. Окадзаки, Япония) проводятся исследования по подавлению экспрессии этих генов с целью выяснения их роли в функции ОЗАК.

Таким образом, наши эксперименты свидетельствуют о том, что метод рандомного мутагенеза с использованием векторов на основе ретровирусов является высокоперспективным подходом для идентификации молекулярных компонентов белкового комплекса объем-зависимого анионного канала ОЗАК, а также его возможных физиологических регуляторов.

## ГЛАВА VII. МОДУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ

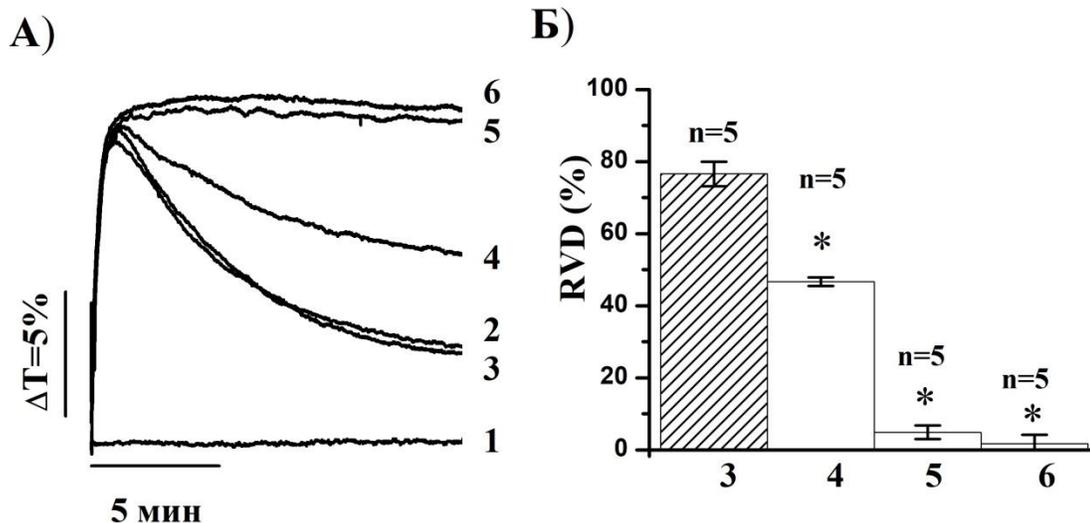
Как мы уже упоминали выше, система регуляции клеточного объёма и объем-зависимые ионные каналы играют ключевую роль не только в поддержании объёма клеток в пределах границ, необходимых для оптимальной жизнедеятельности, но и принимают участие также в таких биологически важных процессах, как клеточная пролиферация и программируемая смерть клеток – апоптоз. Кроме того, нарушение нормального функционирования системы регуляции объёма может быть причиной некротической смерти клеток. Поэтому, как сама система регуляции объёма клетки, так и её транспортные компоненты – объем-зависимые ионные каналы могут явиться перспективными мишенями для разработки биологически-активных средств нового типа – модуляторов системы регуляции клеточного объёма. В данном разделе диссертационной работы мы использовали оптическую регистрацию изменений клеточного объёма тимоцитов как удобную тест-систему и исследовали влияние растительных экстрактов на регуляторное уменьшение клеточного объёма лимфоцитов тимуса. В наших экспериментах мы использовали общий экстракт флавоноидов из трёх растений: куркумы (*Curcuma longa*), солодки (*Glycyrrhiza glabra*) и повилики тонкостебельной (*Cuscuta approximate babingt*).

Флавоноиды представляют собой обширную группу (свыше 6500) полифенольных соединений С6–С3–С6-ряда. Они по своей распространённости занимают одно из первых мест и присутствуют во всех видах растений (Crozier et al., 2009). Флавоноиды широко распространены в еде и напитках растительного происхождения, их много в цедре цитрусовых, луке, зелёном чае, красных винах, пиве тёмных сортов, облепихе и чёрном шоколаде. Из флавонов и флавонолов чаще всего в пищевых продуктах встречается кверцетин. Распространены также кемпферол, мирицетин, апигенин и лютеолин. Многие флавоноиды – пигменты, придающие разнообразную окраску растительным тканям.

Например, антоцианы определяют красную, синюю, фиолетовую окраску цветов, а флавоны, флавонолы, ауруны и халконы — жёлтую и оранжевую. Флавоноиды крайне малотоксичны и проявляют широкий спектр биологической активности, включая иммуномодулирующую (Peluso et al., 2015). Поэтому мы предположили, что, возможно, они будут проявлять активность в отношении системы регуляции клеточного объема лимфоцитов тимуса.

В наших экспериментах, общий экстракт флавоноидов получали по общепринятой методике путём экстракции 80%-м этанолом (см. §2.8). Концентрацию флавоноидов (в кверцетиновом эквиваленте) определяли по методу, адаптированному из работ (Zhishen et al., 1999; Marinova et al., 2005; Samatha et al., 2012). По результатам этих определений, экстракт куркумы содержал  $4,32 \pm 3,4$  мг/мл ( $n=6$ ), экстракт солодки —  $1,55 \pm 0,08$  мг/мл ( $n=5$ ), а экстракт повилики —  $1,27 \pm 0,02$  мг/мл ( $n=5$ ) общих флавоноидов в кверцетиновом эквиваленте.

Как и в предыдущих экспериментах, в изотонической среде (нормальный раствор Рингера) объем тимоцитов оставался на постоянном уровне в течение 20 мин. При попадании в гипоосмотическую среду тимоциты сначала быстро набухали и затем в течение 20-30 мин восстанавливали свой объем до уровня, близкого к исходному (рис. 7.1: запись 2). Растворитель (80%-я водно-спиртовая смесь), добавленная в максимально использованной дозе (10 мкл/мл) не оказывал заметного влияния на динамику восстановления клеточного объема в этих экспериментальных условиях (рис. 7.1: запись 3). При 15-минутной инкубации клеток в гипоосмотической среде регуляторное уменьшение объема (RVD) в среднем было равно  $76,6 \pm 3,4\%$  ( $n=6$ ). Добавление в гипотонический раствор экстракта общих флавоноидов куркумы уже в дозе 4,3 мкг/мл значительно подавляло способность тимоцитов восстанавливать собственный объем после набухания в гипоосмотической среде. В дозе выше 20 мкг/мл наблюдалось полное подавление фазы восстановления объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.



- 1) изотонический р-р. 2) гипотонический р-р.  
 3) 0 мкг/мл (чистый растворитель)  
 4) 4,3 мкг/мл      5) 21,6 мкг/мл      6) 43,1 мкг/мл

**Рис. 7.1.**

**Влияние экстракта общих флавоноидов куркумы на регуляцию объёма тимоцитов в гипоосмотической стрессе.**

А) Оригиналы записи регистрации изменения светопропускания клеточной суспензии; Б) По ординате – регуляция клеточного объёма в %, рассчитанная по формуле 3.1; по абсциссе – концентрация флавоноида как указано в пояснении к рисунку; n- число повторов. Звездочки (\*) – статистически значимое отличие от контроля при  $P < 0,05$ .

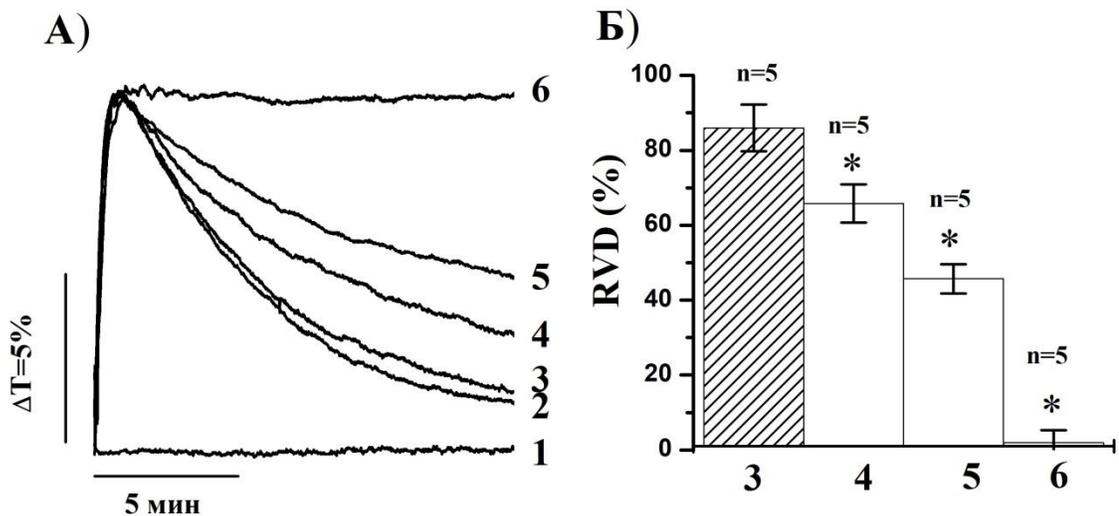
Примеры записей регистрации изменения клеточного объёма в присутствии тестируемых концентраций экстракта показаны на рис. 7.1: А. Усреднённые значения параметра RVD в контроле и при различном содержании в среде экстракта куркумы представлены на рис. 7.1: Б.

