

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ГЛАВНЫХ КЛЕТОК СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК ПОЧКИ НА ГИПОТОНИЧЕСКИЙ ШОК. ЭКСПЕРИМЕНТ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

© 2011 г. А.В. Иляскин*, Г.С. Батурина*, Д.А. Медведев** ***,
А.П. Ершов** ***, Е.И. Соленов* ***

*Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10;

**Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 15;

***Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, Университетский пр., 2

E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.05.10 г.

После доработки 28.02.11 г.

Экспериментально и с применением математического моделирования исследована реакция главных клеток собирательных трубок почки на гипоосмотический шок. Построена математическая модель реакции главных клеток собирательных трубок почки на гипотонический шок, основанная на изменениях относительного объема данных клеток, обнаруживаемых с помощью флуоресцентного зонда кальцеина. Показано, что регуляторное снижение объема в гипоосмотической среде сопровождается значительным выходом осмолитов из клеток и снижением водной проницаемости плазматической мембраны. С помощью моделирования процессов трансмембранного транспорта получена количественная оценка снижения водной проницаемости, которая уменьшалась на порядок от исходного значения в $2 \cdot 10^{-1}$ см/с до $2 \cdot 10^{-2}$ см/с. Показано также, что эффективное регуляторное снижение объема главных клеток собирательных трубок при шоке происходит в результате многократного возрастания проницаемости мембраны для K^+ , Cl^- и органических анионов.

Ключевые слова: регуляция клеточного объема, математическое моделирование, почка.

Для изучения свойств клетки в настоящее время применяется наиболее перспективный подход, сочетающий в себе математическое моделирование процесса с использованием данных, полученных в эксперименте. Существующие модели процессов трансмембранного переноса осмолитов используются для изучения стационарного состояния клеток [1–6]. Динамической модели поведения клеток почечного эпителия при гипотоническом шоке на сегодняшний день не существует. В этой связи актуальным является исследование механизмов регуляции клеточного объема при действии гипотонической среды, которые связаны с трансмембранным переносом воды и растворенных в ней веществ.

Главные клетки собирательных трубок почки должны обладать эффективным механизмом для поддержания осмотического гомеостаза, так как осмотическое давление канальцевой

жидкости, контактирующей с клетками, может изменяться в широких пределах. Наиболее опасна для клеток гипотоническая среда, поскольку в результате возрастания клеточного объема может произойти разрушение плазматической мембраны и, как следствие, нарушение целостности клетки.

Водная проницаемость главных клеток собирательных трубок обусловлена наличием в апикальной мембране водных каналов – AQP2, а в базолатеральной – AQP3 и AQP4 [7]. Эффективным способом защиты от чрезмерного набухания в условиях гипоосмотической среды может быть уменьшение водной проницаемости мембраны клеток.

Сохранение жизнеспособности и целостности клетки в условиях гипоосмотической среды обеспечивается набором механизмов для регуляторного снижения объема (RVD). По мнению ряда авторов, RVD осуществляется благодаря выходу из клетки осмолитов, K^+ и Cl^- [8–10]. Кроме того, в процессе RVD клетки могут терять органические осмотически активные вещества [10].

Сокращения: RVD – регуляторное снижение объема, OMCD – наружные собирательные трубки, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ДМСО – диметилсульфоксид.

В настоящее время в литературных источниках не представлены данные о клетках с высокой водной проницаемостью с характерными временами набухания и регуляторного снижения объема при гипотоническом шоке порядка нескольких секунд. Например, в работе [11] процесс набухания blastomeres эмбриона мыши продолжался около 10 мин. Целью настоящей работы было построение математической модели реакции клеток собирательных трубок почки на гипотонический шок, в основу которой легло изменение относительного объема данных клеток. Анализ экспериментальных данных с помощью математической модели позволил расширить возможности исследования адаптационных механизмов клетки благодаря получению количественных оценок параметров процессов, прямое измерение которых в эксперименте затруднено.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. В экспериментах использовали 60-дневных крыс линии Вистар обоих полов. Животных получали из лаборатории экспериментальных животных ИЦиГ СО РАН. Для стандартизации состояния животных и повышения водной проницаемости эпителия собирательных трубок крыс приводили в состояние антидиуреза. С этой целью животных лишали доступа к воде и обеспечивали их сухим кормом в течение 36 часов (гипогидратированные животные).

