

НАБЛЮДЕНИЕ СЕКРЕЦИИ АТФ ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ EX VIVO**Хохлов А.А., Рогачевская О.А.**

Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Вкусковая трансдукция начинается с распознавания вкусовых молекул специализированными рецепторами апикальной мембраны вкусовых клеток и завершается кодированием сенсорной информации в форме стимул-зависимого выброса афферентного нейротрансмиттера АТФ, стимулирующего вкусовой нерв. Этот процесс подробно изучался на уровне одиночных клеток типа II, экспрессирующих специализированные вкусовые GPCR рецепторы семейств T1 и T2. Показано, что при трансдукции вкусового сигнала синаптическая передача обеспечивается функционированием во вкусовых клетках типа II неканонического химического синапса: выброс АТФ осуществляется Ca^{2+} -независимым образом через АТФ-проницаемые ионные каналы базолатеральной мембраны. Между тем, при исследовании стимул-зависимости выброса АТФ на уровне одиночных клеток или изолированных вкусовых почек практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток. Поэтому в таких экспериментах существует вероятность неспецифических эффектов вкусовых соединений. Для исследования секреции АТФ вкусовыми клетками в условиях физиологически адекватной стимуляции нами разработан экспериментальный подход, основанный на использовании модифицированной камеры Уссинга. Камера формировалась двумя перфузируемыми отсеками, между которыми плотно зажимался и изолировался фрагмент языкового эпителия, содержащий желобоватый вкусовой сосочек. Вкусовые стимулы подавались через верхний отсек, в который была обращена наружная часть эпителия. Базальная часть вкусовых почек была обращена в нижний отсек, заполняемый люциферин-люциферазной смесью для детекции выброса АТФ. Данный подход впервые позволил в режиме реального времени наблюдать выброс АТФ вкусовыми клетками в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами, доступными только для апикальной мембраны.

Ключевые слова: камера Уссинга, люциферин-люциферазный метод, секреция АТФ, вкусовой рецепторный эпителий.

В периферической вкусовой системе вкусовые рецепторные клетки, сгруппированные во вкусовые почки, выполняют функцию хемосенсоров, детектирующих вкусовые вещества в ротовой полости. Популяция клеток вкусовой почки гетерогенна и включает три типа вкусовых клеток. Примерно половину популяции клеток вкусовой почки составляют вкусовые клетки типа I, которые выполняют преимущественно поддерживающую функцию [1]. Вкусовые клетки типа III, образующие 10-15% группу, детектируют кислые и некоторые соленые стимулы [1]. Вкусовые клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов и стимулов категории умами (аминокислоты, рибонуклеотиды, пептиды). Они составляют 30-40% вкусовых клеток во вкусовой почке. Распознавание вкусовых молекул обеспечивается специализированными рецепторами, функционирующими на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, обращенной во вкусовую пору. Эти клетки экспрессируют гептаспиральные вкусовые рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR), формирующие два подсемейства T1R и T2R. Эти рецепторы и сопряженные сигнальные системы функционируют на апикальной мембране, которая экспонирована во вкусовую пору и выполняет рецептирующую функцию. Согласно современным представлениям [1], трансдукция вкусового сигнала во вкусовых клетках типа II включает следующие основные внутриклеточные события. При связывании молекул вкусовых веществ вкусовые GPCR рецепторы сопрягаются G-белком с фосфолипазой PLC $\beta 2$, которая катализирует гидролиз фосфолипида PIP₂, производя два вторичных медиатора: растворимый IP₃ и липидный DAG. Далее IP₃ стимулирует IP₃-рецептор, что приводит к выбросу депонированного Ca^{2+} . Стимул-зависимое повышение внутриклеточного Ca^{2+} обеспечивает активацию Ca^{2+} -зависимых катионных каналов TRPM5 базолатеральной мембраны и генерацию деполяризующего рецепторного потенциала. Последний стимулирует потенциал-зависимые Na^+ каналы, инициируя генерацию серии потенциалов действия и выброс афферентного нейромедиатора АТФ [1-4].

Поскольку выделение одиночных вкусовых клеток сопряжено с достаточно жесткими ферментативными и механическими воздействиями, сохранение функциональности апикальной мембраны, представляет собой одну из проблем физиологии вкусовых клеток. Так же в экспериментах на одиночных клетках практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток, поскольку аппликация растворов происходит ко всей поверхности клетки, из которой апикальная мембрана занимает порядка 10%, что значительно повышает проявление неспецифических эффектов от экспериментальных воздействий [5]. С этой точки зрения представляется целесообразным выполнять исследования вкусовой трансдукции с использованием не только препаратов диссоциированных вкусовых почек, но и более интегральных препаратов, в которых рецептирующая мембрана и ассоциированные молекулярные структуры более сохранены и функциональны.