Качественно аналогичный результат был получен нами при исследовании экстракта общих флавоноидов из солодки. Этот экстракт, однако, оказался несколько более активным по сравнению с куркумой и проявлял ингибиторную активность уже при его содержании в среде 1,9 мкг/мл (рис. 7.2: А и Б). Добавление экстракта в среду в дозе 19,4 мкг/мл полностью ликвидировало фазу восстановления клеточного объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе (рис. 7.2).

Экстракт повилики вёл себя аналогичным образом и начинал понижать способность тимоцитов регулировать свой объем уже при 1,6 мкг/мл, а его доза, равная 15,9 мкг/мл полностью блокировала систему регуляции объема тимоцитов, помещенных в гипоосмотический раствор (рис. 7.3: А и Б).

Для количественного сравнения способности экстрактов подавлять систему регуляции объема, мы построили кривые доза-зависимости для исследованных экстрактов и аппроксимировали их уравнением Хилла (рис. 7.4). В результате по своей удельной активности, экстракты расположились в следующий ряд: повилика ( $C_{50}=3,16\pm 0,59$  мкМ) > куркума ( $C_{50}=5,17\pm 0,07$  мкМ) > солодка ( $C_{50}=6,46\pm 2,87$ ). Коэффициент Хилла при этом составил от 1,4 до 2,25 (рис. 7.4), что может свидетельствовать о том, что более одной молекулы активного вещества необходимо для блокирования одной из ключевых систем в механизме регуляции клеточного объема тимоцитов.

Таким образом, наши исследования показали, что флавоноидные экстракты трёх изученных растений – куркумы, солодки и повилики обладают относительно высокой активностью в отношении системы регуляции клеточного объема лимфоцитов тимуса и подавляют фазу восстановления уже при дозе порядка 1,6-4,3 мкг/мл.

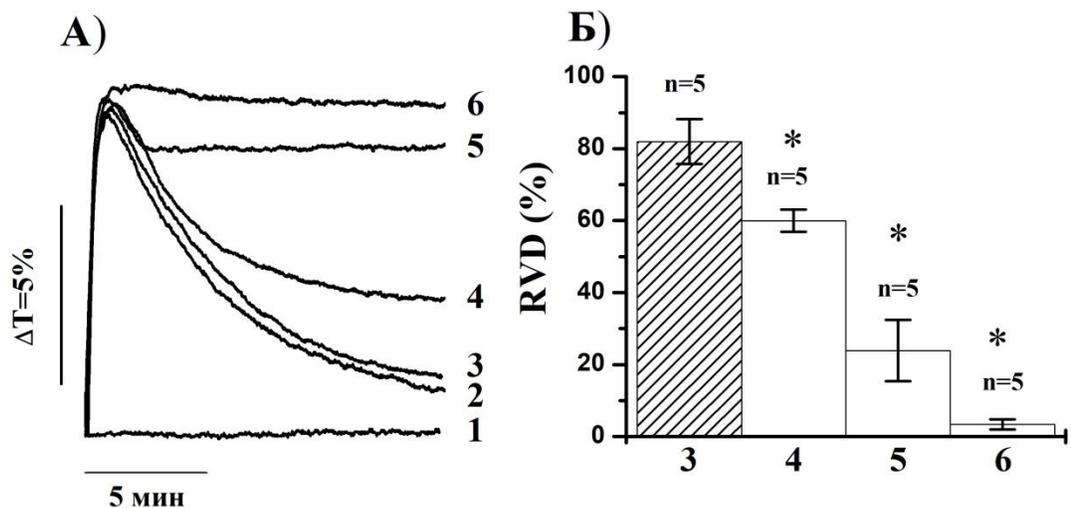


- 1) изотонический р-р      2) гипотонический р-р  
 3) 0 мкг/мл (чистый растворитель)  
 4) 1,94 мкг/мл      5) 9,7 мкг/мл      6) 19,4 мкг/мл

**Рис. 7.2.**

**Влияние экстракта общих флавоноидов солодки на регуляцию объёма тимоцитов в гипоосмотической стрессе.**

А) Оригиналы записи регистрации изменения светопропускания клеточной суспензии; Б) По ординате – регуляция клеточного объёма в %, рассчитанная по формуле 3.1; по абсциссе – концентрация флавоноида как указано в пояснении к рисунку; n- число повторов. Звездочки (\*) – статистически значимое отличие от контроля при  $P < 0,05$ .



- 1) изотонический р-р      3) гипотонический р-р  
 2) 0 мкг/мл (чистый растворитель)  
 4) 1,6 мкг/мл      5) 8,0 мкг/мл      6) 15,9 мкг/мл

**Рис. 7.3.**

**Влияние экстракта общих флавоноидов повилики (зарпечак) на регуляцию объёма тимоцитов в гипоосмотической стрессе.**

А) Оригиналы записи регистрации изменения светопропускания клеточной суспензии; Б) По ординате – регуляция клеточного объёма в %, рассчитанная по формуле 3.1; по абсциссе – концентрация флавоноида как указано в пояснении к рисунку; n- число повторов. Звездочки (\*) – статистически значимое отличие от контроля при  $P < 0,05$ .

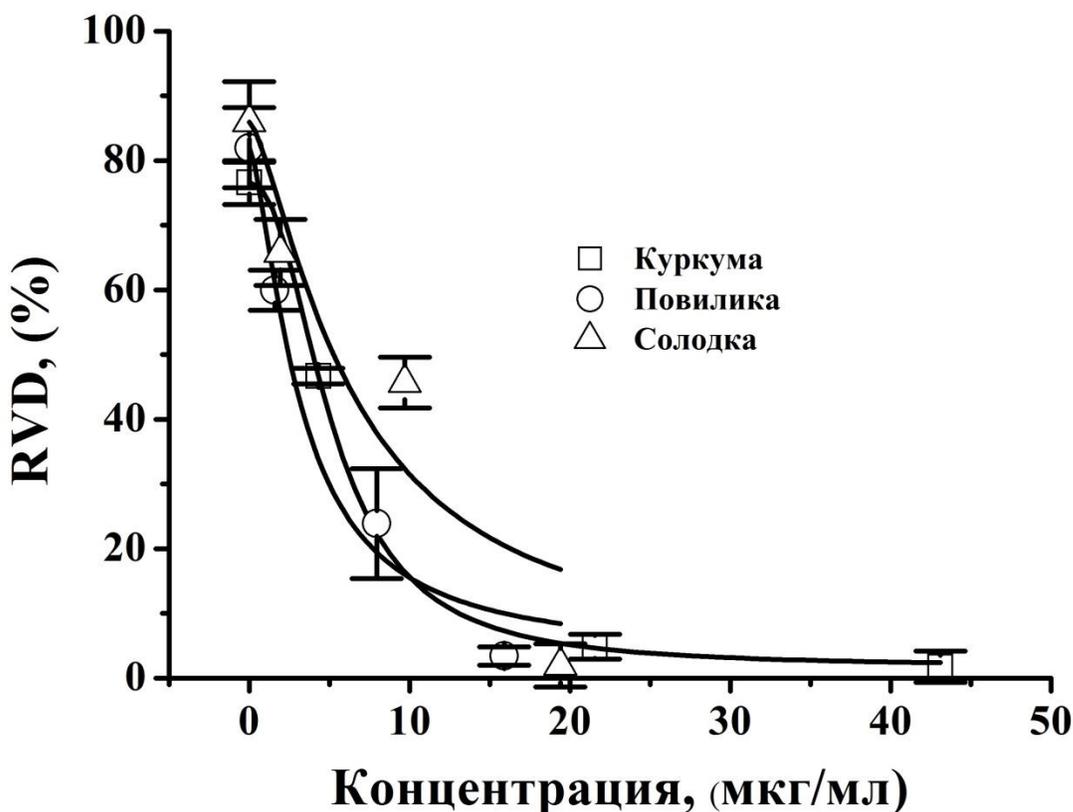


Рис. 7.4.

