

Посвящается памяти Л. М. Чайлахяна

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ K^+ , Na^+ И Cl^- И ПОТОКИ K^+ И Cl^- ПРИ АПОПТОЗЕ КЛЕТОК U937, ВЫЗВАННОМ СТАУРОСПОРИНОМ, К МЕХАНИЗМУ АПОПТОЗНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ КЛЕТОК

© В. Е. Юринская, Т. С. Горячая, А. А. Рубашкин, А. В. Широкова, А. А. Веренинов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: ¹ vereninov@mail.ru

Проведены пламенно-эмиссионные и радиоизотопные исследования распределения K^+ , Na^+ , Cl^- и потоков K^+ (Rb^+) и Cl^- при апоптозе клеток U937, вызванном стауропоорином (0.2 или 1 мкМ). Показано, что общее уменьшение содержания осмолитов, приводящее к дегидратации клеток, обусловлено на 2/3 уменьшением суммарного содержания моновалентных ионов и на 1/3 уменьшением содержания других осмолитов. Изменение суммарного содержания моновалентных ионов складывается из уменьшения содержания K^+ и Cl^- и увеличения содержания Na^+ . Показано, что скорость входа и выхода из клеток ^{22}Na , ^{36}Cl и Rb^+ существенно выше скорости изменения внутриклеточного содержания ионов при апоптозе. Это дает основание использовать для расчета ионного и водного баланса клетки при апоптозе уравнения баланса входных и выходных потоков. Судя по изменению убаин-чувствительного и убаин-резистентного компонентов входного потока $Rb^+(K^+)$, при апоптозе, вызванном у клеток U937 стауропоорином в концентрации 0.2 мкМ, наиболее существенное значение в перестройке ионного баланса имеет увеличение потока K^+ через каналы, а при апоптозе, вызванном 1 мкМ стауропоорином, — снижение активности Na^+/K^+ -насоса. Снижение стационарного уровня Cl^- в клетке при апоптозе в 1.4—1.8 раза сопровождается уменьшением стационарного обменного потока Cl^- в 1.2—1.6 раза.

Ключевые слова: апоптоз, ионные транспортеры, ионные каналы, потоки K^+ , Na^+ , Cl^- .

Принятые сокращения: ТХУ — трихлоруксусная кислота, Витм — буметанид, DIDS — 4, 4'-диизоциано-2, 2'-стильбен-дисульфоновая кислота, NPPV — 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота, STS — стауропоорин.

Программируемое разрушение клеток при апоптозе отличается от разрушения в результате неспецифического повреждения тем, что при апоптозе нет осмотического лизиса клетки. В регуляции водного баланса клетки при апоптозе, как и в нормальных условиях, первостепенную роль играют моновалентные ионы. Все исследователи сходятся на том, что при апоптозе снижается внутриклеточное содержание K^+ . Однако как соотносится снижение содержания K^+ со снижением содержания других осмолитов и воды, каковы механизмы перераспределения моновалентных ионов при апоптозе, исследовано недостаточно, хотя роль моновалентных ионов в регуляции апоптоза интересуют в настоящее время многих исследователей (Yu, 2003; Burg et al., 2006; Okada et al., 2006; Широкова, 2007; Bortner, Cidlowski, 2007; Lang et al., 2008; Hoffmann et al., 2009). Предыдущие наши работы были посвящены исследованию изменений при апоптозе распределения и потоков моновалентных катионов (Веренинов и др., 2004; Yurinskaya et al., 2005a, 2005b; Vereninov et al., 2007, 2008). В настоящей работе приводятся данные, полученные при исследовании потоков и распределения не только K^+ и Na^+ , но одновременно и Cl^- . Это позволило оценить изменение при апоптозе содержания как моновалентных ионов, так и других внутриклеточных осмолитов. Исследование потоков Cl^- и Rb^+ было необходимо для того,

чтобы получить базовые данные, позволяющие связать потоки всех главных моновалентных ионов, и путем анализа общего баланса потоков подойти к выяснению механизма перераспределения ионов при апоптозе. Расчет баланса потоков рассматривается в следующей статье (Рубашкин и др., 2010).