Один из таких препаратов был описан в работе [2], в которой использовалась камера Уссинга [6] для анализа секреции АТФ фрагментами языкового эпителия, содержащих либо желобоватый, либо листовидный вкусовой сосочек. Базолатеральная сторона эпителия располагалась в резервуаре с буферным раствором, который после стимуляции собирался, смешивался с люциферин-люциферазым реагентом и анализировался на люцинометре. Эта методика позволила статистически продемонстрировать рост выброса АТФ фрагментами эпителия со вкусовыми почками в ответ на однократную стимуляцию смесью горьких веществ по сравнению с фрагментами без вкусовой ткани [2]. Тем не менее, такой подход фактически лишен внутреннего контроля по схеме контроль-воздействие-контроль. В данной работе мы модифицировали описанный выше подход и устранили указанный недостаток, обеспечив мониторинг секреции АТФ в режиме реального времени.

Камера Уссинга традиционно используется для измерения транспорта ионов и питательных веществ через эпителиальные ткани [6-8]. В нашем эксперименте барьером между отсеками камеры (рис. 1) служил фрагмент языкового эпителия с желобоватым вкусовым сосочком, как участок, наиболее богатый вкусовой тканью в процентном отношении к невкусовому эпителию. Для получения фрагмента языкового эпителия мыши, под эпителий изолированного языка инъецировалась смесь ферментов (1,1 мг/мл коллагеназы Б, 1,2 мг/мл диспазы II, 0,2 мг/мл эластазы, 0,5 мг/мл ингибитора трипсина в растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 10 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,8), затем язык помещался в бескальциевый раствор, содержащий (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0,7 CaCl₂, 1,1 MgCl₂, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7,4), на 35 минут для ферментации соединительной ткани. После инкубации эпителий подрезался и отделялся от мышечной ткани [3-5]. Фрагмент эпителия языка с желобоватым сосочком помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7,4), и затем крепился в камере Уссинга так, чтобы апикальная часть эпителия была обращена в верхний отсек камеры (рисунок 1).

Наша модификация камеры позволяла перфузировать оба отсека. Раствор для перфузии апикальной (наружной) стороны эпителия содержал (мМ): 50 NaCl, 20 KCl, 4 CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,6 [9] и подавался в верхний отсек камеры. Нижний отсек камеры, куда обращена внутренняя, базолатеральная часть эпителия был заполнен люциферин-люциферазой (10 мМ калиевой соли люциферина и 0,1 мкг/л рекомбинантной люциферазы, растворенных в физиологическом растворе). Поскольку секреция АТФ является финальным актом вкусовой трансдукции [2], изменение хемилюминесценции этой смеси свидетельствует о появлении АТФ, активирующего эту реакцию.

Для измерения хемилюминесценции в режиме реального времени модифицированная камера Уссинга монтировалась на микрофотометре Model 814 (РТИ, США), позволяющем регистрировать даже слабые световые сигналы и работающем в режиме счёта фотонов. Фотоотчеты регистрировались и анализировались с помощью программного обеспечения Felix32 (РТИ, США), полученные данные обрабатывались в программе SigmaPlot 11 (Systat Software, США) [10].

Модификация камеры обеспечила возможность независимой неоднократной смены растворов с апикальной и базальной стороны эпителия и минимальное гидростатическое давление на эпителий, что позволяло в процессе регистрации производить быструю, без гидравлического удара, смену растворов.

Герметичность камеры с закреплённым эпителием в начале регистрации проверялась краткой (1520 секунд) подачей раствора 100 нМ АТФ в верхний отсек камеры. При наличии повреждений или неплотной фиксации эпителия в камере это приводило к быстрому проникновению АТФ в нижний отсек и вызывало большой по амплитуде хемилюминесцентный сигнал – в этом случае эксперимент прекращался и в камеру устанавливался новый вкусовой эпителий. В ряде случаев уже в начале регистрации хемилюминесцентного сигнала наблюдалось снижение базового уровня АТФ (сигнала) практически до нуля за короткий промежуток времени (2-5 минут) – такой эпителий так же считался непригодным для эксперимента.

