

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.465

EX VIVO МОНИТОРИНГ СТИМУЛ-ЗАВИСИМОЙ СЕКРЕЦИИ АТР ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ

© 2021 г. А. А. Хохлов^а, О. А. Рогачевская^{а, *}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 28.12.2020 г.

Принята к публикации 12.01.2021 г.

Распознавание вкусовых молекул обеспечивается специализированными рецепторами, функционирующими на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, обращенной во вкусовую пору. Вкусовая трансдукция завершается кодированием сенсорной информации в форме стимул-зависимого выброса афферентного нейротрансмиттера, стимулирующего вкусовой нерв. Основным нейромедиатором периферической вкусовой системы является АТР. Синаптическая передача во вкусовых клетках типа II основана не на каноническом Ca^{2+} -зависимом экзоцитозном механизме секреции, а обеспечивается Ca^{2+} -независимым выбросом АТР через АТР-проницаемые ионные каналы базолатеральной мембраны. Этот процесс изучался на уровне одиночных клеток типа II, и был выявлен ряд закономерностей секреции АТР. Между тем, при исследовании стимул-зависимости выброса АТР 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 АТР вкусовыми клетками в условиях физиологически адекватной стимуляции нами разработан экспериментальный подход, основанный на использовании экспериментальной камеры, представляющей собой модификацию камеры Уссинга. Камера состояла из двух перфузируемых отсеков, между которыми зажимался и плотно 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-люциферазным смесью для детекции выброса АТР. Данный подход впервые позволил в режиме реального времени наблюдать выброс АТР вкусовыми клетками в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами, доступными только для апикальной мембраны.

Ключевые слова: вкусовой рецепторный эпителий, секреция АТР, люциферин-люциферазный метод

DOI: 10.31857/S023347552103004X

ВВЕДЕНИЕ

Вкусовые рецепторные клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, специализирующимися в распознавании горького, сладкого и аминокислот. 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 функцию рецепции вкусового стимула. Согласно современным представлениям [1], трансдукция вкусового сигнала во вкусовых клетках типа II включает следующие основные внутриклеточные события. При связывании молекул вкусовых веществ вкусовые

GPCR сопрягаются G-белком с фосфолипазой $\text{PLC}\beta 2$, которая катализирует гидролиз фосфолипида PIP_2 , производя два вторичных медиатора: растворимый IP_3 и липидный DAG. Далее IP_3 стимулирует выброс депонированного Ca^{2+} при участии IP_3 -рецептора (тип III). 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 АТР [1–4].

Внутриклеточный Ca^{2+} выступает в роли вторичного посредника при передаче сенсорного сиг-

нала и в других сенсорных клетках. Так, в нейронах вомероназального органа GPCR феромонов сопряжены с PLC β 2 (или PLC β 4), и в процессе трансдукции происходит IP $_3$ -зависимый выброс депонированного Ca $^{2+}$, ключевым является DAG-зависимый вход наружного Ca $^{2+}$ через DAG-активируемые катионные каналы TRPC2 [5]. Хотя в данном случае именно фосфоинозитидный каскад обеспечивает сопряжение рецепторов феромонов с клеточным ответом, как и во вкусовых клетках, считается, что во вкусовой трансдукции Ca $^{2+}$ -сигнализация обеспечивается за счет выброса депонированного Ca $^{2+}$ при пренебрежимо малом вкладе входа наружного Ca $^{2+}$ [1, 4]. Поскольку выделение индивидуальных вкусовых клеток сопряжено с достаточно жесткими ферментативными и механическими воздействиями, можно думать, что сохранение функциональности апикальной мембраны, включая функциональность Ca $^{2+}$ -проницаемых ионных каналов, не идентифицированных до настоящего времени, представляет собой одну из проблем физиологии вкусовых клеток. 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 для исследования секреции АТР использовалась камера Уссинга [6] для анализа секреции АТР 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 люминометре. Эта методика позволила статистически продемонстрировать рост выброса АТР 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 АТР в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вкусового эпителия языка мыши, содержащего желобоватый вкусовой сосочек, про-

водилось по стандартной методике [3]. Смесь ферментов (1.1 мг/мл коллагеназы Б, 1.2 мг/мл диспазы II, 0.2 мг/мл эластазы (Worthington, США), 0.5 мг/мл ингибитора трипсина (Sigma—Aldrich, США) в растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 10 KCl, 1 CaCl $_2$, 1 MgCl $_2$, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.8), инъецировалась под эпителий изолированного языка. Затем язык инкубировался 35 мин в бескальциевом растворе, содержащем (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0.7 CaCl $_2$, 1.1 MgCl $_2$, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4). После инкубации эпителий подрезался и отделялся от мышечной ткани. Участок эпителия языка с желобоватым сосочком помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl $_2$, 1 CaCl $_2$, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4), и затем крепился в камере Уссинга так, чтобы апикальная часть эпителия была обращена в верхний отсек камеры.

