

гетерохроматина в ядре достигает максимального значения (на 14-17 % выше контрольного) при облучении в течение 16 минут. Зависимость эффекта от времени воздействия подчиняется нормальному распределению.

Список литературы / References:

1. Кудряшов Ю.Б. *Радиационная биофизика (ионизирующие излучения)*. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004, 448 с. [Kudryashov Y.B. *Radiation Biophysics (ionizing radiation)*. М.: FIZMATLIT, 2004, 448 p. (In Russ.)]
2. Петрашова Д.А., Белишева Н.К., Пелевина И.И., Мельник Н.А., Зользер Ф. Генотоксические эффекты в буккальном эпителии горняков, работающих в условия облучения природными источниками ионизирующего излучения. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2011, т. 13, с. 1792-1796. [Petrashova D.A., Belisheva N.K., Pelevina I.I., Miller N.A., Zolzer F. Genotoxic effects in buccal epithelia at miners, working in the conditions of irradiation by natural sources of ionizing radiation. *Bulletin of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2011, vol. 13, pp. 1792-1796. (In Russ.)]
3. Gong-Min Chang, Ya-Bing Gao, Shui-Ming Wang [et al.] Protecting Intestinal Epithelial Cell Number 6 against Fission Neutron Irradiation through NF-kB Signaling Pathway. *BioMed Research International*, 2015, vol. 2015, article ID 124721, 8 pages.
4. Heber E.M., Hawthorne M.F., Kueffer P.J., Garabalino M.A. [et al.] Therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy mediated by boron-rich liposomes for oral cancer in the hamster cheek pouch model. *PNAS*, 2014, vol. 111, pp. 16077-16081.
5. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress. In: *New Developments in Chromatin Research*, Editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart. Chapter 6. Nova Science Publishers, Inc. New York, 2012, pp. 123-144.
6. Kuznetsov K.A., Kyzym P.S., Onishchenko G.M., Berezhnoy A.Y., Shckorbatov Y.G. [et al.] Chromatin changes under exposure to neutron radiation. *Proceedings of the International Conference "Advances in cell biology and biotechnology"*, Lviv, 11-13 October 2015, p. 83.
7. Shckorbatov Y.G., Shakhbazov V.G., Bogoslavsky A.M., Rudenko A.O. On age-related changes of cell membrane permeability in human buccal epithelium cells. *Mech. Ageing Develop*, 1995, vol. 83, pp. 87-90.

РЕГУЛЯЦИЯ ВХОДА Ca^{2+} ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ ГЕПТАСПИРАЛЬНОГО РЕЦЕПТОРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+}

Черкашин А.П., Рогачевская О.А., Фадеев П.Ю., Колесников С.С.

Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: a.p.cher@yandex.ru

Аннотация. Вкусочная почка – это плотный ассоциат 50-100 вкусовых клеток нескольких типов, в котором межклеточное пространство на два порядка меньше внутриклеточного. В силу этого, концентрация внеклеточных ионов, включая ионы Ca^{2+} , может варьировать при изменении электрической активности клеток вкусовой почки. Вкусочные клетки типа III образуют классические химические синапсы, в которых выброс нейромедиатора инициируется входом наружного Ca^{2+} через потенциал-зависимые (ПЗ) Ca^{2+} каналы. Истощение наружного Ca^{2+} за счет активности других клеток, должно восприниматься данной клеткой как изменение интенсивности вкусового стимула. Это фактически является ложной информацией для мозга, и поэтому в клетках типа III должен существовать механизм, который обеспечивает инвариантность выброса нейромедиатора в определенном диапазоне концентраций наружного Ca^{2+} . В данной работе анализировалась зависимость ПЗ Ca^{2+} тока во вкусовых клетках от концентрации внеклеточного Ca^{2+} . Было установлено, что на кривой зависимости ПЗ Ca^{2+} тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} имеется плато в диапазоне концентраций (1-2 мМ) наружного Ca^{2+} . Также нами анализировалась зависимость величины Ca^{2+} ответов, инициируемых деполяризацией клетки, от концентрации наружного Ca^{2+} . Оказалось, что величина Ca^{2+} ответа практически не зависела от концентрации наружного Ca^{2+} в диапазоне от 0,5 до 5 мМ. Это указывает на существование механизма, который регулирует активность ПЗ Ca^{2+} каналов, чтобы обеспечить инвариантность потока Ca^{2+} .