Получение фрагментов собирательных трубок (OMCD). Крыс наркотизировали пентабарбиталом (50 мг/кг веса тела) и декапитировали. Извлеченные почки помещали в фосфатно-солевой буфер ФСБ (рН 7,4), декапсулировали и декортицировали. Мозговое вещество почки диспергировали, пропуская через инъекционную иглу с внутренним диаметром 0,45 мм в ФСБ с низким содержанием кальция. Полученную суспензию переносили в культуральную среду Игла MEM, фильтруя через капроновое полотно, и использовали как препарат фрагментов почечных канальцев. Все процедуры выполняли на холоду.

Растворы. В качестве изотонического раствора использовали ФСБ (124 мМ NaCl, 4,7 мМ Na₂HPO₄, 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH₂PO₄, 0,5 мМ MgCl₂, 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl₂), (280 мОсмоль/л), рН 7,4. Гипотоническую среду создавали пропорциональным снижением концентрации всех ионов. С этой целью использовали ФСБ, разведенный в два раза дистиллированной водой (0,5 × ФСБ). Для диспергирования мозгового вещества почки использо-

вали низкокальциевый ФСБ (124 мМ NaCl, 4,7 мМ Na₂HPO₄, 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH₂PO₄, 0,5 мМ MgCl₂, 5,5 мМ глюкозы, 0,05 мМ CaCl₂).

Флуориметрический анализ. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом ЛОМО-Р8. Объем камеры около 50 мкл, скорость протекания раствора 25 мл/мин, смена омывающего раствора в течение 100 мс, поддерживаемая температура 36,8 ± 0,2°C. Использовали водно-иммерсионный объектив (× 60, N.A.1.0) с дополнительной термостабилизацией. Фрагменты канальцев в 100 мкл культуральной среды MEM наносили на предметное стекло, покрытое полилизинном, и после внесения красителя помещали в проточную камеру микроскопа. Для изучения изменений объема клетки в процессе реакции на осмотический шок применяли метод, основанный на эффекте гашения флуоресцентного красителя кальцеина белками цитоплазмы [12]. Изменения объема клетки выражали в относительных единицах. В суспензию с фрагментами канальцев вносили кальцеин AM (Invitrogen) в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации кальцеина AM 5,0 мкМ, ДМСО 1%. Стекла инкубировали в атмосфере воздуха, содержащего 5% CO₂, при 4°C 15 мин, затем 25 мин при 37°C. Флуоресценцию измеряли на длине волны света 520 нм при длине волны возбуждающего света 490 нм.

Эмитируемый свет регистрировали с помощью фотоприемника на основе ФЭУ-71, оборуодованного полевой диафрагмой для измерения интенсивности флуоресценции в интересующей области фрагмента канальца. Измерения проводили с помощью аналого-цифрового преобразователя PCL-818HG (Advantech) с записью на компьютер.

Методы математического моделирования. Предложенная математическая модель описывает трансмембранные потоки гипотетической клетки, мембрана которой содержит каналы ионов Na⁺, K⁺, Cl⁻ и органических анионов X, Na⁺/K⁺-насос, котранспортеры K⁺-Cl⁻ (KCC) и котранспортеры Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC). Набор моделируемых транспортеров выбран в соответствии с экспериментальными данными их экспрессии в мембранах клеток собирательных трубок почки [13–20]. Общую площадь поверхности мембраны A, через которую транспортировались ионы и вода, принимали постоянной и не зависящей от изменения объема клетки в силу малой растяжимости липидного бислоя.

Потоки осмолитов через ионные каналы моделировали диффузионными уравнениями

Фика и Планка с учетом преобразования Гольдмана–Ходжкина–Каца [21,22].

Поток, обусловленный работой Na^+/K^+ -насоса, описывали детальной кинетической схемой с использованием графического алгоритма Хилла [23]. В силу того, что вклад данного потока в общий выход осмолитов из клетки в процессе реакции регуляторного снижения объема незначителен, в модели использовали значения параметров Na^+/K^+ -насоса, полученные на основе анализа стационарного состояния работы фермента [4,5].