**Кривые доза-зависимости влияния экстрактов общих флавоноидов куркумы, повилики и солодки на регуляцию объёма тимоцитов в гипоосмотической стрессе.**

Сплошные линии – аппроксимация уравнением Хилла (2.7: см. Материалы методы) со следующими параметрами: куркума –  $C_{50}=5,17\pm 0,07$  мкМ,  $h=2,25\pm 0,10$ ; повилика –  $C_{50}=3,16\pm 0,59$ ,  $h=1,48\pm 0,31$ ; солодка –  $C_{50}=6,46\pm 2,87$ ,  $h=1,4\pm 0,78$ .

Как было показано в Главе 3, система регуляции объёма тимоцитов при гипоосмотическом стрессе включает в себя три основных компонента: это вход ионов  $Ca^{2+}$  внутрь набухшей клетки, активация  $Ca^{2+}$ -зависимых калиевых каналов и параллельная активация объем-зависимого анионного канала, что приводит к нетто-переносу ионов калия и хлора и эквивалентного количества воды из клетки во внеклеточную среду и восстановлению клеточного объёма. В настоящее время мы не можем

указать, на какую именно систему воздействуют изученные экстракты. Так как экстракты являются многокомпонентными смесями биологически-активных веществ, в основном флавоноидов, то предстоит выяснить, какие именно флавоноиды или подобные им умеренно гидрофобные вещества являются ингибиторами системы регуляции клеточного объема тимоцитов. В перспективе мы надеемся обнаружить среди этих веществ эффективные модуляторы объем-зависимого анионного канала (ОЗАК), для которого в настоящее время отсутствуют селективные агонисты и антагонисты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Слово тимус происходит от греческого θυμός (thumos), которое означает «душа», и древние целители верили, что именно в этом органе располагается душа человека. Примерно до начала 60-х годов 20-го века роль этого органа в иммунной системе оставалось практически неизвестной. В настоящее время стало очевидным, что тимус поистине является «душой» иммунитета человека, так как именно в нем происходит созревание Т-лимфоцитов в процессе положительного и отрицательного отбора, о котором шла речь в Главе I.

Хорошо известно, что внутренняя среда тимуса поддерживается в условиях гомеостаза, то есть незрелые тимические лимфоциты вряд ли испытывают глобальные осмотические пертурбации, которым могут подвергаться зрелые периферические Т-лимфоциты при прохождении по капиллярам, расположенным в непосредственной близости от легочного эпителия, или эпителия желудочно-кишечного тракта и почечных канальцев. Однако, в наших экспериментах мы подтвердили известное из литературы наблюдение, что тимоциты, помещенные в гипоосмотическую среду, сначала набухают, следуя осмотическому закону Вант-Гоффа, а затем в течение 10-20 минут способны восстанавливать свой объем до значений, близких к исходным величинам. Это означает, что даже незрелые лимфоциты, которые находятся в преимущественно изоосмотическом окружении внутритимической среды, уже обладают вполне функциональной системой регуляции клеточного объема. На первый взгляд наличие мощной системы регуляции объема в условиях осмотического гомеостаза может показаться излишним и противоречащим принципу биологической целесообразности, однако, учитывая результаты недавних исследований, в которых установлена принципиальная роль объем-зависимого анионного транспорта в таких физиологически важных процессах, как клеточная пролиферация и программируемая смерть клеток, становится понятным, что тимоциты, которые быстро размножаются внутри тимуса, но большая часть которых погибает путем апоптоза в процессах положительной и отрицательной селекции,

нуждаются в хорошо функционирующей системе регуляции клеточного объема.

В ходе наших исследований, в результате фармакологического анализа процесса регуляторного уменьшения объема в ответ на осмотическую стимуляцию, мы впервые предположили, что ведущим звеном в системе регуляции объема тимоцитов являются калиевые и хлорные каналы (Глава III). Этот вывод противоречил имеющимся в литературе данным, согласно которым не ионные каналы, а система сопряженного транспорта ионов калия и хлора является тем транспортным путем, который обеспечивает нетто-перенос калия и хлора из цитозоля во внеклеточную среду с облигаторным выходом молекул воды и сжиманием тимоцитов. Для радикального решения этого вопроса мы провели серию экспериментов с помощью метода микролокального отведения ионных токов – пэтч-кламп, и впервые прямо показали присутствие на плазматической мембране двух типов объем-активируемых анионных каналов: макси-анионного канала и объем-зависимого анионного канала (ОЗАК), имеющего наружное выпрямление и промежуточную проводимость (Глава IV). Мы также впервые показали, что ОЗАК обеспечивает не только поток анионов наружу в процессе регуляторного уменьшения объема, но также обеспечивает высокоэффективный транспортный путь для выброса из тимоцитов важной сигнальной молекулы – отрицательно заряженного трипептида – глутатиона (Глава V).

В недавней работе макси-анионный канал был идентифицирован как белок SLCO2A1 (Sabirov et al., 2017). Интересно, что этот белок известен как простагландиновый транспортер, что позволяет предположить, что один и тот же белок может функционировать и как ионный канал, и как транспортер в зависимости от физиологического состояния клетки (Minor, 2017).

Вопрос о молекулярной природе канала ОЗАК является в настоящее время одним из наиболее горячо дискутируемых вопросов в современной физиологии и биофизике. Трудность проблемы заключается в том, что этот канал присутствует практически во всех доступных в лаборатории

клеточных линиях. Мы сравнили различные линии культур клеток и в клетках с максимальной активностью провели процедуру рандомного мутагенеза (совместно с др. К. Оно из Киотского университета) и выявили ряд клонов с резко пониженной активностью ОЗАК (Глава VI). Мы надеемся, что эти клоны послужат основой для выявления генов, которые кодируют белки, являющиеся либо физиологическими регуляторами ОЗАК, либо принимающие участие в формировании собственно поры ионного канала ОЗАК. Масштабные работы по идентификации этих генов ведутся в настоящее время в Национальном Институте физиологии (г. Окадзаки, Япония).

Таким образом, в результате наших исследований мы установили, что незрелые лимфоциты тимуса обладают полностью функциональной системой регуляции клеточного объема, экспрессируют объем-зависимый анионный канал ОЗАК с фармакологическим и биофизическим профилем, близким к таковому в эпителиальных, эндотелиальных и некоторых раковых клетках и могут найти широкое применение при поиске новых перспективных лекарственных средств с иммуномодулирующими и противораковыми свойствами. Результаты наших экспериментов показали, что высокоэффективные ингибиторы ОЗАК могут быть найдены среди флавоноидов таких известных лекарственных растений, как куркума, солодка и повилика.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Ackerman, M.J., Krapivinsky, G.B., Gordon, E., Krapivinsky, L., and Clapham, D.C. (1994a). Characterization of a native swelling-induced chloride current, ICl.swell, and its regulatory protein, pICln, in *Xenopus* oocytes. *Jpn.J.Physiol* 44 Suppl 2, S17-S24.
- Ackerman, M.J., Wickman, K.D., and Clapham, D.E. (1994b). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J.Gen.Physiol* 103(2), 153-179.
- Agalakova, N.I., Lapin, A.V., and Gusev, G.P. (1997). Temperature effects on ion transport across the erythrocyte membrane of the frog *Rana temporaria*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 117(3), 411-418. doi: 10.1016/s0300-9629(96)00367-2.
- Akita, T., and Okada, Y. (2014). Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience* 275, 211-231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.015.
- al Rohil, N., and Jennings, M.L. (1989). Volume-dependent K<sup>+</sup> transport in rabbit red blood cells comparison with oxygenated human SS cells. *Am.J.Physiol* 257(1 Pt 1), C114-C121.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell (4th ed.)*. New York: Garland Science.
- Armsby, C.C., Brugnara, C., and Alper, S.L. (1995). Cation transport in mouse erythrocytes: role of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in regulatory volume decrease. *Am.J.Physiol* 268(4 Pt 1), C894-C902.
- Arrazola, A., Rota, R., Hannaert, P., Soler, A., and Garay, R.P. (1993). Cell volume regulation in rat thymocytes. *J Physiol* 465, 403-414.
- Bajnath, R.B., Groot, J.A., De Jonge, H.R., Kansen, M., and Bijman, J. (1993). Calcium ionophore plus excision induce a large conductance chloride channel in membrane patches of human colon carcinoma cells HT-29cl.19A. *Experientia* 49(4), 313-316.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression

- of human diseases. *Biol Chem* 390(3), 191-214. doi: 10.1515/BC.2009.033.
- Banderali, U., and Roy, G. (1992). Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am.J.Physiol* 263(6 Pt 1), C1200-C1207.
- Bize, I., and Dunham, P.B. (1994). Staurosporine, a protein kinase inhibitor, activates K-Cl cotransport in LK sheep erythrocytes. *Am.J.Physiol* 266(3 Pt 1), C759-C770.
- Blanz, J., Schweizer, M., Auberson, M., Maier, H., Muenscher, A., Hubner, C.A., et al. (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *J.Neurosci.* 27(24), 6581-6589.
- Boese, S.H., Kinne, R.K., and Wehner, F. (1996). Single-channel properties of swelling-activated anion conductance in rat inner medullary collecting duct cells. *Am.J.Physiol* 271(6 Pt 2), F1224-F1233.
- Bond, T.D., Ambikapathy, S., Mohammad, S., and Valverde, M.A. (1998). Osmosensitive Cl<sup>-</sup> currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J.Physiol* 511 ( Pt 1), 45-54.
- Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A. (2011). Life and death of lymphocytes: a volume regulation affair. *Cell Physiol Biochem* 28(6), 1079-1088. doi: 10.1159/000335864.
- Bosl, M.R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., et al. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* 20(6), 1289-1299.
- Bosma, M.M. (1989). Anion channels with multiple conductance levels in a mouse B lymphocyte cell line. *J.Physiol* 410, 67-90.
- Bourne, P.K., and Cossins, A.R. (1984). Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. *J.Physiol* 347, 361-375.
- Cahalan, M.D. (2001). Cell biology. Channels as enzymes. *Nature* 411(6837), 542-543.
- Cahalan, M.D., and Lewis, R.S. (1988). "Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes," in *Cell physiology of*

- blood*, eds. R.B. Gunn & J.C. Parker. (New York: Rockefeller Univ. Press), 281-301.
- Cala, P.M., Maldonado, H., and Anderson, S.E. (1992). Cell volume and pH regulation by the *Amphiuma* red blood cell: a model for hypoxia-induced cell injury. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 102(4), 603-608. doi: 10.1016/0300-9629(92)90711-x.
- Chen, J.H., Schulman, H., and Gardner, P. (1989). A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis. *Science* 243(4891), 657-660.
- Cheung, R.K., Grinstein, S., and Gelfand, E.W. (1982). Volume regulation by human lymphocytes. Identification of differences between the two major lymphocyte subpopulations. *J.Clin.Invest* 70(3), 632-638.
- Childers, M., Eckel, G., Himmel, A., and Caldwell, J. (2007). A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Med.Hypotheses* 68(1), 101-112.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J., and Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J.Physiol* 506 ( Pt 3), 665-678.
- Coulombe, A., and Coraboeuf, E. (1992). Large-conductance chloride channels of new-born rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media. *Pflugers Arch.* 422(2), 143-150.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat.Prod.Rep.* 26(8), 1001-1043. doi: 10.1039/b802662a [doi].
- Decher, N., Lang, H.J., Nilius, B., Bruggemann, A., Busch, A.E., and Steinmeyer, K. (2001). DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br.J.Pharmacol.* 134(7), 1467-1479.
- Delpire, E., and Gagnon, K.B. (2018). Water Homeostasis and Cell Volume Maintenance and Regulation. *Curr Top Membr* 81, 3-52. doi: 10.1016/bs.ctm.2018.08.001.

- Dickman, K.G., and Goldstein, L. (1990). Cell volume regulation by skate erythrocytes: role of potassium. *Am J Physiol* 258(5 Pt 2), R1217-1223. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.5.R1217.
- Dixon, D.M., Valkanov, M., and Martin, R.J. (1993). A patch-clamp study of the ionic selectivity of the large conductance, Ca-activated chloride channel in muscle vesicles prepared from *Ascaris suum*. *J.Membr.Biol.* 131(2), 143-149.
- Dobrovinskaya, O., Delgado-Enciso, I., Quintero-Castro, L.J., Best-Aguilera, C., Rojas-Sotelo, R.M., and Pottosin, I. (2015). Placing ion channels into a signaling network of T cells: from maturing thymocytes to healthy T lymphocytes or leukemic T lymphoblasts. *Biomed Res Int* 2015, 750203. doi: 10.1155/2015/750203.
- Droogmans, G., Maertens, C., Prenen, J., and Nilius, B. (1999). Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* 128(1), 35-40.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R., and Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390(6658), 417-421.
- Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B., and Hume, J.R. (2000). A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circ.Res.* 86(4), E63-E71.
- Duszyk, M., Liu, D., French, A.S., and Man, S.F. (1995). Evidence that pH-titratable groups control the activity of a large epithelial chloride channel. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 215(1), 355-360.
- Dutta, A.K., Sabirov, R.Z., Uramoto, H., and Okada, Y. (2004). Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J.Physiol* 559(Pt 3), 799-812.
- Elenkov, I.J. (2008). Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int* 52(1-2), 40-51. doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.037.

- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., and Vizi, E.S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52(4), 595-638.
- Ellory, J.C., and Hall, A.C. (1988). Human red cell volume regulation in hypotonic media. *Comp Biochem.Physiol A* 90(4), 533-537.
- Fahlke, C. (2001). Ion permeation and selectivity in ClC-type chloride channels. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 280(5), F748-F757.
- Falke, L.C., and Mislner, S. (1989). Activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86(10), 3919-3923.
- Fan, H.T., Morishima, S., Kida, H., and Okada, Y. (2001). Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cyclic AMP-activated, but not Ca-activated, Cl(-) channels. *Br.J.Pharmacol.* 133(7), 1096-1106.
- Feray, J.C., Guerrouache, K., and Garay, R.P. (2000). Dramatic magnesium efflux induced by high potassium in rat thymocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 268(3), 673-676. doi: 10.1006/bbrc.2000.2195 [doi];S0006-291X(00)92195-8 [pii].
- Fincham, D.A., Wolowyk, M.W., and Young, J.D. (1987). Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J.Membr.Biol.* 96(1), 45-56.
- Forman, H.J., Zhang, H., and Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol.Aspects Med.* 30(1-2), 1-12.
- Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2006). SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 281(40), 29542-29557.
- Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16(10), 1303-1314. doi: 10.1038/cdd.2009.107.
- Freedman, J.C., and Hoffman, J.F. (1979). Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin. *J.Gen.Physiol* 74(2), 157-185.

- Fujise, H., Abe, K., Kamimura, M., and Ochiai, H. (1997).  $K^+$ - $Cl^-$  cotransport and volume regulation in the light and the dense fraction of high- $K^+$  dog red blood cells. *Am.J.Physiol* 273(3 Pt 2), R991-R998.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., and Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit  $ClC-2$  current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am.J.Physiol* 274(2 Pt 1), C500-C512.
- Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fievet, B., and Motais, R. (1996). A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 42(7), 985-994.
- Garcia-Romeu, F., Cossins, A.R., and Motais, R. (1991). Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J.Physiol (Lond)* 440, 547-567.
- Garcia-Soto, J.J., and Grinstein, S. (1990). Determinants of the transmembrane distribution of chloride in rat lymphocytes: role of  $Cl^-$ - $HCO_3^-$  exchange. *Am J Physiol* 258(6 Pt 1), C1108-1116. doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.6.C1108.
- Gibson, J.S., Ellory, J.C., Culliford, S.J., and Fincham, D.A. (1993). Volume-sensitive  $KCl$  co-transport and taurine fluxes in horse red blood cells. *Exp.Physiol* 78(5), 685-695.
- Graves, A.R., Curran, P.K., Smith, C.L., and Mindell, J.A. (2008). The  $Cl^-$ - $H^+$  antiporter  $ClC-7$  is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* 453(7196), 788-792.
- Gray, P.T., Bevan, S., and Ritchie, J.M. (1984). High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 221(1225), 395-409.
- Green, D.R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00051.x.
- Grinstein, S., and Foskett, J.K. (1990). Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. *Annu.Rev.Physiol* 52, 399-414.