Ключевые слова: вкусовые клетки, ПЗ Ca^{2+} -каналы, экстраклеточный Ca^{2+} , рецептор экстраклеточного Ca^{2+} .

REGULATION OF Ca²⁺ INFLUX IN TASTE CELLS INVOLVING EXTRACELLULAR Ca²⁺-SENSING RECEPTOR

Cherkashin A.P., Rogachevskaja O.A., Fadeev P.Y., Kolesnikov S.S.
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
Pushchino, 142290, Russia
e-mail: a.p.cher@yandex.ru

Abstract. In the taste bud, a tight associate of 50-100 taste cells of different types, extracellular volume is less than that of the cytoplasm by two orders of magnitude. By that, electrical activity of taste bud cells, which is associated with redistribution of physiologically important ions between the cell cytoplasm and external medium, can entail substantial variations of extracellular ions, including Ca²⁺. Type III taste cells form classical chemical synapses and release neurotransmitter by employing exocytosis that is triggered by Ca²⁺ ions entering through voltage-gated (VG) Ca²⁺-channels. The depletion of external Ca²⁺ should result in a decreased release of neurotransmitter in response to the same taste stimulus, thus non-adequately conveying taste information to the brain. One therefore can expect the existence of certain that provides invariance of neurotransmitter release from type III cells within a physiologically relevant range of concentrations of external Ca²⁺. To examine this idea, we analyzed here the dependence of VG Ca²⁺-currents in taste cells on extracellular Ca²⁺. As was found, VG Ca²⁺-current magnitude versus concentration of bath Ca²⁺ exhibited a plateau in the range of 1-2 mM. In addition, we monitored intracellular Ca²⁺ signals produced by Ca²⁺ influx through VG Ca²⁺-channels upon cell depolarization. It turned out that the magnitude of VG Ca²⁺ transients was weakly or even negligibly dependent on external Ca²⁺ varied from 0,5 to 5 mM. These findings validate the idea that a certain mechanism regulates activity of VG Ca²⁺-channels to ensure the invariance of Ca²⁺ influx triggering neurotransmitter release at variable extracellular Ca²⁺.

Key words: taste cells, VG Ca²⁺-channels, extracellular Ca²⁺, extracellular Ca²⁺-sensing receptor.

Введение. Вкусочная почка представляет собой плотный ассоциат 50-100 клеток, расстояние между мембранами которых порядка 100 Å [1, 2]. Последнее означает, что по объему внеклеточное пространство во вкусовой почке на два порядка меньше внутриклеточного, и поэтому электрическая активность клеток может приводить к заметным изменениям содержания основных физиологически важных ионов во внеклеточной среде. Популяция клеток вкусовой почки неоднородна и включает вкусовые клетки трех типов (тип I – тип III) [1]. Потенциал-зависимые (ПЗ) Ca²⁺ каналы функциональны только в клетках типа III [3, 4], которые формируют классические химические синапсы с вкусовым нервом и высвобождают нейротрансмиттер по механизму Ca²⁺-зависимого экзоцитоза, стимулируемого ионами Ca²⁺, входящими через ПЗ Ca²⁺ каналы [5]. Синаптическая щель является внеклеточным компартментом весьма малого объема и с ограниченным диффузионным обменом. Вполне вероятно поэтому, что после прихода нескольких потенциалов действия, стимулирующих вход Ca²⁺ в синаптическую терминаль через ПЗ Ca²⁺ каналы, происходит заметное истощение Ca²⁺ в синаптической щели. Последнее неизбежно приведет к пропорциональному падению ПЗ Ca²⁺ тока и уменьшению количества нейротрансмиттера, выброшенного в ответ на последующий потенциал действия, т.е. к снижению эффективности синаптической передачи. Представляется поэтому физиологически целесообразным существование механизма, который бы обеспечил более или менее инвариантный выброс нейромедиатора при варьированной концентрации Ca²⁺ в синаптической щели и в экстраклеточном пространстве в целом. В настоящей работе мы проводили экспериментальную проверку этой идеи, анализируя как зависимость амплитуды ПЗ Ca²⁺ токов во вкусовых клетках типа III от концентрации внеклеточного Ca²⁺, так и зависимость величины Ca²⁺ ответов, инициируемых деполяризацией клетки, от концентрации наружного Ca²⁺.