Мониторинг выброса АТР вкусовыми клетками осуществлялся в модифицированной камере Уссинга [6], которая состояла из двух перфузируемых отсеков, между которыми зажимался и плотно изолировался фрагмент языкового эпителия, содержащего желобоватый вкусовой сосочек. Раствор для перфузии апикальной стороны эпителия содержал (мМ): 50 NaCl, 20 KCl, 4 CaCl $_2$, 0.5 MgCl $_2$, 5 HEPES (pH 7.6) [8]. Нижняя ячейка заполнялась физиологическим раствором, содержащим 10 мкМ калиевой соли люциферина и 0.1 мкг/л рекомбинантной люциферазы (Sigma—Aldrich, США). Хемилюминесценция люциферин-люциферазной смеси регистрировалась микрофотометром Model 814 (PTI, США), работающим в режиме счета фотонов и подключенным к компьютеру через интерфейсный модуль BrightBox (PTI, США). Фотоотчеты регистрировались и анализировались с помощью программного обеспечения Felix32 (PTI, США). Полученные данные обрабатывались в программе SigmaPlot 11 (Systat Software, США).

Эксперименты проводились при комнатной температуре (23–25°C). Соли, HEPES и вкусовые стимулы приобретались у фирмы Sigma—Aldrich.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводились с использованием экспериментальной камеры, представляющей собой модификацию камеры Уссинга [6], которая широко использовалась, например, для измерения транспорта ионов, питательных веществ и лекарств через эпителиальные ткани [7], а также для анализа выброса гормонов тканями двенадцатиперстной кишки [8]. Разработанная нами камера монтировалась на микрофотометре и состояла из