Материал и методика

Исследование проводили на двух сублиниях клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937: клетки U937-160B2 получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, а клетки U937-DSMZ — из Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ). Существенных различий между сублиниями по показателям, которые изучали в настоящей работе, не наблюдалось. Ранее было показано, что указанные клеточные сублинии различаются по величине потоков через Na^+/K^+ -насос (Vereninov et al., 2008). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы (HyClone Standard, США), при 37 °C и 5 % CO_2 . Плотность клеточной суспензии в экспериментах составляла $(1.0—1.5) \cdot 10^6$ кл./мл. Для индукции апоптоза в культу-

ральную среду вносили стауроспорин (STS; Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 0.2 или 1 мкМ и выдерживали 4–5 ч. Исходным был 0.2 мМ раствор STS в DMSO. Конечная концентрация DMSO не превышала 0.1–0.5 %. Для ингибиторного анализа ионных потоков использовали убаин (0.1 мМ), буметанид (0.05 мМ), DIDS (0.5 мМ) и NPPV (0.25 мМ) (Sigma-Aldrich, Германия).

Содержание внутриклеточной воды определяли по плавучей плотности клеток в градиенте Перколла. Градиент плотности готовили на основе 35–40%-ного Перколла (Pharmacia, Швеция), как описано ранее (Веренинов и др., 2004). Сгущенную суспензию клеток ($(3\text{--}5) \cdot 10^6$ клеток в 100–200 мкл) наслаивали на поверхность градиента Перколла и центрифугировали 10 мин при 400 g. Плавучую плотность клеток определяли по отношению к маркерам плотности (1.033, 1.049 и 1.062 г/мл, Sigma-Aldrich, Германия). Содержание воды на 1 г белка (v) рассчитывали по формуле $v = (1 - \rho/\rho_{\text{сух}})/[0.79(p - 1)]$, где ρ — плавучая плотность клеток, $\rho_{\text{сух}}$ — плотность сухой массы клетки. Плотность сухой массы клетки принимали равной 1.35 г/мл, а долю белка в сухой массе — равной 0.79. Использованный нами метод определения внутриклеточного содержания воды существенно чувствительнее распространенного метода, основанного на сопоставлении содержания в клеточном осадке маркеров, проникающих и не проникающих в клетку. Так, изменение внутриклеточного содержания воды на 10 % соответствует изменению плавучей плотности клеток на 0.005 г/мл и приводит к легко регистрируемому в наших условиях смещению клеток в пробирке на 1 см.

Для определения внутриклеточного содержания ионов клетки осаждали, промывали пятикратно 96 мМ раствором $MgCl_2$ без ресуспендирования и лизировали 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержание катионов в надосадочной жидкости определяли пламенно-эмиссионным методом на спектрофотометре Перкин-Элмер АА 306. Радиоактивность ^{36}Cl в ней измеряли в жидком сцинтилляторе на анализаторе Beckman LS 6500. Внутриклеточное содержание ионов Cl^- оценивали по распределению между клетками и средой изотопа ^{36}Cl . Осадок после удаления надосадочной жидкости растворяли в 0.1 н. NaOH и анализировали на содержание белка по методу Лоури. Содержание ионов рассчитывали в ммоль на 1 г клеточного белка.

Константы скорости обмена ионов между клеткой и средой определяли по кривым входа и выхода ионов. При измерении входных потоков Rb^+ и Li^+ в культуральную среду вносили RbCl (конечная концентрация 2.5 мМ) и LiCl (5 мМ). Время инкубации с Rb^+ в присутствии 0.1 мМ убаина или без него составляло 10 мин. Более длительная инкубация с убаином, как было показано ранее (Vereninov et al., 2007), приводит к значительному увеличению внутриклеточного содержания Na^+ . Кинетику входа Na^+ и Cl^- оценивали по поступлению в клетки изотопов ^{22}Na и ^{36}Cl . Для исследования кинетики выхода ионов клетки предварительно нагружали в течение 20 ч в среде RPMI, содержащей RbCl (1 мМ), и дополнительно 1.5 ч в среде с добавлением LiCl (5 мМ) и индикаторных количеств изотопов ^{36}Cl ($\approx 4.4 \cdot 10^3$ Бк/мл; Изотоп, Россия) и ^{22}Na . Работа с ^{22}Na описана ранее (Vereninov et al., 2007). Предполагалось, что вход и выход индикаторных количеств ионов между клеткой и средой подчиняются уравнениям простой экспоненциальной кинетики: $y(t) = y_{t \rightarrow \infty}(1 - \exp(-kt))$ для входа ионов и $y(t) = y_0 \exp(-kt)$ — для выхода, где $y(t)$ — содержание индикаторного иона в

момент времени t (5, 10, 20 мин), $y_{t \rightarrow \infty}$ и y_0 — соответственно конечное и исходное содержание иона, k — константа скорости в обоих уравнениях. Значения k находили как из уравнений кривых, представленных на рис. 2, так и усреднением значений, полученных расчетом для отдельных временных точек.