Перед началом регистрации в течении 30-40 минут производилась непрерывная перфузия обеих отсеков камеры апикальным и физиологическим растворами соответственно, для восстановления ткани после механических воздействий, связанных с закреплением её между отсеками. После периода релаксации препарата

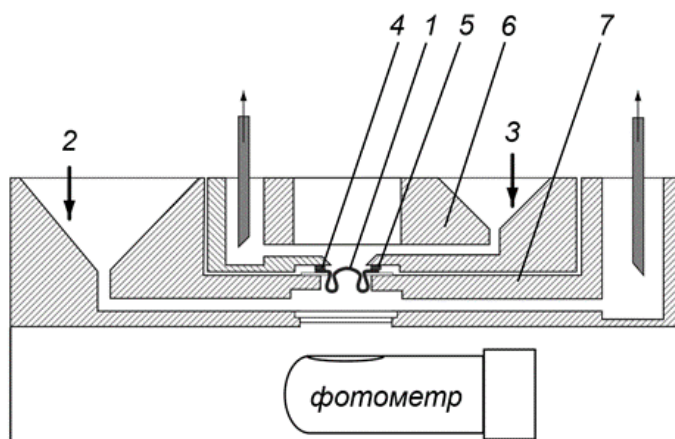


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки. 1 – фрагмент эпителия с желобоватым сосочком; 2 – подача физиологического раствора со смесью люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры; 3 – подача «слюны» со стимулами в верхний отсек камеры; 4 – пластиковое кольцо; 5 – силиконовая прокладка; 6 – верхняя часть камеры; 7 – нижняя часть камеры

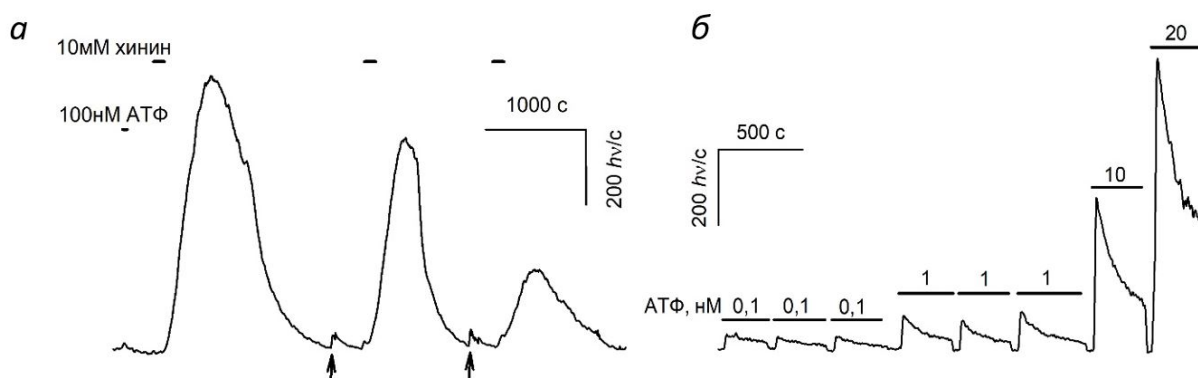


Рисунок 2. Регистрация хемилумinesцентного сигнала люциферин-люциферазной смеси в нижнем отсеке камеры в реальном времени.

а – хемилумinesцентный сигнал люциферин-люциферазной смеси, обусловленный выбросом АТФ вкусовым эпителием при кратковременной аппликации горького вещества (10 мМ гидрохлорида хинина) на апикальную поверхность эпителия. Время и продолжительность аппликаций указаны линиями над экспериментальной кривой, моменты замены смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры отмечены стрелками снизу. б – регистрация хемилумinesцентного сигнала при подаче раствора люциферин-люциферазы с известными концентрациями АТФ (калибровочные измерения для количественной оценки средней концентрации, выделенного эпителием при стимуляции). Время и продолжительность подач раствора люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры указаны линиями над экспериментальной кривой.

нижний отсек заполнялся люциферин-люциферазной смесью, что, как правило, позволяло наблюдать стабильную базальную хемилумinesценцию низкого уровня, видимо, вызванную спонтанным окислением люциферина.

Поскольку известно, что вкусовые клетки, расположенные в базальной части языка ответственны преимущественно за детекцию горьких вкусов [1-5], в качестве вкусовых стимулов использовали синтетические вещества гидрохлорид хинина (10 мМ) и октоацетат сахарозы (1 мМ), которые подавались путём кратковременной (на 30-50 сек) смены раствора в верхнем отсеке камеры. Аппликация вкусовых стимулов приводила к выбросу АТФ эпителием и появлению хемилумinesцентного сигнала в нижнем отсеке камеры как это показано на рисунке 2а. Интервал времени между подачей вкусового стимула и максимумом хемилумinesцентного ответа люциферин-люциферазной смеси составил 30-100 секунд. После восстановления базового уровня хемилумinesценции производилась смена смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры (стрелки на рис. 2а), чтобы избежать падения амплитуды ответов при последующей регистрации вследствие снижения концентрации активных реагентов люциферин-люциферазной смеси.