- Grinstein, S., and Smith, J.D. (1990). Calcium-independent cell volume regulation in human lymphocytes. Inhibition by charybdotoxin. *J.Gen.Physiol* 95(1), 97-120.
- Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360(6406), 759-762.
- Grygorczyk, R., and Bridges, M.A. (1992). Whole-cell chloride conductances in cultured brushed human nasal epithelial cells. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 70(8), 1134-1141.
- Gusev, G.P., Agalakova, N.I., and Lapin, A.V. (1995). Potassium transport in red blood cells of frog *Rana temporaria*: demonstration of a K-Cl cotransport. *J.Comp Physiol [B]* 165(3), 230-237.
- Gusev, G.P., Lapin, A.V., and Agalakova, N.I. (1999). Inhibition and stimulation of K<sup>+</sup> transport across the frog erythrocyte membrane by furosemide, DIOA, DIDS and quinine. *Gen.Physiol Biophys.* 18(3), 269-282.
- Gusev, G.P., Lapin, A.V., and Agulakova, N.I. (1997). Volume regulation in red blood cells of the frog *Rana temporaria* after osmotic shrinkage and swelling. *Membr.Cell Biol.* 11(3), 305-317.
- Hals, G.D., Stein, P.G., and Palade, P.T. (1989). Single channel characteristics of a high conductance anion channel in "sarcoballs". *J.Gen.Physiol* 93(3), 385-410.
- Hanrahan, J.W., Alles, W.P., and Lewis, S.A. (1985). Single anion-selective channels in basolateral membrane of a mammalian tight epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82(22), 7791-7795.
- Hazama, A., Shimizu, T., Ando-Akatsuka, Y., Hayashi, S., Tanaka, S., Maeno, E., et al. (1999). Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive cl(-) channels. *J.Gen.Physiol* 114(4), 525-533.
- Helix, N., Strobaek, D., Dahl, B.H., and Christophersen, P. (2003). Inhibition of the endogenous volume-regulated anion channel (VRAC) in HEK293 cells by acidic di-aryl-ureas. *J.Membr.Biol.* 196(2), 83-94.

- Hempling, H.G., Thompson, S., and Dupre, A. (1977). Osmotic properties of human lymphocyte. *J Cell Physiol* 93(2), 293-302. doi: 10.1002/jcp.1040930215.
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., and Pedersen, S.F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 89(1), 193-277. doi: 89/1/193 [pii];10.1152/physrev.00037.2007 [doi].
- Hoffmann, E.K., Sorensen, B.H., Sauter, D.P., and Lambert, I.H. (2015). Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell volume homeostasis, cancer and drug resistance. *Channels (Austin)* 9(6), 380-396. doi: 10.1080/19336950.2015.1089007.
- Holtzman, M.J., Green, J.M., Jayaraman, S., and Arch, R.H. (2000). Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis* 5(5), 459-471. doi: 10.1023/a:1009657321461.
- Hurnak, O., and Zachar, J. (1994). Conductance-voltage relations in large-conductance chloride channels in proliferating L6 myoblasts. *Gen.Physiol.Biophys.* 13(3), 171-192.
- Hurnak, O., and Zachar, J. (1995). Selectivity of maxi chloride channels in the L6 rat muscle cell line. *Gen.Physiol Biophys.* 14(2), 91-105.
- Inoue, H., Mori, S., Morishima, S., and Okada, Y. (2005). Volume-sensitive chloride channels in mouse cortical neurons: characterization and role in volume regulation. *Eur.J.Neurosci.* 21(6), 1648-1658.
- Islam, M.R., Okada, T., Merzlyak, P.G., Toychiev, A.H., Ando-Akatsuka, Y., Sabirov, R.Z., et al. (2020). Annexin A2-S100A10 Represents the Regulatory Component of Maxi-Cl Channel Dependent on Protein Tyrosine Dephosphorylation and Intracellular  $Ca^{2+}$ . *Cell Physiol Biochem* 54(4), 538-555. doi: 10.33594/000000238.
- Jackson, P.S., and Strange, K. (1995). Single-channel properties of a volume-sensitive anion conductance. Current activation occurs by abrupt switching of closed channels to an open state. *J.Gen.Physiol* 105(5), 643-660.
- Jentsch, T.J. (2016). VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 17(5), 293-307. doi: nrm.2016.29 [pii];10.1038/nrm.2016.29 [doi].

- Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A., and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch.* 437(6), 783-795.
- Jentsch, T.J., Lutter, D., Planells-Cases, R., Ullrich, F., and Voss, F.K. (2016). VRAC: molecular identification as LRRC8 heteromers with differential functions. *Pflugers Arch.* 468(3), 385-393. doi: 10.1007/s00424-015-1766-5 [doi];10.1007/s00424-015-1766-5 [pii].
- Jentsch, T.J., Maritzen, T., and Zdebik, A.A. (2005a). Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J.Clin.Invest* 115(8), 2039-2046.
- Jentsch, T.J., Poet, M., Fuhrmann, J.C., and Zdebik, A.A. (2005b). Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu.Rev.Physiol* 67, 779-807.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A.A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 82(2), 503-568.
- Jha, A., Singh, A.K., Weissgerber, P., Freichel, M., Flockerzi, V., Flavell, R.A., et al. (2015). Essential roles for Cavbeta2 and Cav1 channels in thymocyte development and T cell homeostasis. *Sci Signal* 8(399), ra103. doi: 10.1126/scisignal.aac7538.
- Jordt, S.E., and Jentsch, T.J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16(7), 1582-1592.
- Kajita, H., Kotera, T., Shirakata, Y., Ueda, S., Okuma, M., Oda-Ohmae, K., et al. (1995). A maxi Cl<sup>-</sup> channel coupled to endothelin B receptors in the basolateral membrane of guinea-pig parietal cells. *J.Physiol (Lond)* 488 ( Pt 1), 65-75.
- Kajita, H., Omori, K., and Matsuda, H. (2000). The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J.Physiol* 523 Pt 2, 313-324.
- Kelly, M.E., Dixon, S.J., and Sims, S.M. (1994). Outwardly rectifying chloride current in rabbit osteoclasts is activated by hyposmotic stimulation. *J.Physiol* 475(3), 377-389.

- Kemp, P.J., MacGregor, G.G., and Olver, R.E. (1993). G protein-regulated large-conductance chloride channels in freshly isolated fetal type II alveolar epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 265(4 Pt 1), L323-L329.
- Khanna, R., Chang, M.C., Joiner, W.J., Kaczmarek, L.K., and Schlichter, L.C. (1999). hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J.Biol.Chem.* 274(21), 14838-14849.
- Kubo, M., and Okada, Y. (1992). Volume-regulatory Cl<sup>-</sup> channel currents in cultured human epithelial cells. *J.Physiol* 456, 351-371.
- Kurbannazarova, R.S., Bessonova, S.V., Okada, Y., and Sabirov, R.Z. (2011). Swelling-activated anion channels are essential for volume regulation of mouse thymocytes. *Int J Mol Sci* 12(12), 9125-9137. doi: 10.3390/ijms12129125.
- Kurbannazarova, R.S., Tashmukhamedov, B.A., and Sabirov, R.Z. (2003). Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 22(2), 221-232.
- Kurd, N., and Robey, E.A. (2016). T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol.Rev.* 271(1), 114-126. doi: 10.1111/imr.12398 [doi].
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., et al. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78(1), 247-306.
- Leaney, J.L., Marsh, S.J., and Brown, D.A. (1997). A swelling-activated chloride current in rat sympathetic neurones. *J.Physiol* 501 ( Pt 3), 555-564.
- Lee, E.L., Shimizu, T., Ise, T., Numata, T., Kohno, K., and Okada, Y. (2007). Impaired activity of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells. *J.Cell Physiol* 211(2), 513-521.
- Lee, S.C., Price, M., Prystowsky, M.B., and Deutsch, C. (1988). Volume response of quiescent and interleukin 2-stimulated T-lymphocytes to hypotonicity. *Am.J.Physiol* 254(2 Pt 1), C286-C296.
- Levitan, I., and Garber, S.S. (1998). Anion competition for a volume-regulated current. *Biophys.J.* 75(1), 226-235.