Результаты анализировали с помощью t -критерия Стьюдента, достоверность различий оценивали по значению $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Содержание осмолитов у клеток U937 в норме и при апоптозе. Поскольку у животных клеток нет жесткой оболочки, условием водного баланса является равенство суммарной внутриклеточной концентрации осмолитов их суммарной концентрации в среде. Отсюда следует, что по содержанию в клетке воды можно определить общее содержание в ней осмолитов, а если известно содержание K^+ , Na^+ , Cl^- , можно найти суммарное содержание остальных внутриклеточных осмолитов. К сожалению, существующие в настоящее время методы определения содержания внутриклеточной воды весьма несовершенны и точное значение получить трудно. Малочисленность работ, посвященных количественным оценкам связи между изменением содержания осмолитов и содержания воды при апоптозе, обусловлено именно трудностями в точном определении внутриклеточного содержания воды. В настоящей работе был применен наиболее чувствительный метод, основанный на определении плавучей плотности клеток в градиенте Перколла. Исследование изменения содержания воды в клетках при апоптозе данным методом и радиоизотопным давало сходные результаты (Vereninov et al., 2008).

В табл. 1 представлены данные, характеризующие внутриклеточное содержание осмолитов у клеток U937-160B2 в норме и при апоптозе, вызванном STS (0.2 или 1 мкМ), а на рис. 1 показано изменение основных групп внутриклеточных осмолитов при апоптозе. Уменьшение содержания осмолитов при апоптозе, вызванном при концентрации STS 0.2 или 1 мкМ, составляет соответственно 0.2 и 0.3 ммоль/г (дегидратация соответственно на 11.3 и 17.6 %). Оно складывалось из суммарной потери K^+ , Cl^- (0.14 и 0.27 ммоль/г для STS 0.2 и 1 мкМ соответственно), уменьшения содержания «остальных» осмолитов (0.07 и 0.1 ммоль/г) и противоположно направленного увеличения содержания Na^+ (0.01 и 0.07 ммоль/г). Потеря электрического заряда, связанная с уменьшением содержания Na^+ и K^+ , компенсировалась снижением содержания Cl^- практически полностью. Таким образом, общее уменьшение содержания осмолитов при апоптозе, вызванном 0.2, и 1 мкМ STS, на 2/3 было обусловлено изменением содержания моновалентных ионов и на 1/3 уменьшением содержания других осмолитов. Хотя указания на изменение при апоптозе транспорта неэлектролитов, в частности таурина, достаточно многочисленны (см. обзоры: Lang et al., 2008; Hoffmann et al., 2009), комплексные исследования изменения при апоптозе внутриклеточного содержания воды, K^+ , Na^+ , Cl^- и других внутриклеточных осмолитов были приняты только в недавней работе датских исследователей (Poulsen et al., 2010).

Одновременное определение содержания ионов и воды, позволяющее оценить изменение концентрации

Таблица 1

Водный и ионный баланс у клеток U937 в норме и при апоптозе, вызванном стауроспорином (STS, 0.2 или 1 мкМ)

Показатель	Норма	STS, 0.2 мкМ	Норма	STS, 1 мкМ
Плотность клетки, г/мл	1.046—1.055	1.052—1.059	1.048—1.055	1.055—1.064
Содержание воды, мл/г	5.64 ± 0.12 (8)	5.00 ± 0.07 (8)	5.52 ± 0.13 (4)	4.55 ± 0.06 (4)
Дегидратация, %		-11.3		-17.6
Cl _i ⁻ , ммоль/г	0.23 ± 0.01 (32)	0.16 ± 0.01 (28)	0.23 ± 0.01 (14)	0.13 ± 0.01 (14)
K _i ⁺ , ммоль/г	0.59 ± 0.01 (34)	0.51 ± 0.01 (28)	0.70 ± 0.03 (16)	0.53 ± 0.02 (16)
Na _i ⁺ , ммоль/г	0.14 ± 0.01 (34)	0.15 ± 0.01 (28)	0.21 ± 0.01 (16)	0.28 ± 0.01 (16)
Всего осмолитов, ммоль/г	1.75	1.55	1.71	1.41
Na _i ⁺ + K _i ⁺ + Cl _i ⁻ , ммоль/г	0.95	0.82	1.14	0.94
Остальные	0.80	0.73	0.57	0.47
[Na ⁺] _i , мМ	24.50	30.2	38.60	62.00
[K ⁺] _i , мМ	104.00	102.00	126.00	116.00
[Cl ⁻] _i , мМ	40.00	32.00	41.00	29.00
k _{Cl} , мин ⁻¹	0.19 ± 0.03 (5)	0.17 ± 0.02 (8)	0.14 ± 0.01 (8)	0.21 ± 0.01 (18)
I _{Rb}	1.71 ± 0.07 (31)	1.87 ± 0.10 (28)	1.88 ± 0.08 (23)	1.04 ± 0.07 (23)
I _{Rb} ^G	0.27 ± 0.01 (31)	0.44 ± 0.03 (28)	0.30 ± 0.02 (23)	0.33 ± 0.01 (23)
Нетто-потоки	K ⁺	-0.32		-0.70
	Na ⁺	+0.054		+0.29
	Cl ⁻	-0.28		-0.40
Полные обменные стационарные потоки	I _{Cl}	43.00	27.00	33.00
	I _K	4.00	4.30	4.40
Парциальные потоки	I _K ^P	3.30	3.30	3.70
	I _K ^G	0.00	1.00	0.70

