

**ПРИБОРЫ, ИЗГОТОВЛЕННЫЕ
В ЛАБОРАТОРИЯХ**

УДК 577.35

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА
EX VIVO СТИМУЛ-ЗАВИСИМОЙ СЕКРЕЦИИ
АТФ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ТКАНЯМИ**

© 2023 г. А. А. Хохлов, О. А. Рогачевская, С. С. Колесников

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

После доработки 10.11.2022 г.

Принята к публикации 11.11.2022 г.

DOI: 10.31857/S0032816223020210, EDN: GTJTVR

Аденозинтрифосфат (АТФ) – один из основных нейротрансмиттеров периферической вкусовой системы [1, 2]. Для оценки количества высвободившегося АТФ на уровне биологических тканей традиционно используется классический хемилюминесцентный метод с люциферин-люциферазным комплексом [3]. Этот метод, благодаря высокой чувствительности, позволяет определить пикомолярные количества диффузного АТФ в общем объеме раствора [1] с помощью люминометра, но не отражает динамический поток АТФ в реальном времени.

Нами разработана экспериментальная установка с использованием камеры Уссинга, позволяющая осуществлять стимуляцию вкусовыми веществами апикальной части вкусовой ткани языкового эпителия и проводить непрерывный online мониторинг уровня АТФ, высвобождаемого тканью, с использованием люциферин-люциферазного метода.

Экспериментальная камера представляет собой модификацию камеры Уссинга [4], широко используемой для измерения транспорта ионов, питательных веществ и лекарств через эпителиальные ткани [5], а также анализа выброса гормонов [6]. Камера (рис. 1) состоит из двух частей – верхней 3 и нижней 2, изготовлена из технического органического стекла (ГОСТ 17622-72), прозрачные окна 4, 5 камеры выполнены из покровных стекол Menzel-Glaser № 1 (0.17 мм). Фрагмент вкусового эпителия 7 мыши размещается апикальной поверхностью вверх на тонкой (0.1 мм) пластиковой подложке 6 с отверстием диаметром 0.6 мм и герметично фиксируется с помощью силиконового колцевового уплотнителя 8 между перфузируемыми отсеками верхней и нижней частей камеры. Перфузионные растворы подаются в перфузионные отсеки через воронки, избыток растворов из отсеков перетекает в полости для откачки и оттуда отбирается трубками-отсосами, соединенными

ми через буферный сосуд с пластинчато-роторным вакуумным насосом (на рис. 1 не показаны). Уровень растворов в отсеках камеры регулируется погружением трубок-отсосов 10 и поддерживается в верхней части на 1.0–1.5 мм выше, чем в нижней, что обеспечивает минимальное гидростатическое давление на эпителий в покое. Использование воронки сглаживает колебания уровня растворов при их подаче/смене, благодаря чему удается избежать артефактов, связанных с механическим воздействием на эпителий, приводящим к неспецифическому выбросу АТФ, и позволяет осуществлять последовательную серию аппликаций растворов на апикальную поверхность эпителия на одном препарате при сохранении его жизнеспособности в камере до 1.5–2 ч. Камера также позволяет апплицировать вкусовые соединения только на апикальную (рецепторную) поверхность эпителия, что дает возможность избежать неспецифических эффектов этих соединений, наблюдавшихся в экспериментах на изолированных одиночных вкусовых клетках и вкусовых почках [7].

Камера с установленным в нее эпителием крепилась винтовыми зажимами на основании 13 вплотную к фронтальной поверхности стеклянной линзы 12 (стекло К8, фокусное расстояние 4 мм, числовая апертура в воздухе 0.8), которая направляла излучение хемилюминесценции из камеры на катод фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) 15 микрофотометра РТ1 814 (РТ1, США). Микрофотометр монтировался под основанием внутри магнитного экрана 14. Такая конструкция гарантировала жесткую фиксацию окна камеры относительно линзы и фотокатода, линза обеспечивала высокий светосбор, а экран исключал влияние внешних электрических и магнитных полей на ФЭУ. Камера, закрепленная на основании, дополнительно закрывалась во время регистрации светонепроницаемым колпаком (не показан) для предотвращения паразитной засветки. Вся экспе-