- Lewis, R.S., and Cahalan, M.D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  current in human leukemic T cells. *Cell Regul.* 1(1), 99-112.
- Lewis, R.S., and Cahalan, M.D. (1990). Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu.Rev.Physiol* 52, 415-430.
- Liu, H.T., Tashmukhamedov, B.A., Inoue, H., Okada, Y., and Sabirov, R.Z. (2006). Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress. *Glia* 54(5), 343-357.
- Liu, Y., Oiki, S., Tsumura, T., Shimizu, T., and Okada, Y. (1998). Glibenclamide blocks volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channels by dual mechanisms. *Am.J.Physiol* 275(2 Pt 1), C343-C351.
- Mahaut-Smith, M.P., and Schlichter, L.C. (1989).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. *J.Physiol* 415, 69-83.
- Malarkey, E.B., and Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem.Int.* 52(1-2), 142-154.
- Marinova, D., Ribarova, F., and Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Tech Metall* 40(3), 255-260.
- Matsuda, J.J., Filali, M.S., Volk, K.A., Collins, M.M., Moreland, J.G., and Lamb, F.S. (2008). Overexpression of  $\text{CLC-3}$  in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 294(1), C251-C262.
- McGill, J.M., Basavappa, S., and Fitz, J.G. (1992). Characterization of high-conductance anion channels in rat bile duct epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 262(4 Pt 1), G703-G710.
- Medema, J.P., and Borst, J. (1999). T cell signaling: a decision of life and death. *Hum Immunol* 60(5), 403-411. doi: 10.1016/s0198-8859(99)00008-7.
- Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Meyer, K., and Korbmacher, C. (1996). Cell swelling activates ATP-dependent voltage-gated chloride channels in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J.Gen.Physiol* 108(3), 177-193.

- Milgram, J.H., and Solomon, A.K. (1977). Membrane permeability equations and their solutions for red cells. *J.Membr.Biol.* 34(2-3), 103-144.
- Minor, D.L., Jr. (2017). Channel surfing uncovers a dual-use transporter. *EMBO J* 36(22), 3272-3273. doi: 10.15252/emboj.201798304.
- Mitchell, C.H., Wang, L., and Jacob, T.J.C. (1997). A large-conductance chloride channel in pigmented ciliary epithelial cells activated by GTPgammaS. *J.Membr.Biol.* 158(2), 167-175.
- Mongin, A.A. (2016). Volume-regulated anion channel--a frenemy within the brain. *Pflugers Arch* 468(3), 421-441. doi: 10.1007/s00424-015-1765-6.
- Mori, S., Morishima, S., Takasaki, M., and Okada, Y. (2002). Impaired activity of volume-sensitive anion channel during lactacidosis-induced swelling in neuronally differentiated NG108-15 cells. *Brain Res.* 957(1), 1-11.
- Nabekura, T., Morishima, S., Cover, T.L., Mori, S., Kannan, H., Komune, S., et al. (2003). Recovery from lactacidosis-induced glial cell swelling with the aid of exogenous anion channels. *Glia* 41(3), 247-259.
- Nam, J.H., Zheng, H.F., Earm, K.H., Ko, J.H., Lee, I.J., Kang, T.M., et al. (2006). Voltage-dependent slowly activating anion current regulated by temperature and extracellular pH in mouse B cells. *Pflugers Arch* 452(6), 707-717. doi: 10.1007/s00424-006-0084-3.
- Nilius, B., and Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 177(2), 119-147.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., Buyse, G., Manolopoulos, V., and Droogmans, G. (1997). Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 68(1), 69-119.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., and Droogmans, G. (1996). Volume-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Gen Pharmacol* 27(7), 1131-1140. doi: 10.1016/s0306-3623(96)00061-4.
- Oiki, S., Yamamoto, T., and Okada, Y. (1994). Apparent stability constants and purity of Ca-chelating agents evaluated using Ca-selective electrodes by the double-log optimization method. *Cell Calcium* 15(3), 209-216.
- Okada, Y. (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 273(3 Pt 1), C755-789. doi: 10.1152/ajpcell.1997.273.3.C755.

- Okada, Y. (2004). Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem.Biophys.* 41(2), 233-258.
- Okada, Y., and Maeno, E. (2001). Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 130(3), 377-383.
- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Manabe, K., Mori, S., and Nabekura, T. (2004). Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. *Pflugers Arch.* 448(3), 287-295.
- Okada, Y., Oiki, S., Hazama, A., and Morishima, S. (1998). Criteria for the molecular identification of the volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel. *J Gen Physiol* 112(3), 365-367. doi: 10.1085/jgp.112.3.365.
- Okada, Y., Okada, T., Sato-Numata, K., Islam, M.R., Ando-Akatsuka, Y., Numata, T., et al. (2019). Cell Volume-Activated and Volume-Correlated Anion Channels in Mammalian Cells: Their Biophysical, Molecular, and Pharmacological Properties. *Pharmacol Rev* 71(1), 49-88. doi: 10.1124/pr.118.015917.
- Okada, Y., Petersen, C.C., Kubo, M., Morishima, S., and Tominaga, M. (1994). Osmotic swelling activates intermediate-conductance Cl<sup>-</sup> channels in human intestinal epithelial cells. *Jpn.J.Physiol* 44(4), 403-409.
- Okada, Y., Sato, K., Toychiev, A.H., Suzuki, M., Dutta, A.K., Inoue, H., et al. (2009). "The Puzzles of Volume-Activated Anion Channels," in *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System*, eds. F.J. Alvarez-Leefmans & E. Delpire. (San Diego: Elsevier), 283-306.
- Okada, Y., Shimizu, T., Maeno, E., Tanabe, S., Wang, X., and Takahashi, N. (2006). Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 209(1), 21-29. doi: 10.1007/s00232-005-0836-6.
- Olesen, S.P., and Bundgaard, M. (1992). Chloride-selective channels of large conductance in bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol Scand.* 144(2), 191-198.

- Ono, K., Iwanaga, Y., Hirayama, M., Kawamura, T., Sowa, N., and Hasegawa, K. (2004). Contribution of caveolin-1 alpha and Akt to TNF-alpha-induced cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(1), L201-209. doi: 10.1152/ajplung.00293.2003.
- Park, K., Arreola, J., Begenisich, T., and Melvin, J.E. (1998). Comparison of voltage-activated Cl<sup>-</sup> channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system. *J.Membr.Biol.* 163(2), 87-95.
- Pasantés-Morales, H. (2016). Channels and Volume Changes in the Life and Death of the Cell. *Mol Pharmacol* 90(3), 358-370. doi: 10.1124/mol.116.104158.
- Pedersen, S.F., Okada, Y., and Nilius, B. (2016). Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflugers Arch.* 468(3), 371-383. doi: 10.1007/s00424-015-1781-6.
- Peluso, I., Miglio, C., Morabito, G., Ioannone, F., and Serafini, M. (2015). Flavonoids and immune function in human: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55(3), 383-395. doi: 10.1080/10408398.2012.656770.
- Perlman, D.F., Musch, M.W., and Goldstein, L. (1996). Band 3 in cell volume regulation in fish erythrocytes. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 42(7), 975-984.
- Petersen, C.C., Kubo, M., Morishima, S., Tominaga, M., and Okada, Y. (1994). Single-channel recordings of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human intestinal epithelial cells. *Jpn.J.Physiol* 44 Suppl 2, S73-S75.
- Piccolo, A., and Pusch, M. (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature* 436(7049), 420-423.
- Poletto Chaves, L.A., and Varanda, W.A. (2008). Volume-activated chloride channels in mice Leydig cells. *Pflugers Arch.* 457(2), 493-504.
- Qiu, Z., Dubin, A.E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L.J., et al. (2014). SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157(2), 447-458. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.024.