Материалы и методы. Электрофизиология. Эксперименты проводили на одиночных вкусовых клетках, изолированных из желобоватого сосочка языка мыши (6-12 недель), как описано ранее [6]. Электрическую активность вкусовых клеток регистрировали методом patch-clamp в конфигурации perforated patch с использованием усилителя Axopatch 200 B, ЦАП-АЦП конвертера Digidata 1440A и пакета лицензионных программ pClamp10.3 (все Axon Instruments, SINGAPORE). Клетки в электрофизиологической камере визуализовали с использованием микроскопа Axioskop-2 (Zeiss, Германия) и объектива LD A-Plan 32x. Базовый внутриклеточный раствор содержал, mM: 140 CsCl, 1 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 HEPES-CsOH, Amphotericin B (400 мкг/мл), pH 7.3. Базовый внеклеточный раствор содержал, mM: 135 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH (NaOH), pH 7.4. Система перфузии [7] обеспечивала смену раствора камеры со скоростью 0.1-1 мл/с. Опыты проводились при комнатной температуре 22-24 °C. Все соли и реагенты приобретались в Sigma-Aldrich (США).

Микрофотометрия. Эксперименты проводились с использованием флуоресцентного микроскопа Axioskop 2 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.5 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны 480±5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535±20 нм. Каждые 0.1 секунды регистрировались последовательные флуоресцентные изображения. Изменение концентрации цитозольного кальция в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$). Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

Результаты и обсуждение. Электрическая активность одиночных вкусовых клеток анализировалась методом perforated patch [8], чтобы предотвратить потерю внутриклеточных компонент и ассоциирующуюся с этим инактивацию ПЗ Ca^{2+} каналов. Регистрации проводились в условиях диализа клеток раствором, содержащим 140 мМ CsCl, что обеспечивало подавление выходящих токов через ПЗ K^+ каналы. Это облегчало функциональную идентификацию вкусовых клеток типа III [9] и позволяло регистрировать относительно небольшие входящие токи через ПЗ Ca^{2+} каналы. Когда клетки типа III перфузировались раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ CaCl_2 , их деполяризация вызывала быстрые входящие токи, блокируемые тетродотоксином (TTX), т.е. транспортируемые ПЗ Na^+ -каналами, и медленно инактивирующиеся входящие ПЗ Ca^{2+} токи небольшой амплитуды (10-30 пА), которые были не вполне хорошо разрешимы из-за электрических шумов (см. рис. 1а). Ионные токи через ПЗ Ca^{2+} каналы были хорошо различимы в условиях блокады ПЗ Na^+ токов TTX, и когда в качестве носителя использовался Ba^{2+} (4-10 мМ) (см. рис. 1б). Вольтамперные (I-V) характеристики этих токов показывали, что они переносятся преимущественно через высокопороговые ПЗ Ca^{2+} каналы (см. рис. 1в).

Важной особенностью исследовавшихся ПЗ Ca^{2+} каналов было то, что они полностью блокировались ионами Cd^{2+} в концентрации до 50 мкМ (рис. 1в), причем блокирование было полностью обратимым при непродолжительной (до 30 с) аппликации блокатора. Это позволяло количественно оценивать ПЗ Ca^{2+} токи, которые были весьма невелики по величине при физиологических концентрациях экстраклеточного Ca^{2+} , как разность Ca^{2+} токов, регистрировавшихся в присутствии и отсутствии 50 мкМ Cd^{2+} .

Далее, мы регистрировали ПЗ Ca^{2+} токи во вкусовых клетках типа III при различных концентрациях Ca^{2+} во внеклеточном растворе, варьируемых в пределах 0,5-10 мМ. Предварительно вкусовые клетки инкубировались в течение 10 мин в присутствии проникающего Ca^{2+} хелатора ВАРТА-АМ, чтобы увеличить буферную емкость цитоплазмы и минимизировать эффекты внутриклеточного Ca^{2+} на активность ПЗ Ca^{2+} каналов [11]. Величина ПЗ Ca^{2+} токов определялась при потенциале, соответствующем экстремуму на I-V кривой (рис. 1в). Поскольку уровень ПЗ Ca^{2+} токов варьировал от клетки к клетке, для сравнения различных экспериментов, Ca^{2+} токи при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} нормировались на величину тока при 1 мМ Ca^{2+} , которая принималась за единицу. Как оказалось, величины Ca^{2+} токов при концентрациях Ca^{2+} 1 и 2 мМ были практически одинаковы для большинства исследованных клеток (см. рис. 2а). Усредненная по 9 экспериментам зависимость представлена на рисунке 2б.