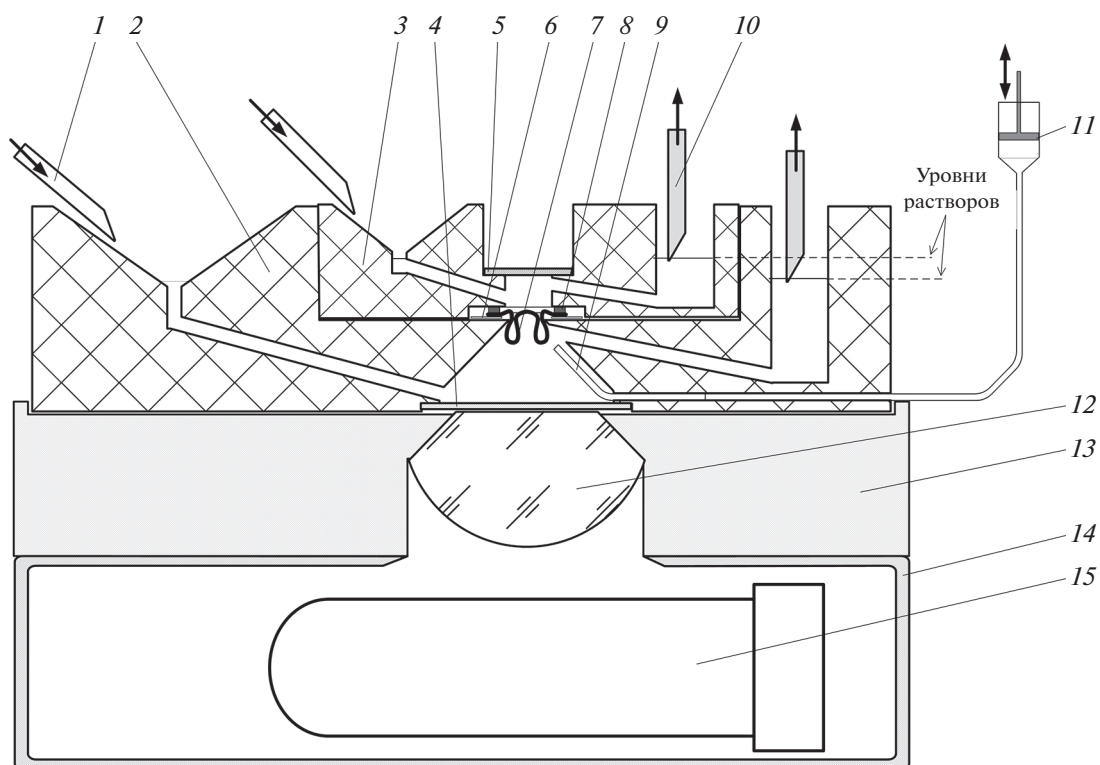


Рис. 1. Схема камеры. 1 – трубка подачи; 2 – нижняя часть камеры; 3 – верхняя часть камеры; 4 – нижнее окно; 5 – верхнее окно; 6 – пластиковая подложка; 7 – фрагмент эпителия; 8 – силиконовый уплотнитель; 9 – капилляр; 10 – трубка откачки; 11 – поршневой насос; 12 – линза; 13 – основание; 14 – экран фотометра; 15 – ФЭУ.

риментальная установка, включающая камеру, насос, сосуды для подачи растворов и буферный сосуд для отбора, располагалась в светонепроницаемом боксе, температура в котором поддерживалась на постоянном уровне ($23\text{--}24^\circ\text{C}$). Микрофотометр использовался в режиме счета фотонов, что обеспечивало большую чувствительность и стабильность работы по сравнению с режимом регистрации фототока. Сигнал микрофотометра через интерфейсный модуль BrightBox (РТИ, США) с помощью программного обеспечения Felix32 (РТИ, США) в реальном времени передавался на персональный компьютер. В качестве приемника использовался ФЭУ R1527P (Hamamatsu Photonics, Япония) со щелочным катодом (квантовый выход 10% в спектральной области $525\text{--}565\text{ нм}$, соответствующей максимальной интенсивности излучения хемилюминесценции используемых реагентов) [8]. Напряжение питания устанавливалось в диапазоне $1050\text{--}1100\text{ В}$ (вблизи высоковольтной границы плато по типовой счетной характеристике сигнальных импульсов), это обеспечивало умножение с коэффициентом более $6 \cdot 10^6$ и темновой шум на уровне ниже 15 с^{-1} по типовой счетной характеристике темновых импульсов (при длине волны 450 нм и температуре $+25^\circ\text{C}$). При напря-