- Ravesloot, J.H., Van Houten, R.J., Ypey, D.L., and Nijweide, P.J. (1991). High-conductance anion channels in embryonic chick osteogenic cells. *J.Bone Miner.Res.* 6(4), 355-363.
- Roman, R.M., Smith, R.L., Feranchak, A.P., Clayton, G.H., Doctor, R.B., and Fitz, J.G. (2001). ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280(3), G344-G353.
- Rutledge, E., Denton, J., and Strange, K. (2002). Cell cycle- and swelling-induced activation of a *Caenorhabditis elegans* ClC channel is mediated by CeGLC-7alpha/beta phosphatases. *J.Cell Biol.* 158(3), 435-444.
- Sabirov, R.Z., Dutta, A.K., and Okada, Y. (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J.Gen.Physiol* 118(3), 251-266.
- Sabirov, R.Z., Islam, M.R., Okada, T., Merzlyak, P.G., Kurbannazarova, R.S., Tsiferova, N.A., et al. (2021). The ATP-Releasing Maxi-Cl Channel: Its Identity, Molecular Partners and Physiological/Pathophysiological Implications. *Life (Basel)* 11(6). doi: 10.3390/life11060509.
- Sabirov, R.Z., Kurbannazarova, R.S., Melanova, N.R., and Okada, Y. (2013). Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* 8(1), e55646. doi: 10.1371/journal.pone.0055646.
- Sabirov, R.Z., Manjosova, M.A., Tadjibaeva, E.T., and Krasilnikov, O.V. (1993). The interaction of amphotericin B with cell membrane of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 12(3), 249-257.
- Sabirov, R.Z., and Merzlyak, P.G. (2012). Plasmalemmal VDAC controversies and maxi-anion channel puzzle. *Biochim Biophys Acta* 1818(6), 1570-1580. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.09.024.
- Sabirov, R.Z., Merzlyak, P.G., Islam, M.R., Okada, T., and Okada, Y. (2016). The properties, functions, and pathophysiology of maxi-anion channels. *Pflugers Arch* 468(3), 405-420. doi: 10.1007/s00424-015-1774-5.
- Sabirov, R.Z., Merzlyak, P.G., Okada, T., Islam, M.R., Uramoto, H., Mori, T., et al. (2017). The organic anion transporter SLCO2A1 constitutes the

- core component of the Maxi-Cl channel. *EMBO J* 36(22), 3309-3324. doi: 10.15252/emj.201796685.
- Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2004). ATP-conducting maxi-anion channel: a new player in stress-sensory transduction. *Jpn.J.Physiol* 54(1), 7-14.
- Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2005). ATP release via anion channels. *Purinergic.Signal.* 1(4), 311-328.
- Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2009). The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J.Physiol Sci.* 59(1), 3-21.
- Sabirov, R.Z., Prenen, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (2000). Extra- and intracellular proton-binding sites of volume-regulated anion channels. *J.Membr.Biol.* 177(1), 13-22.
- Samatha, T., Shyamsundarachary, R., Srinivas, P., and Swamy, N.R. (2012). Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum Indicum* l. kurz. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(4), 177-179.
- Sato-Numata, K., Numata, T., Inoue, R., Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2017). Distinct contributions of LRRC8A and its paralogs to the VSOR anion channel from those of the ASOR anion channel. *Channels (Austin)* 11(2), 167-172. doi: 10.1080/19336950.2016.1230574.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2(12), 965-975. doi: 10.1038/nri957.
- Savino, W., and Dardenne, M. (2000). Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr.Rev.* 21(4), 412-443.
- Savino, W., Mendes-da-Cruz, D.A., Lepletier, A., and Dardenne, M. (2016). Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 12(2), 77-89. doi: 10.1038/nrendo.2015.168.
- Schlichter, L.C., Grygorczyk, R., Pahapill, P.A., and Grygorczyk, C. (1990). A large, multiple-conductance chloride channel in normal human T lymphocytes. *Pflugers Arch.* 416(4), 413-421.

- Schlichter, L.C., and Sakellaropoulos, G. (1994). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by osmotic shock in human T lymphocytes. *Exp.Cell Res.* 215(1), 211-222.
- Schneider, G.T., Cook, D.I., Gage, P.W., and Young, J.A. (1985). Voltage sensitive, high-conductance chloride channels in the luminal membrane of cultured pulmonary alveolar (type II) cells. *Pflugers Arch.* 404(4), 354-357.
- Schwarze, W., and Kolb, H.A. (1984). Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes. *Pflugers Arch.* 402(3), 281-291.
- Schwiebert, E.M., Egan, M.E., Hwang, T.H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., et al. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81(7), 1063-1073.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C., and Nilius, B. (2000). Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J.Physiol* 529 Pt 2, 385-394.
- Shimizu, T., Lee, E.L., Ise, T., and Okada, Y. (2008). Volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel as a regulator of acquired cisplatin resistance. *Anticancer Res.* 28(1A), 75-83.
- Soejima, M., and Kokubun, S. (1988). Single anion-selective channel and its ion selectivity in the vascular smooth muscle cell. *Pflugers Arch.* 411(3), 304-311.
- Solc, C.K., and Wine, J.J. (1991). Swelling-induced and depolarization-induced  $\text{Cl}^-$ -channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am.J.Physiol* 261(4 Pt 1), C658-C674.
- Soler, A., Rota, R., Hannaert, P., Cragoe, E.J., Jr., and Garay, R.P. (1993). Volume-dependent  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  fluxes in rat thymocytes. *J Physiol* 465, 387-401.
- Solomon, A.K. (1986). On the equivalent pore radius. *J Membr Biol* 94(3), 227-232. doi: 10.1007/BF01869718.

- Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., and Jentsch, T.J. (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17(3), 543-551.
- Stea, A., and Nurse, C.A. (1989). Chloride channels in cultured glomus cells of the rat carotid body. *Am.J.Physiol* 257(2 Pt 1), C174-C181.
- Strange, K., Emma, F., and Jackson, P.S. (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am.J.Physiol* 270(3 Pt 1), C711-C730.
- Strange, K., and Jackson, P.S. (1995). Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int.* 48(4), 994-1003.
- Sun, X.P., Supplisson, S., and Mayer, E. (1993). Chloride channels in myocytes from rabbit colon are regulated by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Am.J.Physiol* 264(4 Pt 1), G774-G785.
- Sun, X.P., Supplisson, S., Torres, R., Sachs, G., and Mayer, E. (1992). Characterization of large-conductance chloride channels in rabbit colonic smooth muscle. *J.Physiol.(Lond)* 448, 355-382.
- Syeda, R., Qiu, Z., Dubin, A.E., Murthy, S.E., Florendo, M.N., Mason, D.E., et al. (2016). LRRC8 Proteins Form Volume-Regulated Anion Channels that Sense Ionic Strength. *Cell* 164(3), 499-511. doi: S0092-8674(15)01695-5 [pii];10.1016/j.cell.2015.12.031 [doi].
- Ternovsky, V.I., Okada, Y., and Sabirov, R.Z. (2004). Sizing the pore of the volume-sensitive anion channel by differential polymer partitioning. *FEBS Lett.* 576(3), 433-436.
- Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., and Jentsch, T.J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356(6364), 57-60.
- Tosteson, D.C., and HOFFMAN, J.F. (1960). Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J.Gen.Physiol* 44, 169-194.
- Tsumura, T., Oiki, S., Ueda, S., Okuma, M., and Okada, Y. (1996). Sensitivity of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> conductance in human epithelial cells to extracellular nucleotides. *Am.J.Physiol* 271(6 Pt 1), C1872-C1878.

- Voets, T., Droogmans, G., and Nilius, B. (1997a). Modulation of voltage-dependent properties of a swelling-activated Cl<sup>-</sup> current. *J.Gen.Physiol* 110(3), 313-325.
- Voets, T., Wei, L., De, S.P., Van, D.W., Eggermont, J., Droogmans, G., et al. (1997b). Downregulation of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents during muscle differentiation. *Am.J.Physiol* 272(2 Pt 1), C667-C674.
- Voss, F.K., Ullrich, F., Munch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., et al. (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* 344(6184), 634-638. doi: 10.1126/science.1252826.
- Wang, X., Ono, K., Kim, S.O., Kravchenko, V., Lin, S.C., and Han, J. (2001). Metaxin is required for tumor necrosis factor-induced cell death. *EMBO Rep* 2(7), 628-633. doi: 10.1093/embo-reports/kve135.
- Wehner, F., Lawonn, P., and Tinel, H. (2002). Ionic mechanisms of regulatory volume increase (RVI) in the human hepatoma cell-line HepG2. *Pflugers Arch* 443(5-6), 779-790. doi: 10.1007/s00424-001-0765-x.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., and Kinne, R.K. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 148, 1-80.
- Weinreich, F., and Jentsch, T.J. (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J.Biol.Chem.* 276(4), 2347-2353.
- Weiss, H., and Lang, F. (1992). Ion channels activated by swelling of Madin Darby canine kidney (MDCK) cells. *J.Membr.Biol.* 126(2), 109-114.
- Wilson, C.S., and Mongin, A.A. (2019). The signaling role for chloride in the bidirectional communication between neurons and astrocytes. *Neurosci Lett* 689, 33-44. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.012.
- Woll, K.H., and Neumcke, B. (1987). Conductance properties and voltage dependence of an anion channel in amphibian skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 410(6), 641-647.
- Wundergem, R., Gong, W., Monen, S.H., Dooley, S.N., Gonce, J.L., Conner, T.D., et al. (2001). Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J.Physiol* 532(Pt 3), 661-672.