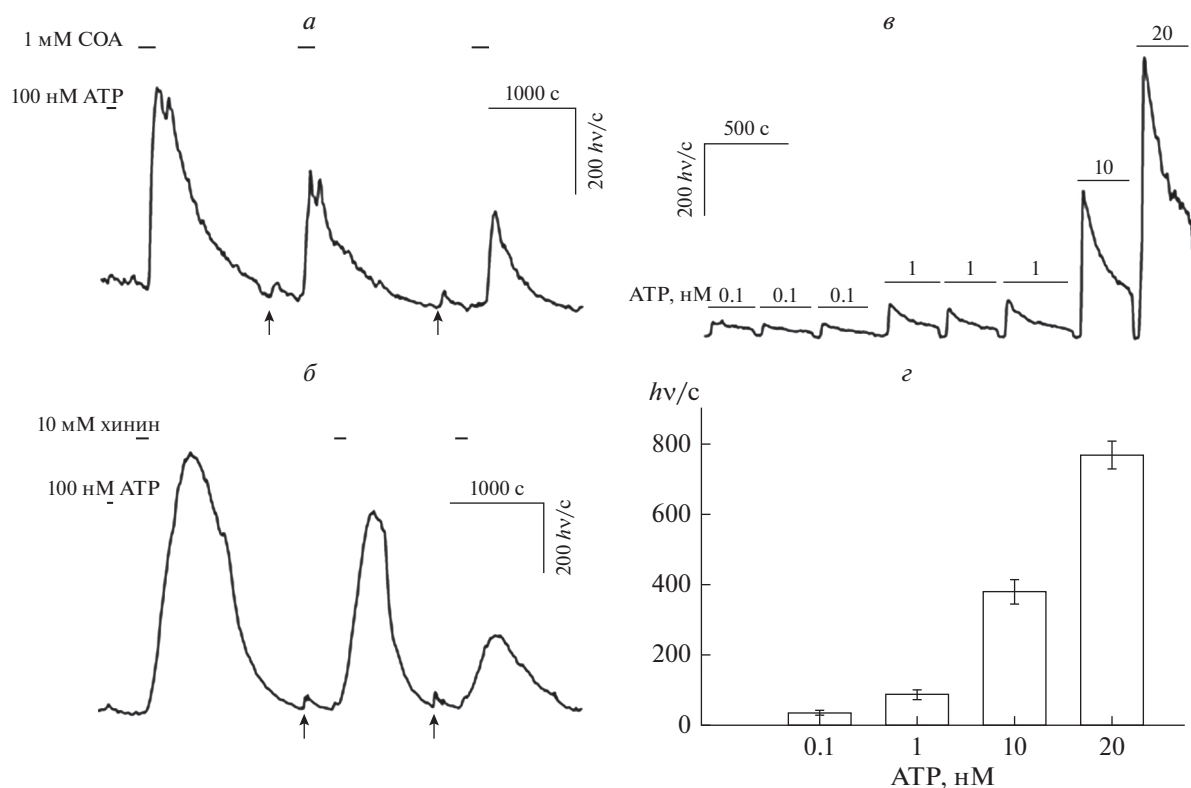


Рис. 1. Регистрация хемилюминесцентного сигнала люциферин-люциферазной смеси в нижнем отсеке камеры. *а, б* — On-line регистрация сигнала, обусловленного выбросом АТФ вкусовым эпителием при кратковременной аппликации на апикальную поверхность эпителия 1 мМ октаацетат сахарозы (СОА) (*а*) и 10 мМ гидрохлорида хинина (*б*). Время и продолжительность аппликаций указаны линиями над экспериментальной кривой, моменты замены смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры указаны стрелками под экспериментальной кривой. *в* — Регистрация хемилюминесцентного сигнала при подаче раствора люциферин-люциферазы с известными концентрациями АТФ; время и продолжительность подачи раствора люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры указаны линиями над экспериментальной кривой. *з* — Калибровочная диаграмма, отражающая средние пиковые значения уровня хемилюминесценции в нижнем отсеке.

двух независимо перфузируемых отсеков, между которыми плотно фиксировался эпителий. Наружная часть эпителия, а значит и апикальные участки мембран вкусовых клеток, была экспонирована в верхний отсек камеры. Перед началом регистрации в течение 30–40 мин производилась непрерывная перфузия обоих отсеков камеры апикальным и физиологическим растворами соответственно, для восстановления ткани после механических воздействий, связанных с закреплением ее между отсеками. После периода релаксации препарата, нижний отсек заполнялся люциферин-люциферазной смесью, что, как правило, позволяло наблюдать стабильную базальную хемилюминесценцию низкого уровня, видимо, вызванную спонтанным окислением люциферина. Конструкция камеры и система перфузии обеспечивала минимальное гидростатическое давление на эпителий и позволяла в процессе регистрации производить быструю, без гидравлического удара, смену раствора в верхнем отсеке над апикаль-

ной стороной эпителия. Это обеспечивало отсутствие артефактов, связанных с механическими возмущениями эпителия, которые могли вызывать выброс АТФ из эпителиальной ткани, и позволяло выполнять серию аппликаций на одном препарате. Для предотвращения паразитной засветки во время экспериментов камера с фотометром располагалась в светонепроницаемом боксе, установленном в затемненном помещении. В начале каждой регистрации герметичность камеры с закрепленным эпителием и целостность последнего проверялись краткой (15–20 с) 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 таких случаях эксперимент останавливался, и в камере монтировался новый вкусовой эпителий.

Поскольку в желобоватом вкусовом сосочке доминируют горько-чувствующие вкусовые клет-

ки, в описываемых экспериментах использовались вещества, вызывающие горький вкус, в частности — гидрохлорид хинина (10 мМ) и октаацетат сахарозы (1 мМ). Стимуляция эпителия проводилась путем кратковременной (30–50 с) смены контрольного раствора в верхнем отсеке камеры на раствор, содержащий горькое соединение в требуемой дозе. Аппликация вкусовых стимулов приводила к выбросу АТР эпителием и генерации хемилюминесцентного сигнала в нижнем отсеке камеры (рис. 1а, 1б). Интервал времени между подачей вкусового стимула и максимумом хемилюминесцентного ответа люциферин-люциферазной смеси составил 30–100 с. После восстановления базового уровня хемилюминесценции производилась смена смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры (стрелки на рис. 1а, 1б), чтобы при последующих регистрациях избежать падения амплитуды ответов вследствие снижения концентрации активных реагентов люциферин-люциферазной смеси.