Для количественной оценки средней концентрации АТФ, выделенного эпителием при стимуляции, после завершения эксперимента производились калибровочные измерения, пример которых приведен на рисунке 2б. Для этого поочередно производилась отмывка нижнего отсека камеры физиологическим раствором с последующим заполнением раствором люциферин-люциферазы с известной концентрацией АТФ (рис. 2б). По пиковым значениям уровня хемилумinesценции строилась калибровочная диаграмма, как функция средней концентрации АТФ в нижнем отсеке. Согласно полученной диаграмме при данных условиях регистрации и составе люциферин-люциферазной смеси минимальная регистрируемая средняя концентрация АТФ составила приблизительно 0.1 нМ, максимальная в ряде случаев достигала 30 нМ АТФ в ответ на аппликацию 10мМ хинина.

Разработанная нами методика мониторинга выброса АТФ вкусовым эпителием путём on-line регистрации хемилумinesценции люциферин-люциферазной смеси с помощью модифицированной циркуляционной камеры Уссинга обеспечила достаточно высокую чувствительность регистрации, соответствующую эффективной концентрации АТФ порядка 0,1 нМ (при соотношении сигнал/шум равном 1) и позволила регистрировать серию выбросов АТФ одним препаратом, стимулируемым последовательной аппликацией кратковременных горьких стимулов. Методика позволяла сохранять жизнеспособность вкусовой ткани и её способность отвечать на горькие вещества в течении длительного (до 2 часов) эксперимента, хотя при этом наблюдалось постепенное снижение (рандаун) амплитуды ответов (рис. 2а), возможно, из-за истощения запаса АТФ в клетках и/или снижения эффективности каскада трансдукции и механизма секреции. В дальнейшем данная методика может быть использована для анализа физиологических эффектов различных соединений, включая вкусовые вещества и модуляторы активности вкусовых GPCR рецепторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035 (рук. О.А. Рогачевская).

Список литературы / References:

1. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflugers Archiv*, 2021, vol. 473. doi: 10.1007/s00424-020-02464-4
2. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, 2005, vol. 310, no. 5753. doi: 10.1126/science.1118435
3. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO Journal*, 2007, vol. 26, no. 3. doi: 10.1038/sj.emboj.7601526
4. Romanov R.A., Lasher R.S., High B. et al. Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Science Signaling*, 2018, vol. 11, no. 529. doi: 10.1126/scisignal.aao1815
5. Rogachevskaya O.A., Churbanov G.D., Bystrova M.F., Romanov R.A., Kolesnikov S.S. Stimulation of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor by denatonium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, vol. 416, no. 3-4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.095
6. Ussing H.H., Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1951, vol. 23. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x
7. Geraedts M.C., Troost F.J., De Ridder R.J., Bodelier A.G., Masclee A.A., Saris W.H. Validation of Ussing chamber technology to study satiety hormone release from human duodenal specimens. *Obesity*, 2012, vol. 20, no. 3. doi: 10.1038/oby.2011.104
8. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., Wu G. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 2013, vol. 18. doi: 10.2741/4178
9. Shannon I.L., Suddick, R.P., Dowd Jr. F.J. Saliva: composition and secretion. *Monographs in oral science*, Basel, Karger, 1974, vol. 2, no. 1. PMID: 4601379
10. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y2 receptors in mouse taste cells. *The Journal of Neurophysiology*, 2003, vol. 90. doi: 10.1152/jn.00312.2003

EX VIVO MONITORING OF ATP SECRETION BY TASTE CELLS**Khokhlov A.A., Rogachevskaya O.A.**

Institute of Cell Biophysics RAS

Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Abstract. Taste transduction starts off the recognition of tastants by specialized receptors in the apical membrane of taste cells and ends with the encoding of sensory information in the form of a stimulus-dependent release of the afferent neurotransmitter ATP, which stimulates the taste nerve. This process has been studied in detail at the level of type II single cells expressing specialized taste GPCR receptors of the T1 and T2 families. It has been shown that, upon transduction of a taste signal, synaptic transmission is ensured by the functioning of a non-canonical chemical synapse in type II taste cells: ATP is released in a Ca²⁺-independent manner through ATP-permeable ion channels of the basolateral membrane. Meanwhile, in single cell experiments it is practically impossible to stimulate only the apical membrane of cells; however, this is feasible when registering the activity of the taste epithelium due to the physical isolation of the apical and basolateral parts. To study the secretion of ATP by taste cells under conditions of physiologically adequate stimulation, we used a modernized Ussing chamber provided an opportunity to stimulate separately the apical part of taste cells exposed to the upper cell of the chamber and to detect ATP secreted from the basal part of the epithelium into the lower cell of the chamber filled with a mixture of luciferin-luciferase. The developed experimental scheme made it possible to on-line register a series of ATP releases by the taste epithelium in response to stimulation of the apical part of the epithelium with bitter taste substances.

Key words: *Ussing chamber, luciferin-luciferase, ATP secretion, taste epithelium.*