Примечание. I_{Rb}, I_K — полные потоки Rb⁺ и K⁺, I_{Rb}^G, I_K^G — убаин-резистентные компоненты входных потоков Rb⁺ и K⁺, I_K^P — поток K⁺, ингибируемый 0.1 мМ убаином (насос). Все потоки выражены в ммоль на 1 г белка за 1 мин. Потоки K⁺ получены умножением потоков Rb⁺ на соотношение концентраций K⁺ и Rb⁺ в среде (5.8 и 2.5 мМ соответственно). Значения констант скорости обмена Cl⁻ в опытах с 0.2 мкМ STS получены по кривым входа ³⁶Cl, аналогичным кривым на рис. 2, а, в опытах с 1 мкМ STS — по кривым выхода ³⁶Cl из клеток (рис. 2, б). Полный обменный поток ионов Cl⁻ получен умножением внутриклеточного содержания Cl⁻ на константу скорости обмена k_{Cl}. При расчете общего содержания осмолитов в клетке принято, что среда содержит осмолиты в концентрации 310 мосмоль/л. «Остальные» внутриклеточные осмолиты вычислены как разность между общим содержанием и содержанием K⁺, Na⁺ и Cl⁻. Нетто-потоки ионов вычислены при допущении линейного изменения содержания ионов в клетках при апоптозе за 4 ч. Приведены средние значения и их стандартные ошибки, в скобках — число определений.

ионов, показало, что изменения концентрации K⁺ и Cl⁻ во внутриклеточной воде весьма невелики. Вряд ли они могут влиять на состояние регулятора апоптоза вроде каспаз, как это предполагают некоторые исследователи (Hughes et al., 1997). Роль K⁺ и Cl⁻ в регуляции апоптоза в свете полученных нами данных нельзя связывать с изменением концентрации этих ионов в цитоплазме. I_K^G

Изменение потоков моновалентных ионов при апоптозе. Изменение потоков ²²Na, Li⁺ и Rb⁺ при апоптозе, вызванном STS, было исследовано и описано нами ранее (Vereninov et al., 2007). В настоящей работе пламенно-эмиссионные определения внутриклеточного содержания моновалентных катионов у клеток U937 были совмещены с измерениями содержания и потоков ³⁶Cl. На рис. 2 приведены кривые входа и выхода ³⁶Cl, ²²Na, Li⁺ и Rb⁺, который является хорошим физиологическим аналогом K⁺ и движение которого отражает движение K⁺. У пролиферирующих клеток скорость установления стационарного распределения K⁺, Na⁺ и Cl⁻ между цитоплазмой и средой как в норме, так и при апоптозе во много раз выше, чем у клеток, служивших объектом в классических исследованиях транспорта ионов через клеточную мемб-

рану, таких как эритроциты, скелетные мышечные волокна и аксоны головоногих моллюсков (Веренинов, Марахова, 1986). У пролиферирующих клеток U937 за 1 мин обменивается около 15 % внутриклеточного Cl⁻, до 40 % — Na⁺, 5 % — Li⁺ и около 1 % — Rb⁺ (K⁺) (табл. 2). Обменные потоки у клеток U937-160B2 составляют по Cl⁻ 30—40, по K⁺ ≈4 и по Na⁺ ≈50—75 ммоль/г·мин (табл. 1).