жении питания 1100 В и времени накопления $0.5\text{--}1.0\text{ с}$ измеренный общий шум системы регистрации составил $15 \pm 6\text{ с}^{-1}$ (среднее, стандартное отклонение), т.е. в основном определялся темновым шумом ФЭУ. При подобранной концентрации люциферазы [9] и измеренном общем шуме системы чувствительность регистрации хемилюминесценции составляла около $1.11 \cdot 10^{-10}\text{ моль/л}$ [10], это позволило детектировать (при соотношении сигнал/шум не хуже 10) концентрацию АТФ в камере на уровне 1 нмоль/л , что априорно соответствует высвобождению АТФ примерно десятью вкусовыми клетками в ткани [11].

Вклад АТФ, выделенного тканью в покое и не связанного с реакцией на вкусовую стимуляцию, компенсировался в процессе дальнейшей обработки результатов регистраций путем вычитания средней базовой линии (рис. 2а). Поскольку абсолютная величина регистрируемого при помощи люциферин-люциферазной системы потока хемилюминесценции критически зависит от состояния используемых реагентов [3], состояния животного, степени ферментной обработки ткани при выделении, активности эктоАТФаз (гидролизующих АТФ в ткани) и, возможно, ряда других факторов, вклад которых учесть численно

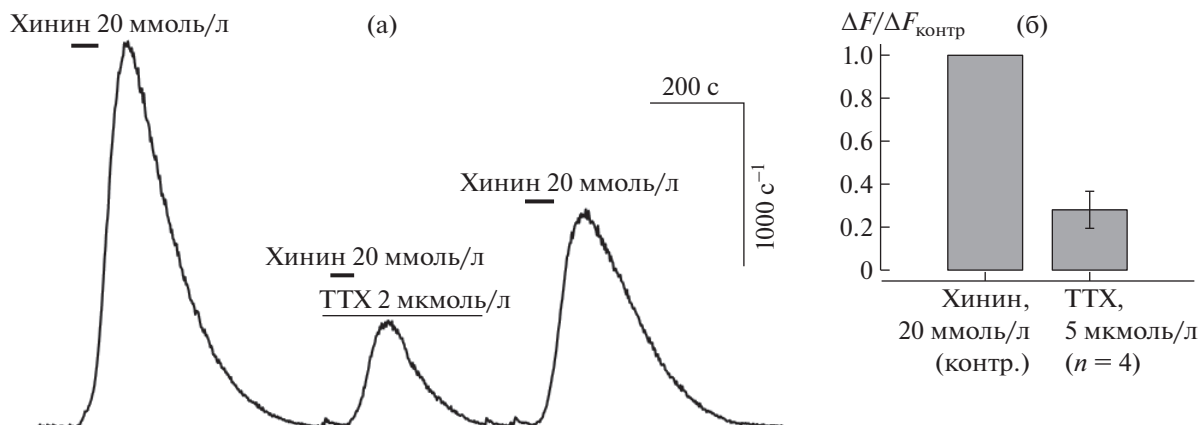


Рис. 2. Регистрация потока хемилуминесценции люциферин-люциферазной смеси, отражающего концентрацию высвобожденного тканью АТФ в нижнем отсеке камеры в различных условиях в реальном времени. **а** – компенсированная на средний базовый уровень регистрация хемилуминесцентного сигнала, обусловленного высвобождением АТФ вкусовым эпителием при кратковременной аппликации на апикальную поверхность эпителия 20 ммоль/л гидрохлорида хинина. При второй аппликации гидрохлорида хинина люциферин-люциферазная смесь в нижней части камеры дополнительно содержала 5 мкмоль/л тетродотоксина, ингибитора потенциал-зависимых натриевых каналов. Ингибирование приводило к высвобождению меньшего количества АТФ, что подтверждает участие тетродотоксин-чувствительных потенциал-зависимых натриевых каналов в секрецию АТР вкусовой тканью. Третий пик отражает частичное восстановление выброса АТФ в ответ на аппликацию гидрохлорида хинина, выполненную после удаления тетродотоксина путем перфузии нижней ячейки камеры физиологическим раствором между 2 и 3 аппликациями. Горизонтальными линиями над экспериментальной кривой указаны время и продолжительность аппликаций; вертикальные стрелки – время смены раствора в нижней части камеры; ТТХ – тетродотоксин. **б** – средние нормированные величины пиковых значений потока хемилуминесценции при аппликации гидрохлорида хинина в присутствии тетродотоксина и в контроле; ΔF и $\Delta F_{\text{контр}}$ – компенсированные пиковые значения потока хемилуминесценции в присутствии ингибитора и в контроле, соответственно; n – число регистраций.