Трансмембранные потоки через котранспортеры КСС и НКСС определялись только трансмембранными концентрационными градиентами ионов и не зависели от значения трансмембранного потенциала [24]. Данные потоки были пропорциональны параметрам проницаемости $Q_{\text{КСС}}$ и $Q_{\text{НКСС}}$.

Расчет трансмембранного электрического потенциала проводили с использованием значения электрической емкости мембраны C_m [6]. В отличие от моделей, использующих уравнение Гольдмана–Ходжкина–Каца и его производные [1–5,25], данный подход позволяет обходить накладываемое ограничение на постоянство значения потенциала от времени ($dE/dt = 0$) при расчете трансмембранной разности потенциалов, когда суммарный ток ионов через мембрану не равен нулю [6].

Осмотический поток воды в модели учитывали через параметр водной проницаемости мембраны (P_w) и скорость изменения объема клетки.

Для определения стационарного состояния системы подбирали значения параметров проницаемости мембраны для Na^+ , K^+ и Cl^- P_{Na} , P_{K} , P_{Cl} , котранспорта $Q_{\text{КСС}}$, $Q_{\text{НКСС}}$ и плотности Na^+/K^+ -насоса N таким образом, чтобы значения внутриклеточных концентраций $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$, $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ и $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ и электрического потенциала покоя мембраны соответствовали экспериментальным данным для клеток собирательных трубок из работ [26–28]. Параметры варьировали в окрестности значений, взятых из работ [1–6]. Внеклеточную осмолярность определяли, суммируя концентрации ионов Na^+ , K^+ и Cl^- в соответствии с методикой проведения эксперимента, внутриклеточную – суммируя концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- и органических анионов X . Количество органических анионов X выбирали таким образом, чтобы общая концентрация внутриклеточных осмолитов равнялась внеклеточной (280 мМ). Средний заряд органических ионов z подбирали таким образом, чтобы обеспечить приблизительную электронейтральность внутриклеточной среды. Ос-

новные уравнения, обозначения и начальные значения переменных и параметров модели приведены в Приложении.

Численное интегрирование дифференциальных уравнений, используемых в модели, выполняли методом Рунге–Кутты четвертого порядка. Шаг интегрирования dt по времени обычно составлял 10^{-5} с. Это значение много меньше характерных времен моделируемых процессов. Для контроля часть расчетов выполняли при уменьшенном в 10 раз шаге (10^{-6} с), что не приводило к заметным изменениям. Подбор параметров водной и ионной проницаемости для моделирования реакции клетки на гипотонический шок проводили вручную с использованием критерия сходства между экспериментальными и модельными графиками – корня из суммы квадратов разности значений относительного объема клетки (V/V_0) в каждый момент времени:

$$\sqrt{\sum (V_{\text{эксп}}/V_{\text{эксп}}^0 - V_{\text{мод}}/V_{\text{мод}}^0)^2}. \quad (1)$$

Статистика. Все величины представлены как среднее \pm ошибка среднего ($M \pm SE$). График изменения относительной флуоресценции кальцеина получен в результате усреднения экспериментальных записей ($n = 6$) $\pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлено изменение относительного объема клетки при экспериментальном гипотоническом шоке. Видно, что гипоосмотический шок сопровождался резким увеличением объема клеток, за которым следовало регуляторное снижение объема, обусловленное потерей клеткой части осмотически активных веществ. При возвращении в изотоническую среду после шока устанавливающийся равновесный объем составлял около 60% от исходного.

На основе полученных экспериментальных данных была построена математическая модель реакции главных клеток ОМСД на гипотонический шок. Модель строили в двух вариантах с различной степенью приближения (см. таблицу). В простейшем варианте в качестве сигнала к запуску процесса RVD выступает увеличение относительного объема клетки в 1,3 раза. Был принят упрощенный механизм RVD, который моделируется скачкообразным возрастанием потоков K^+ , Cl^- и органических анионов X из клетки. В модели возрастание проницаемости плазматической мембраны отражено умножением исходных величин проницаемости на параметр «gain», проницаемость для органиче-