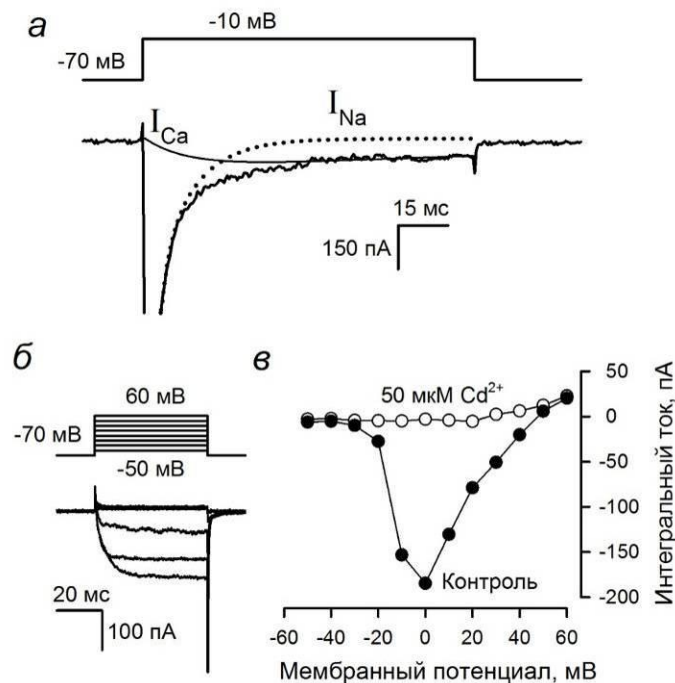


Рисунок 1 – ПЗ ионные токи во вкусовых клетках типа III в условиях диализа раствором, содержащим 140 мМ CsCl.

- а** – Входящие Na^+ (I_{Na} , пунктирная кривая) и Ca^{2+} (I_{Ca} , тонкая линия) токи, регистрируемые от вкусовой клетки в ответ на деполяризацию 100 мс импульсом (верхняя панель) -10 мВ. Клетка поддерживалась при потенциале -70 мВ и перфузировалась раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ CaCl_2 .
- б** – Репрезентативное семейство Ba^{2+} токов через ПЗ Ca^{2+} каналы, регистрируемых от вкусовой клетки в ответ на деполяризацию в промежутке между -50 мВ и 60 мВ. В наружном растворе – 140 мМ NaCl + 4 мМ BaCl_2 + 1 мкМ TTX.
- в** – I-V характеристика стационарного Ba^{2+} тока в контроле (семейство токов в б) и в присутствии 50 мкМ Cd^{2+} (оригинальные регистрации не показаны)

Также нами анализировалась зависимость величины Ca^{2+} ответов, инициируемых деполяризацией клетки, от концентрации наружного Ca^{2+} . При предварительно установленном гигаомном контакте с регистрирующим электродом клетка в течение 10 минут нагружалась Ca^{2+} зондом Fluo-4. По достижении приемлемого уровня флуоресценции Fluo-4 клетка отмывалась и затем деполяризовалась последовательностью электрических импульсов, имитирующей серию потенциалов действия, возникающих в клетке при активации её вкусовым стимулом. Оказалось, что величина кальциевого ответа практически не зависела от концентрации наружного кальция в диапазоне от 0,5 до 5 мМ (см. рис. 3).