Как при апоптозе соотносятся обменные потоки со скоростью изменения содержания ионов, т. е. с нетто-потоками? Нетто-потоки K⁺, Na⁺, Cl⁻ в рассматриваемых опытах имели величину, приведенную в табл. 1. Нетрудно видеть, что они в несколько раз меньше обменных потоков. Следует еще учитывать, что основные изменения содержания ионов происходят вначале (рис. 3, а, б). В интервале 3—5 ч нетто-потоки еще меньше по сравнению с обменными потоками соответствующих ионов-меток. Отсюда следует, что распределение K⁺, Na⁺, Cl⁻ и измеренные обменные потоки, по крайней мере в интервале 3—5 ч, можно считать квазистационарными. Разумеется, физиологическое состояние клетки в целом не стационарно. Апоптоз развивается. Об этом свидетельствует, в ча-

Таблица 2

Константа обмена (k), полученная аппроксимацией кривых входа и выхода ионов у клеток U937 экспоненциальными уравнениями

Ион	Значения k , мин ⁻¹	
	вход $y = 1 - \exp(-kt)$	выход $y = \exp(-kt)$
^{36}Cl	0.158 ± 0.004	0.151 ± 0.003
^{22}Na	0.372 ± 0.033	
Li^+	0.048 ± 0.007	0.045 ± 0.002
Rb^+	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001

Примечание. Константы приведены со стандартными ошибками аппроксимации.

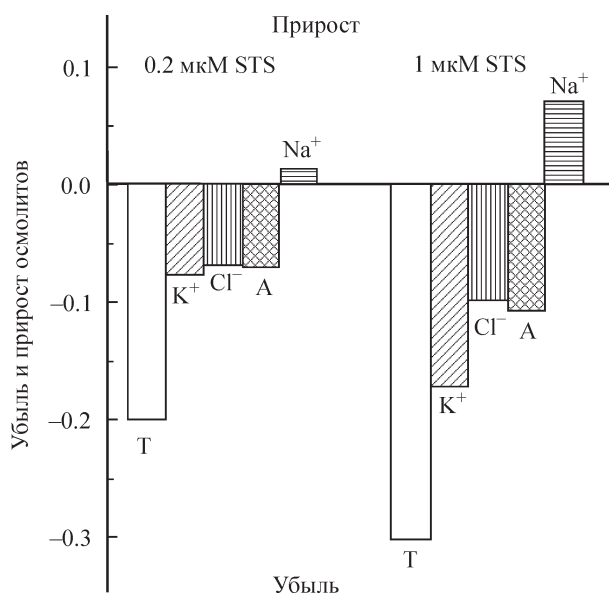


Рис. 1. Изменение содержания осмолитов у клеток U937-160B2 при апоптозе, вызванном STS в разной концентрации.

T — суммарное содержание осмолитов ($K^+ + Na^+ + Cl^- + A^-$) в клетке. A⁻ — «остальные» осмолиты (см. примечание к табл. 1). Изменение содержания осмолитов выражено в ммоль на 1 г белка.

стности, изменение во времени потоков Rb^+ , показанное на рис. 3, в, г. Существенно, однако, что в каждый данный момент входной поток каждого из ионов (K^+ , Na^+ , Cl^-) можно считать практически равным выходному. Имеет место то, что можно назвать «дрейфом» сбалансированного распределения ионов. С этой точки зрения механизм перераспределения моновалентных ионов при апоптозе ранее, как это ни странно, не рассматривали. Между тем это положение представляется важным, так как позволяет при анализе системы использовать уравнения баланса входного и выходного потоков для каждого из ионов (K^+ , Na^+ , Cl^-). Математическая модель перераспределения при апоптозе парциальных потоков моновалентных ионов рассматривается в следующей работе (Рубашкин и др., 2010). Некоторые выводы относительно природы наб-

людаемых при апоптозе изменений потоков K^+ (Rb^+) и Cl^- могут быть сделаны и на основании представленных данных.

Входной поток $K^+(Rb^+)$ через насос (I_K^p , табл. 1) при апоптозе, вызванном 1 мкМ STS, когда дегидратация составляет около 18 %, уменьшается в 2.3 раза, тогда как не ингибируемый уабаином компонент увеличивается всего лишь примерно на 10 %. При апоптозе тех же клеток, вызванном 0.2 мкМ STS, при котором наблюдается менее значительная дегидратация, поток $K^+(Rb^+)$ через насос не изменяется, а уабаин-резистентный компонент увеличивается. Отсюда следует, что в зависимости от концентрации STS перераспределение ионов в одном случае сопряжено со снижением активности насоса, а в другом — с изменением других трактов. В других опытах было обнаружено, что разное изменение трактов определяется не только концентрацией STS, но и особенностями клеток (Vereninov, 2008).