практически невозможно, для сопоставления результатов, полученных в разных экспериментах, вместо общепринятого пересчета потоков хемилуминесценции в абсолютные количества или молярные концентрации АТФ использовались относительные величины потока. Для вычисления последних зарегистрированные величины потока хемилуминесценции, компенсированные на средний уровень базы (выраженные в секундах в минус первой степени), нормировали на величину максимума (пика) ответа после первой аппликации вкусового стимула в начале каждой регистрации, который был условно принят за контроль (рис. 2б). Разработанная камера позволила непрерывно наблюдать при помощи микрофотометра базовый уровень АТФ с целью мониторинга жизнеспособности вкусовой ткани *ex vivo* и регистрировать высвобожденный эпителием АТФ в ответ на серию стимулов (рис. 2) в различных условиях: при смене ионного состава омывающих ткань растворов или подаче ингибиторов [12].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. // *Science*. 2005. V. 310 (5753). P. 1495. <https://doi.org/10.1126/science.1118435>
2. Roper S.D., Chaudhari N. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18 (8). P. 485. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.68>
3. Neufeld H.A., Towner R.D., Pace J. // *Experientia*. 1975. V. 31. P. 391. <https://doi.org/10.1007/BF01922604>
4. Ussing H.H., Zerahn K. // *Acta. Physiol. Scand.* 1951. V. 23. P. 110. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>
5. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., Wu G. // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2013. V. 18. Iss. 4. P. 1266. <https://doi.org/10.2741/4178>
6. Geraedts M.C., Troost F.J., De Ridder R.J., Bodelier A.G., Masclee A.A., Saris W.H. // *Obesity*. 2012. V. 20 (3). P. 678. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.104>
7. Romanov R.A., Churbanov G.D., Rogachevskaya O.A., Kolesnikov S.S. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2013. V. 7 (3). P. 242. <https://doi.org/10.1134/S1990747813020062>
8. Hamamatsu Photonics. R1527P Datasheet. <https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/optical->

- sensors/pmt/pmt_tube-alone/side-on-type/R1527P.html
9. Хохлов А.А., Рогачевская О.А. // Биологические мембраны. 2021. Т. 38. № 3. С. 225.
<https://doi.org/10.31857/S023347552103004X>
 10. Berthold F., Herick K., Siewe R.M. // Methods in Enzymology. 2000. V. 305. P. 62.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)05478-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)05478-1)
 11. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jirang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. // EMBO J. 2007. V. 26 (3). P. 657.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601526>
 12. Хохлов А.А., Рогачевская О.А. // Сб. статей Международной конференции “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”. (Пушино, Россия, 24–28 мая 2021) 2021. Т. 2. С. 485.
- Адрес для справок: Россия, 142290, Московская область, Пушино, ул. Институтская, 3, Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН.
E-mail: aakhl@rambler.ru*