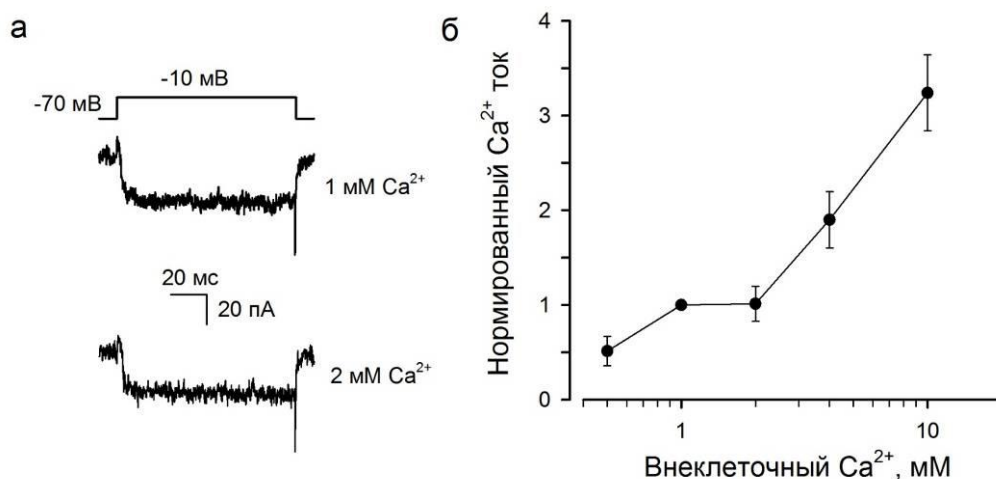


Рисунок 2 – ПЗ Ca^{2+} токи при различных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} .

- а** – Репрезентативные регистрации ПЗ Ca^{2+} токов при потенциале -10 мВ в одной и той же клетке при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} : верхняя панель – 1 мМ, нижняя панель – 2 мМ. Клетка поддерживалась при -70 мВ, диализовалась при 140 мМ CsCl в регистрирующем электроде и перфузировалась раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мкМ TTX и варьируемый CaCl_2 .
- б** – Зависимость нормированного ПЗ Ca^{2+} тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} . При данной концентрации внеклеточного Ca^{2+} определялась величина ПЗ Ca^{2+} тока в точке экстремума на I-V кривой (Рис. 1в), и это значение нормировалось на величину тока при 1 мМ Ca^{2+} . Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка (n=9)

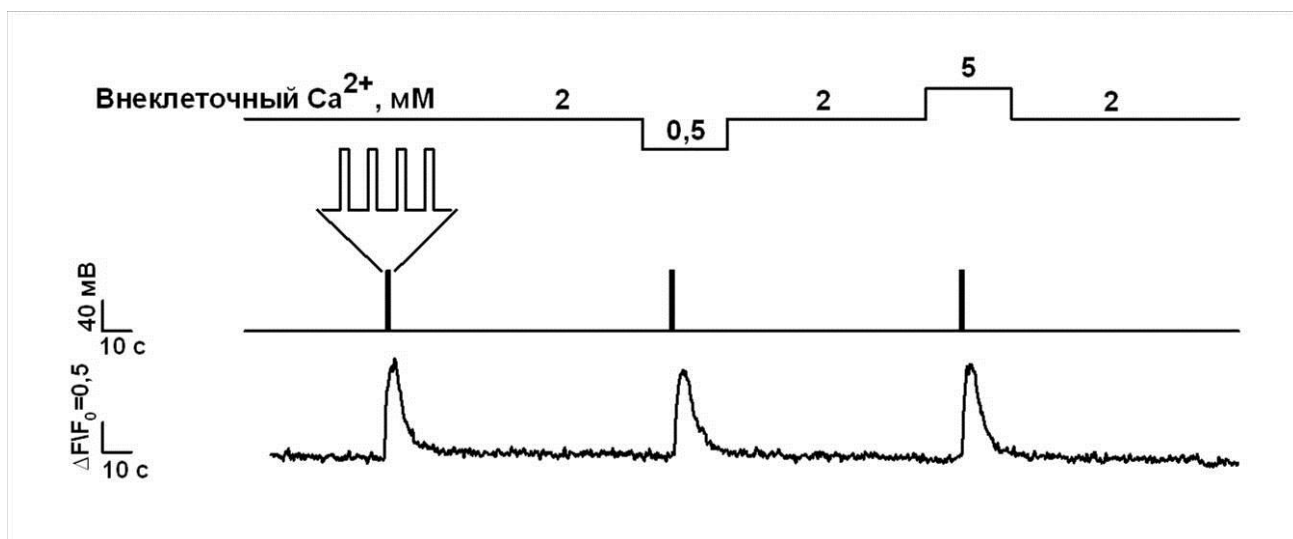


Рисунок 3 – Репрезентативная регистрация Ca^{2+} ответов одиночной вкусовой клетки III типа на серии деполяризующих импульсов при различных концентрациях наружного Ca^{2+} . Клетка поддерживалась при потенциале -70 мВ в растворе содержащем 2 мМ Ca^{2+} . Для получения кальциевых ответов клетка деполяризовалась серией импульсов от -70 мВ до 0 мВ. Ca^{2+} ответы регистрировались при различных концентрациях Ca^{2+} в наружной среде