Радиоизотопных измерений потоков Cl^- при апоптозе до сих пор не проводилось. Представление о том, что в апоптозном сокращении объема клеток важную роль играет изменение потока Cl^- через каналы, основано на электрофизиологических исследованиях. Данные, полученные в настоящей работе, показали, что стационарное распределение ^{36}Cl устанавливается с постоянной времени около 5—7 мин как в норме, так и при апоптозе. Ста-

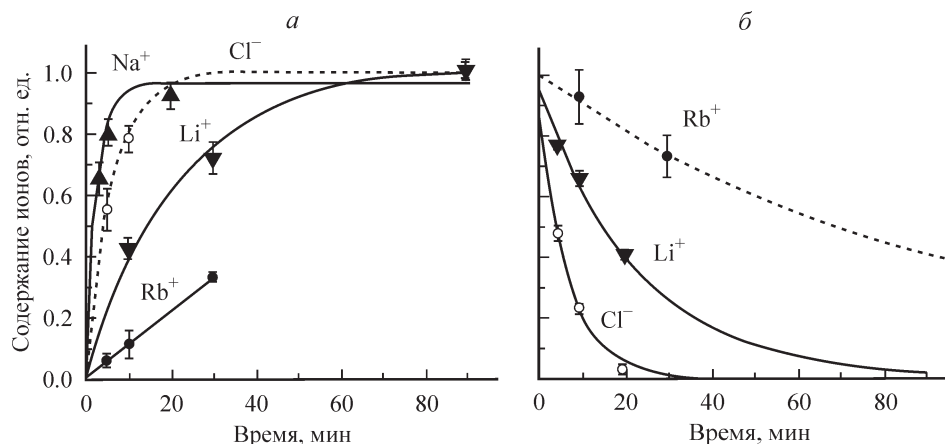


Рис. 2. Кинетика входа (а) и выхода (б) $^{36}Cl, ^{22}Na, Li^+$ и Rb^+ у клеток U937 в норме.

Клетки инкубировали в среде RPMI с добавлением индикаторных количеств изотопов $^{36}Cl, ^{22}Na, 5 \text{ mM } LiCl$ и $2.5 \text{ mM } RbCl$. Каждая точка — среднее значение, полученное в 3—4 экспериментах с 2—3 параллельными пробами в каждом, и стандартная ошибка. Параметры кривых со стандартными ошибками аппроксимации приведены в табл. 2. Кривые входа ^{36}Cl (а) и выхода Rb^+ (б) получены для сублинии клеток DSMZ, остальные — для сублинии 160B2.

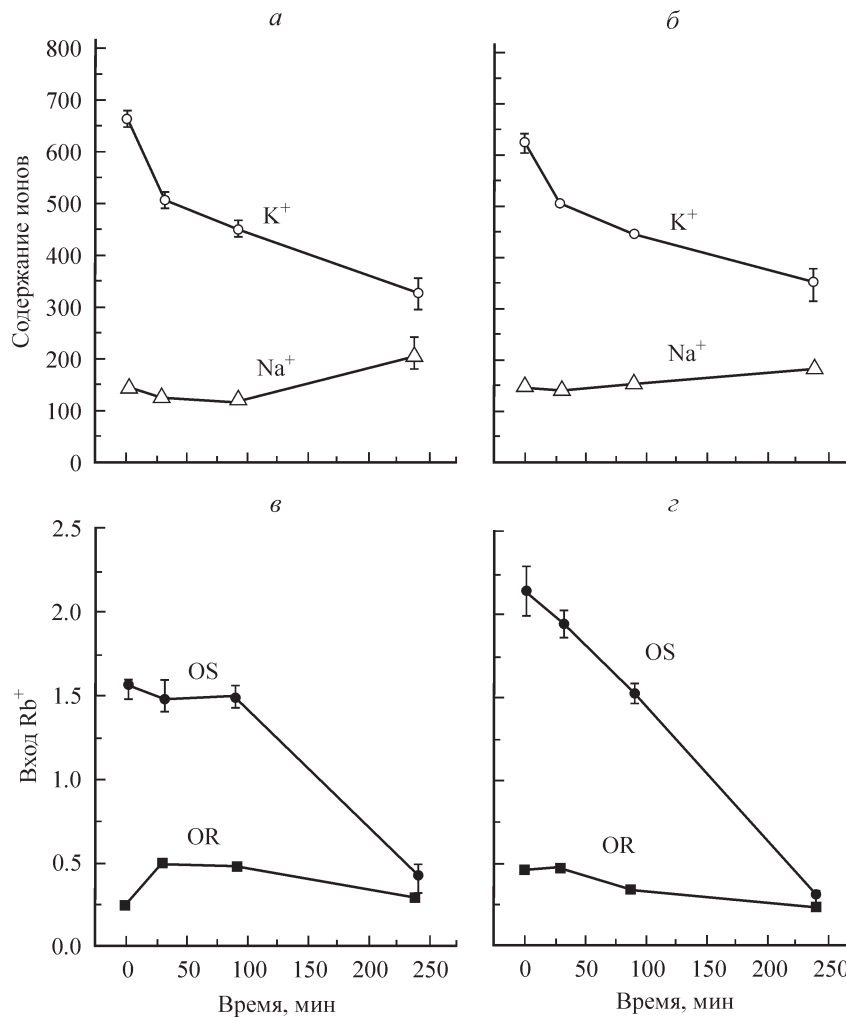


Рис. 3. Зависимость внутриклеточного содержания ионов K^+ и Na^+ (а, б) и входных потоков Rb^+ (в, г) от времени культивирования клеток U937 с STS (1 мкМ).