- Worrell, R.T., Butt, A.G., Cliff, W.H., and Frizzell, R.A. (1989). A volume-sensitive chloride conductance in human colonic cell line T84. *Am.J.Physiol* 256(6 Pt 1), C1111-C1119.
- Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., et al. (1999). ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J.Membr.Biol.* 167(3), 215-221.
- Yurinskaya, V.E., Moshkov, A.V., Rozanov, Y.M., Shirokova, A.V., Vassilieva, I.O., Shumilina, E.V., et al. (2005). Thymocyte K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 16(1-3), 15-22. doi: 10.1159/000087727.
- Zdrojewicz, Z., Pachura, E., and Pachura, P. (2016). The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Adv Clin Exp Med* 25(2), 369-375. doi: 10.17219/acem/58802.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4), 555-559.
- Клаус, Д. (1990). *Лимфоциты. Методы*. Москва: Мир.
- Курбанназарова, Р.Ш., Окада, Я., Мерзляк, П.Г., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2010). Характеристика анионного канала средней проводимости, активируемого на мембране тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. *Узб. Биол. Ж.* (3), 3-7.
- Курбанназарова, Р.Ш., Оно, К., Окада, Я., Мерзляк, П.Г., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2017а). Изучение молекулярной природы объем-зависимого анионного канала с использованием геномного подхода. *Доклады АН РУз* (2), 75-78.
- Курбанназарова, Р.Ш., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2007). Роль ионов Ca<sup>2+</sup>, Ca-каналов и систем сопряжённого транспорта ионов в регуляции объема лимфоцитов из тимуса крыс. *Докл. АН РУз* (6), 68-72.
- Курбанназарова, Р.Ш., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2008). Роль ионных каналов в регуляции объема лимфоцитов из тимуса крыс. *Вестник НУУз* (4), 4-6.

- Курбанназарова, Р.Ш., Хамидова, О.Ж., Мерзляк, П.Г., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2016). Роль внеклеточных одновалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. *Узб. Биол. Ж.* (5), 16-20.
- Курбанназарова, Р.Ш., Хамидова, О.Ж., Мерзляк, П.Г., Ташмухамедов, Б.А., и Сабилов, Р.З. (2017b). Роль внеклеточных двухвалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. *Вестник Каршинского Университета* (1), 58-61.
- Меланова, Н.Р., Курбанназарова, Р.Ш., Мерзляк, П.Г., Ташмухамедов, Б.А., Окада, Я., и Сабилов, Р.З. (2011). Фармакологический анализ механизма выброса глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. *Узб. Биол. Ж.* (4), 11-14.
- Петров, Р.В. (1987). *Иммунология*. М.: Медицина.
- Проссер, Л. (1977). *Сравнительная физиология животных*. М.: Мир.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CRAC	Ca Release-Activated Channels
DCPIB	4-2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил-индан-1-он-5-ил (оксимасляная кислота)
DIDS	4,4'-бис(изотиоцианат)стильбен-2-2'-дисульфоновой кислоты динатриевая соль
DIOA	Dihydroindenyl-оху-acetic acid (буметанид)
DPC	дифениламин-2-карбоксилат
$E_{rev}$	потенциал реверсии
GSH	Глутатион
LRRC8	Leucine Rich Repeat Containing 8
RVD	Regulatory Volume Decrease
SITS	4-ацетамидо-4-изотиоцианатостиблен-2,2-дисульфоновая кислота
$\Delta T_{max}$	максимальное изменение светопропускания при набухании
АК	Анионные каналы
АТФ	аденозин трифосфат
ВАХ	вольтамперная характеристика
ГКГ	главный комплекс гистосовместимости
ДМСО	Диметилсульфоксид
ОЗАК	объем-зависимый анионный канал наружного выпрямления
ПЛК	периферические лимфоциты крови
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
РТК	рецептор Т-клеток
ТЭАСl	тетраэтиламмония хлорид
ЭГТА	Этиленгликоль тетраацетат

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА I. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК.....	6
§1.1. Тимус и механизм созревания Т-лимфоцитов .....	6
§1.2. Общие принципы и механизмы регуляции объёма клеток.....	11
§1.3. Система регуляции объёма Т-лимфоцитов.....	15
§1.4. Общая характеристика анионных каналов .....	22
§1.5. CIC-2: канал небольшой проводимости внутреннего выпрямления. ....	25
§1.6. Макси-анионный канал.....	26
§1.7. Объем-зависимый анионный канал.....	32
§1.8. Заключение к главе I .....	35
ГЛАВА II. ЭКСЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК И АКТИВНОСТИ ИОННЫХ КАНАЛОВ .....	37
§2.1. Описание растворов, используемых в исследовании регуляции клеточного объёма.....	37
§2.2. Описание растворов для экспериментов по микролокальному отведению ионных токов (пэтч-кламп).....	39
§2.3. Описание методов получения лимфоцитов из тимуса крыс и мышей .....	41
§2.4. Описание клеточных линий, использованных в экспериментах пэтч-кламп .....	43
§2.5. Определение жизнеспособности тимоцитов .....	44
§2.6. Регистрация объёма клеток по светопропусканию.....	44
§2.7. Метод микролокального отведения ионных токов (пэтч-кламп). .....	46
§2.8. Получение общего экстракта флавоноидов и определение их концентрации .....	47
§2.9. Математическая обработка результатов экспериментов .....	48
ГЛАВА III. ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ ИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА .....	50

§3.1. Роль внеклеточных одновалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.....	50
§3.2. Роль внеклеточных двухвалентных катионов в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.....	56
§ 3.3 Роль внеклеточных анионов и анионного транспорта в регуляции объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. ....	62
§3.4. Роль систем сопряженного транспорта ионов калия и хлора в регуляторном уменьшении объема тимоцитов в ответ на гипоосмотических стресс. ....	66
§3.5. Обсуждение.....	69
ГЛАВА IV. БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ, АКТИВИРУЕМЫХ В МЕМБРАНЕ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ.....	71
§4.1. Кинетика активации макроскопической ионной проводимости плазматической мембраны тимоцитов в условиях гипоосмотического стресс.....	72
§4.2. Фармакологический профиль макроскопических мембранных токов, активированных в тимоцитах в ответ на осмотическое набухание клетки.....	78
§4.3. Биофизические свойства микролокальных (одиночных) ионных токов, регистрируемых на мембране тимоцитов в условиях осмотического стресса.....	84
§4.4. Обсуждение.....	95
ГЛАВА V. РОЛЬ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОГО АНИОННОГО ТРАНСПОРТА В ВЫБРОСЕ ГЛУТАТИОНА ИЗ ТИМОЦИТОВ ПРИ ГИПООСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ.....	97
§5.1. Роль глутатиона в клеточных процессах и гипотетические пути его выброса при осмотическом стрессе.....	97
§5.2. Общая характеристика транспортных путей системы выброса глутатиона из тимоцитов. ....	100
§5.3. Проницаемость объем-зависимого анионного канала к глутатиону при замене ионов хлора во внеклеточной среде на ионы глутатиона.....	108
§5.4. Обсуждение.....	117

ГЛАВА VI. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОЗАК В МУТАНТНЫХ КЛЕТКАХ L929 ФИБРОСАРКОМЫ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РАНДОМНОГО МУТАГЕНЕЗА.....	119
ГЛАВА VII. МОДУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ.....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ....	136
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	160

**Курбанназарова Раънохон Шараповна**

**Мерзляк Петр Григорьевич**

**Сабиров Равшан Заирович**

**РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЁМА И МЕМБРАННЫЙ  
ТРАНСПОРТ ИОНОВ**

(монография)