Для количественной оценки эффективной концентрации АТР, выделенного эпителием при стимуляции, после завершения каждого эксперимента проводились калибровочные измерения. Для этого поочередно осуществлялась отмывка нижнего отсека физиологическим раствором с последующим заполнением раствором люциферин-люциферазы с известной концентрацией АТР (рис. 1в). По пиковым значениям уровня хемилюминесценции строилась калибровочная диаграмма как функция средней концентрации АТР в нижнем отсеке (рис. 1г). Согласно полученным при калибровочных измерениях результатам при данных условиях регистрации и составе люциферин-люциферазной смеси, минимальная регистрируемая средняя концентрация АТР составила приблизительно 0.1 нМ. Основываясь на калибровке (рис. 1г), эффективная концентрация АТР, достигавшаяся в нижнем отсеке камеры за счет секреции нуклеотида желобоватым сосочком в ответ на трехкратную вкусовую стимуляцию 10 мМ гидрохлорида хинина (рис. 1а) составила около 24, 14 и 3 нМ; и в случае 1 мМ октаацетата сахарозы (рис. 1б) — 15, 8, 3 нМ.

Разработанная нами методика мониторинга выброса АТР вкусовым эпителием путем регистрации хемилюминесценции в режиме реального времени с помощью модифицированной циркуляционной камеры Уссинга обеспечила достаточно высокую чувствительность регистрации, соответствующую эффективной концентрации АТР порядка 0.1 нМ (при соотношении сигнал/шум равном 1), и позволила регистрировать серию выбросов АТР одним препаратом, стимулируемым последовательной аппликацией кратковременных

горьких стимулов. Методика позволяла сохранять жизнеспособность вкусовой ткани и ее способность отвечать на горькие вещества в течение длительного (до 2 ч) эксперимента, хотя при этом наблюдалось постепенное снижение (рандаун) амплитуды ответов (рис. 1а, 1б), возможно, из-за истощения запаса АТР 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.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. — Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
2. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*. **310** (5753), 1495–1499.
3. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* **26** (3), 657–667.
4. Romanov R.A., Lasher R.S., High B., Savidge L.E., Lawson A., Rogachevskaja O.A., Zhao H., Rogachevsky V.V., Bystrova M.F., Churbanov G.D., Adameyko I., Harkany T., Yang R., Grahame J.K., Marambaud P., Kinnamon J.C., Kolesnikov S.S., Finger T.E. 2018. Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Sci. Signal.* **11** (529), pii: eaao1815.
5. Zufall F., Ukhanov K., Lucas P., Leinders-Zufall T. 2005. Neurobiology of TRPC2: From gene to behavior. *Pflügers Arch.* **451** (1), 61–71.
6. Ussing H.H., Zerahn K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.* **23**, 110–127.
7. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., Wu G. 2013. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. **18**, 1266–1274.
8. Geraedts M.C., Troost F.J., De Ridder R.J., Bodelier A.G., Masclee A.A., Saris W.H. 2012. Validation of Ussing chamber technology to study satiety hormone release from human duodenal specimens. *Obesity*. **20** (3), 678–682.
9. Shannon I.L., Suddick, R.P., Dowd Jr.F.J. 1974. Saliva: Composition and secretion. Monographs in oral science. Basel: Karger, **2**, p. 1–2.

***Ex Vivo* Monitoring of Stimulus-Dependent ATP Secretion by Taste Cells**

A. A. Khokhlov¹ and O. A. Rogachevskaja^{1, *}

¹*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com*

Recognition of taste molecules in the taste pore is performed by special receptors in the apical membrane of taste cells, which provide coding of sensory information in the form of a stimulus-dependent release of an afferent neurotransmitter that stimulates the taste nerve. The main neurotransmitter of the peripheral gustatory system is ATP. At the cellular level, it has been shown that stimulus-dependent ATP secretion by type II cells is a non-canonical Ca^{2+} -independent release through ATP-permeable ion channels located in the basolateral membrane. 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. We used a modernized Ussing chamber providing 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 allowed on-line recording of a series of ATP release by the taste epithelium in response to stimulation of the apical part of the epithelium with bitter taste substances.

Keywords: taste epithelium, ATP secretion, luciferin luciferase assay