2.5 мМ RbCl вносили в инкубационную среду на 10 мин. OS — ингибируемый убаином (0.1 мМ) компонент входного потока Rb^+ , OR — убаин-резистентный компонент. а, в — сублиния U937-160B2; б, г — сублиния U937-DSMZ. Представлены результаты 3 экспериментов при 3 параллельных пробах в каждом ($n = 9$). Содержание ионов выражено в мкмоль на 1 г белка, вход Rb^+ — в мкмоль на 1 г белка за 1 мин.

ционарный уровень Cl^- в клетке при апоптозе ниже, чем в норме, в 1.4 или в 1.8 раза в зависимости от того, вызван апоптоз 0.2 или 1 мкМ STS. Величина стационарного об-

менного потока Cl^- тоже снижается в 1.2—1.6 раза. Константа скорости обмена Cl^- при апоптозе, вызванном 1 мкМ STS, возрастает в 1.5 раза.

Действие известных ингибиторов котранспорта и хлорных каналов (буметанида, DIDS и NPPB) на константу скорости обмена Cl^- показано на рис. 4. По электрофизиологическим данным, NPPB блокирует Cl^- -каналы, а DIDS может блокировать как Cl^- -каналы, так и разного рода переносчики, в частности обменник Cl^-/HCO_3^- . У исследованных нами клеток DIDS снижал константу скорости обмена Cl^- в 1.5 раза, а NPPB — вдвое. При совместном внесении DIDS и NPPB в культуральную среду действие ингибиторов не усиливалось (рис. 4, D + N). Отсюда можно заключить, что оба ингибитора блокируют одни и те же пути переноса Cl^- . Буметанид практически не изменял поток Cl^- у исследованных клеток. Если котранспортер NKCC и участвует в переносе Cl^- , то его

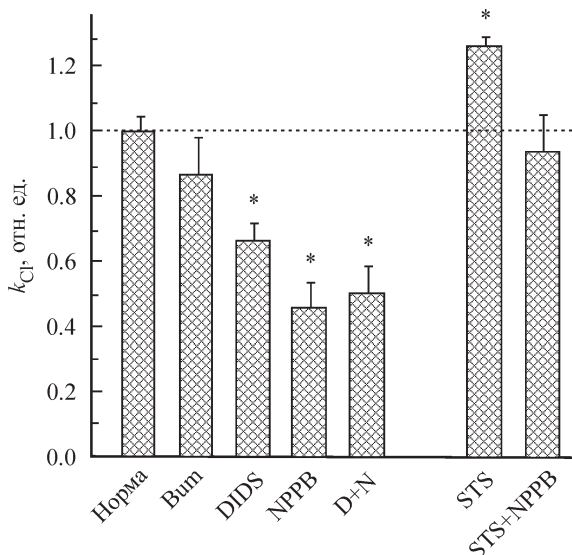


Рис. 4. Влияние буметанида, DIDS и NPPB на константу (k) обмена ионов Cl^- в клетках U937-DSMZ.

Ингибиторы вносили в культуральную среду за 20 мин до внесения $^{36}Cl^-$. Звездочкой отмечено достоверное отличие от контроля. D + N — одновременное внесение DIDS и NPPB.

доля мала и не может быть определена по эффекту блокирования буметанидом. Рассматривая приведенные выше данные, невозможно ответить на вопрос о том, сопряжены ли изменения ионного и водного баланса при апоптозе с изменением Cl^- -каналов или в системе котранспорта Cl^- . Возможность получить ответ на этот вопрос путем математического моделирования ионного баланса рассматривается в следующей статье (Рубашкин и др., 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00301а) и того же фонда совместно с Германией (фонд DFG, проект 436 RUS 113/488/0-2R и РФФИ 06-04-04000).