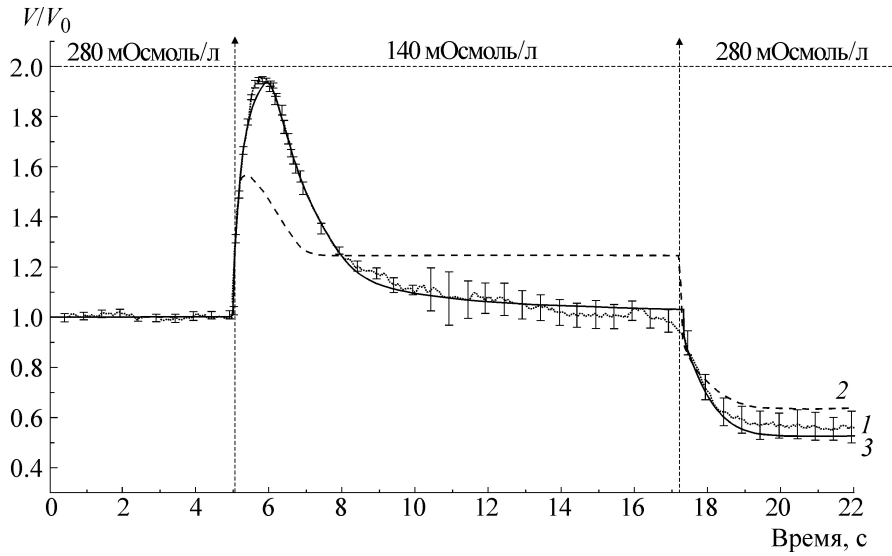


Рис. 1. Изменение относительного объема V/V_0 главных клеток собирательных трубок почки при воздействии гипотонической среды в эксперименте и в приближениях варианта модели в зависимости от объема клетки: 1 – усредненная экспериментальная запись флуоресценции кальцеина ($n = 6$) с указанием стандартной ошибки (SE); 2 – модель процесса RVD (нулевое приближение); 3 – модель процесса RVD (первое приближение). Верхняя шкала отражает изменение осмолярности омывающего раствора (мОсмоль/л).

Варианты приближения модели

Приближение	Значение проницаемости мембраны для ионов		
	$V/V_0 \leq 1,3$	$V/V_0 > 1,3$	
Нулевое приближение (управляющий параметр – объем)	$P_K = P_K^0$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0$ $P_X = 0$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0$	$P_K = P_K^0 \times gain^*$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0 \times gain$ $P_X = P_K^0 \times 0,5 \times gain$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0 \times gain$	
Первое приближение (управляющий параметр – объем, непрерывная зависимость, задержка 0,9 с)	$V/V_0 \leq 1$	$1 < V/V_0 < 1,3$ $P_K = P_K^0 \left((gain - 1) \left(\frac{(V/V_0 - 1)}{0,3} \right)^2 + 1 \right)$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0 \left((gain - 1) \left(\frac{(V/V_0 - 1)}{0,3} \right)^2 + 1 \right)$ $P_X = P_K^0 \times 0,5 \times gain \left(\frac{(V/V_0 - 1)}{0,3} \right)^2$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0 \left((gain - 1) \left(\frac{(V/V_0 - 1)}{0,3} \right)^2 + 1 \right)$	$V/V_0 \geq 1,3$ $P_K = P_K^0 \times gain$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0 \times gain$ $P_X = P_K^0 \times 0,5 \times gain$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0 \times gain$
	Явная зависимость от времени ($t = 0$ в момент смены осмолярности 280 → 140)	$t \leq 0,9$	$0,9 < t < 2,9$ ($\tau_{high} = 2$ с)
	$P_K = P_K^0$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0$ $P_X = 0$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0$	$P_K = P_K^0 \times gain$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0 \times gain$ $P_X = P_K^0 \times 0,5 \times gain$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0 \times gain$	$P_K = P_K^0 (1 + (gain - 1)e^{[-(t + 2,9)/\tau_{decay}]})$ $P_{Cl} = P_{Cl}^0 (1 + (gain - 1)e^{[-(t + 2,9)/\tau_{decay}]})$ $P_X = P_K^0 \times gain \times 0,5e^{[-(t + 2,9)/\tau_{decay}]}$ $Q_{KCC} = Q_{KCC}^0 (1 + (gain - 1)e^{[-(t + 2,9)/\tau_{decay}]})$

Примечание. * – Коэффициент возрастания проницаемости $gain = 1100$ во всех вариантах модели.