В поисках объяснения полученной экспериментальной зависимости (рис. 2б, 3) мы опирались на ранее полученные результаты [12], в соответствии с которыми вкусовые клетки типа III экспрессируют ген гептаспирального рецептора CaSR. Его агонистами являются химически весьма разнородные вещества от ионов

Ca²⁺ до аминокислот и пептидов, и этот полимодальный рецептор регулирует многочисленные внутриклеточные процессы, включая ионный транспорт [13-15]. Ряд данных указывает на то, что CaSR, локализованный в пресинаптической мембране, может участвовать в регуляции синаптической передачи [16]. Учитывая эти данные, мы предположили, что CaSR может регулировать активность ПЗ Ca²⁺ каналов во вкусовых клетках типа III.

Используя выведенное нами ранее уравнение при определенных значениях параметров [17], нам удалось в целом удовлетворительно описать экспериментальную зависимость ПЗ тока от концентрации внеклеточного Ca²⁺. Таким образом, полученные экспериментальные данные и результаты моделирования свидетельствуют о том, что во вкусовых клетках типа III действительно существует CaSR-зависимый механизм, обеспечивающий инвариантность ПЗ Ca²⁺ токов в условиях, когда наружный Ca²⁺ варьирует в физиологическом диапазоне концентраций. Многое в этой проблеме требует своего разрешения в последующих экспериментах, и среди прочего важнейшим является анализ механизма регуляции активности ПЗ Ca²⁺ каналов при участии CaSR.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 16-34-00210 и 16-34-01068).

Список литературы / References:

1. Roper S.D. Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Semin Cell Dev. Biol.*, 2013, vol. 24, pp. 71–79.
2. Yee C.L., Yang R., Bottger B., Finger T.E., Kinnamon J.C. “Type III” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.*, 2001, vol. 440, pp. 97-108.
3. Clapp T.R., Medler K.F., Damak S., Margolskee R.F., Kinnamon S.C. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltagegated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol.*, 2006, vol. 4, p. 7.
4. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Electrical excitability of taste cells. Mechanisms and possible physiological significance. *Biomembrans*, 2012, vol. 22 (1-2), pp. 85-101.
5. Roper S.D. Cell communication in taste buds. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, vol. 63, pp. 1494-1500.
6. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J. Neurophysiol.*, 2003, vol. 90, pp. 3283-3294.
7. Kolesnikov S.S., Margolskee R.F. Extracellular K⁺ activates a K⁺ - and H⁺ -permeable conductance ion frog taste receptor cells. *J. Physiol.*, 1998, vol. 507, pp. 415-432.
8. Horn R., Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.*, 1988, vol. 92, pp. 145-159.
9. 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 J.*, 2007, vol. 26, pp. 657-667.
10. Hess P., Lansman J.B., Tsien R.W. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 1986, vol. 88, pp. 293-319.
11. Cens T., Rousset M., Leyris J.-P., Fesquet P., Charnet P. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca²⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2006, vol. 90, pp. 104-117.
12. Bystrova M.F., Romanov R., Rogachevskaja O.A., Churbanov G.D., Kolesnikov S.S. Functional expression of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in mouse taste cells. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 972-982.
13. Hofer A.M., Brown E.M. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, vol. 4, pp. 530-538.
14. Conigrave A.D., Ward D.T. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract. Res. Clin. Endocrin. Metab.*, 2013, vol. 27, pp. 315-331.
15. Chow J.Y.C., Estrema C., Orneles T., Dong X., Barrett K.E., Dong H. Calcium-sensing receptor modulates extracellular Ca²⁺ entry via TRPC-encoded receptor-operated channels in human aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. 461–468.
16. Phillips C.G., Harnett M.T., Chen W., Smith S.M. Calcium-sensing receptor activation depresses synaptic transmission. *J. Neurosci.*, 2008, vol. 28, pp. 12062–12070.
17. Cherkashin A.P., Zhao H., Kolesnikov S.S. Possible Mechanisms Mediating the Regulation of Voltage Gated Ca²⁺ Channels by Extracellular Ca²⁺. *Biomembrans*, 2015, vol. 32 (2), pp. 119-124.