Список литературы

- Веренинов А. А., Горячая Т. С., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Сакута Г. А., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2004. Дегидратационное сокращение объема клеток при апоптозе — факультативный признак. Цитология. 46 (7) : 609—619.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. 1986. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука. 292 с.
- Рубашкин А. А., Юринская В. Е., Веренинов А. А. 2010. Расчет потоков K^+ , Na^+ , Cl^- через плазматическую мембрану животной клетки с Na^+/K^+ -насосом, котранспортерами НКСС и NC и ионными каналами с учетом негольдмановского выпрямления в K^+ -каналах. Норма и апоптоз. Цитология. 52 (7) : 568—573.
- Широкова А. В. 2007. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. Цитология. 49 (5) : 385—394.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 462 : 176—188.
- Burg E. D., Remillard C. V., Yuan J. X. 2006. K^+ channels in apoptosis. J. Membr. Biol. 209 : 3—20.
- Hoffmann E. K., Lambert I. H., Pedersen S. F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol. Rev. 89 : 193—277.
- Hughes F. M., jr., Bortner C. D., Purdy G. D., Cidlowski J. A. 1997. Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. J. Biol. Chem. 272 : 30 567—30 576.
- Lang F., Gulbins E., Szabo I., Vereninov A., Huber S. M. 2008. Ion channels, cell volume, cell proliferation and apoptotic cell death. In: Sensing with ion channels. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 69—84.
- Okada Y., Shimizu T., Maeno E., Tanabe S., Wang X., Takahashi N. 2006. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. J. Membr. Biol. 209 : 21—29.
- Poulsen K. A., Andersen E. C., Hansen C. F., Klausen T. K., Hougaard C., Lambert I. H., Hoffmann E. K. 2010. Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug resistant tumor cells: role of chloride channels. Amer. J. Physiol. 298 : C14—C25.
- Vereninov A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Vassilieva I. O., Yurinskaya V. E., Lang F., Rubashkin A. A. 2007. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. Cell Biol. Int. 31 : 382—393.
- Vereninov A. A., Rubashkin A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Strelkova E. G., Lang F., Yurinskaya V. E. 2008. Pump and channel $K^+(Rb^+)$ fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937. Cell Physiol. Biochem. 22 : 187—194.
- Yu S. P. 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. Prog. Neurobiol. 70 : 363—386.
- Yurinskaya V., Goryachaya T., Guzhova I., Moshkov A., Rozanov Y., Sakuta G., Shirokova A., Shumilina E., Vassilieva I., Lang F., Vereninov A. 2005a. Potassium and sodium balance in U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. Cell. Physiol. Biochem. 16 : 155—162.
- Yurinskaya V. E., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Vassilieva I. O., Shumilina E. V., Lang F., Volgareva E. V., Vereninov A. A. 2005b. Thymocyte K^+ , Na^+ and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. Cell. Physiol. Biochem. 16 : 15—22.

Поступила 10 XII 2010

CHANGES IN K^+ , Na^+ AND Cl^- CONTENTS AND K^+ AND Cl^- FLUXES DURING APOPTOSIS OF U937 CELLS BY STAUROSPORINE. ON THE MECHANISM OF CELL DEHYDRATION IN APOPTOSIS

V. E. Yurinskaya, T. S. Goryachaya, A. A. Rubashkin, A. V. Shirokova, A. A. Vereninov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: verenino@mail.ru

K^+ , Na^+ and Cl^- balance and K^+ (Rb^+) and ^{36}Cl fluxes in during apoptosis of U937 cells caused by 0.2 or 1 μM staurosporine were studied by flame emission and radiotracer techniques. It is found that monovalent ion redistribution accounts for 2/3 of all decrease in the amount of intracellular osmolytes in apoptotic cells while 1/3 is due to the loss of other intracellular osmolytes. Na^+ gain in apoptotic cells hampers dehydration is caused by K^+ and Cl^- loss. It is found that the rate of equilibration of ^{36}Cl , Rb^+ (K^+) and $^{22}Na^+$ between cells and the medium exceeds significantly the rate of alteration of cell ion content associated with apoptosis. It is concluded that apoptotic changes should be considered as a drift of the balanced ion distribution. Alteration of the ion balance in apoptosis, caused by 0.2 μM staurosporine, is associated with an increase in the uabain-resistant Rb^+ (K^+) «channel» influx and insignificant alteration of the uabain-sensitive «pump» influx. Stronger apoptosis, induced by 1 μM staurosporine, is associated with a decrease in the pump fluxes and insignificant changes in the «channel» Rb^+ (K^+) fluxes. Decreasing of the Cl^- level in apoptotic cells by a factor 1.4—1.8 is accompanied with a decrease in the flux, by a factor 1.2—1.6.

Key words: cell ion balance, apoptosis, ion transporters, monovalent ion fluxes, cell Cl^- .