ских ионов определена как 50% от проницаемости для ионов калия. Управляющий уровень 1,3 и величина параметра *gain* были подобраны с помощью численных экспериментов. После снижения относительного объема клетки до значения 1,3 значения параметров проницаемости возвращались к исходным. Такой подход можно назвать нулевым приближением.

Как видно из построенного с помощью модели профиля клеточного объема, в нулевом приближении в основном поведение реальной клетки воспроизводится довольно грубо, в частности, наблюдаются большие отклонения величины пиков моделируемого и реального объемов клетки после стабилизации в гипотонической среде (рис. 1).

С учетом наличия в клетке ионных каналов, активируемых при растяжении мембраны [30,31], а также возможного влияния механических напряжений цитоскелета на активность ряда киназ и G-белков, входящих в сигнальные системы клетки [32–34], по-видимому, необходимо принимать во внимание влияние внутриклеточных сигнальных систем на процессы регуляции объема клетки. Для построения более адекватного теоретического профиля в формулы была введена задержка реакции повышения проницаемости для осмолитов. Из экспериментальных данных следует, что в начале процесса набухания (в течение 0,9 с) клетка увеличивает объем как идеальный осмометр, что указывает на отсутствие значительного выхода осмолитов из клетки в этот период. В следующем варианте приближения модели это отражено задержкой включения процессов RVD на 0,9 с после смены осмолярности окружающего раствора.

Поскольку скачкообразное изменение проницаемости является достаточно грубой аппроксимацией, для преодоления возникающего отклонения расчетной кривой от экспериментальной была введена непрерывная зависимость проницаемости осмолитов от объема клетки. Введение условия непрерывности расширяет возможности модели, позволяя добиться лучшего соответствия расчетного профиля кривой клеточного объема усредненной зависимости, полученной в эксперименте. Модифицированную таким образом модель можно назвать моделью первого приближения. В данной версии модели увеличение проницаемости описывалось введением непрерывной функции $f(V/V_0)$, которая равна единице при $V/V_0 > 1,3$ а в интервале $1 < V/V_0 < 1,3$ возрастает от 0 до 1. Такая зависимость отражает постепенность реакции клетки на изменения объема, естественную в рамках представлений о механической активации. Вид функции был выбран из соображений

простоты и согласования с экспериментом. Оказалось, что приемлемое согласие достигается при параболической зависимости в интервале $1 < V/V_0 < 1,3$. Расчеты показали, что модель первого приближения удовлетворительно описывает поведение клетки (рис. 1).

Рассмотренный выше «механической» подход, несмотря на хорошее совпадение с экспериментом, не является единственно возможным. Более того, его следует отнести к чрезмерно упрощенным. Механическая активация не отражает всей совокупности процессов, происходящих в клетке, подвергаемой осмотическому шоку. Предполагая, что проницаемость транспортеров, участвующих в реакции RVD в клетке, управляется не прямым механическим растяжением мембраны, а посредством сигнального механизма клетки, представляющего собой цепь ферментативных реакций, который можно рассматривать как «клеточные часы», был введен параметр продолжительности состояния повышенной активности транспортеров с последующим экспоненциальным снижением их проницаемости до исходного уровня. При этом проницаемости выражались как явные функции времени; формулы, использованные в расчетах, приведены в таблице. Модель, кроме амплитуды роста проницаемости *gain*, содержит два варьируемых параметра – длительность интервала времени τ_{high} , в течение которого проницаемость мембраны для осмолитов повышена, и характерное время спада регуляторной реакции τ_{decay} после указанного периода. Модификация модели с привлечением временной зависимости проницаемости позволила подобрать такие значения ее параметров, при которых точки теоретического профиля полностью находятся в пределах стандартной ошибки среднего для экспериментальных данных (рис. 2).

Моделирование позволило оценить вклады потоков различных ионов в уменьшение объема клетки. Из рис. 3 видно, что в начале процесса RVD преобладает поток через KCl-котранспортер (J_{KCC}). Также можно говорить о существенном вкладе диффузионных потоков K^+ и органических анионов X (J_{K} и J_{X}). Эти потоки в значительной мере определяют равновесный объем клетки в гипоосмотической среде. Следует отметить, что поток ионов хлора (J_{Cl}) приобретает положительные значения (поток внутрь клетки) и напрямую не участвует в снижении внутриклеточной концентрации ионов Cl⁻. Анализ результатов моделирования позволил также провести количественную оценку изменения содержания осмотически активных веществ в клетке в результате гипотонического шока. Из результатов расчетов количества внут-

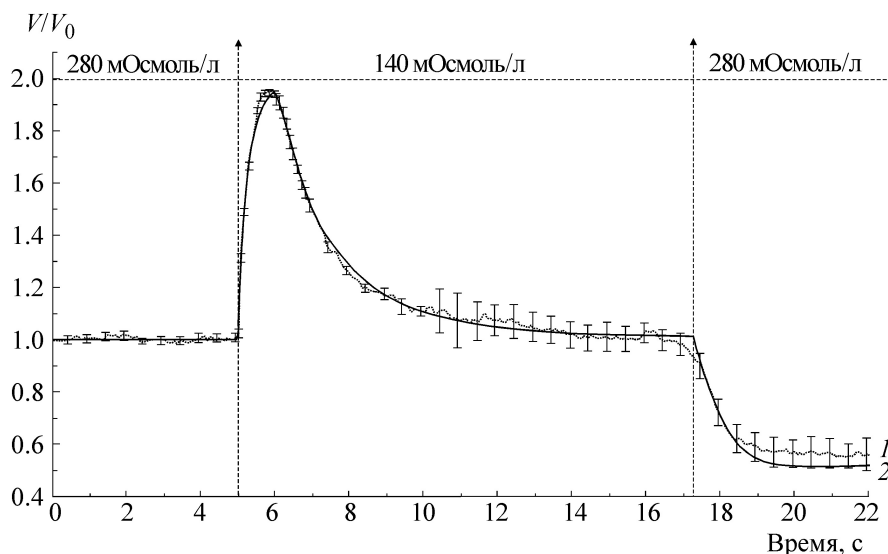


Рис. 2. Изменение относительного объема V/V_0 главных клеток собирательных трубок почки при воздействии гипотонической среды в эксперименте и в модели в зависимости от времени: 1 – усредненная экспериментальная запись флуоресценции кальцеина ($n = 6$) с указанием стандартной ошибки (SE); 2 – модель процесса RVD (явная зависимость от времени). Верхняя шкала отражает изменение осмолярности омывающего раствора (мОсмоль/л).

ри клеточных осмолитов видно, что их общее содержание уменьшилось на 47% по сравнению с первоначальным уровнем ($2,80 \cdot 10^{-13}$ и $1,48 \cdot 10^{-13}$ моль/клетку до и после реакции RVD соответственно), что хорошо согласуется с результатами эксперимента.

С помощью модели получена оценка изменения водной проницаемости мембраны клетки в процессе RVD. На рис. 4 представлены профили изменения объема клетки в модели (явная зависимость от времени) и в эксперименте. Параметр водной проницаемости подбирали для достижения минимального значения критерия (1). Установлены следующие значения водной проницаемости:

до воздействия гипотонического шока: $P_w = 2 \cdot 10^{-1}$ см/с;

после воздействия гипотонического шока: $P_w = 2 \cdot 10^{-2}$ см/с.

Снижение водной проницаемости клетки в расчетах определяли по формуле:

$$P_w = P_w^0(0,1 + 0,9 \exp(-t + 0,9)), \quad (2)$$

где $t = 0$ в момент снижения суммарной концентрации ионов в наружной среде с 280 → 140 мМ. Таким образом, в процессе RVD коэффициент водной проницаемости снижался в 10 раз. Такой вывод следует из анализа крутизны профиля объема клетки в той части, где происходит снижение объема при переходе

клетки из гипотонической среды в среду с нормальным осмотическим давлением.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предложенная математическая модель описывает трансмембранные диффузионные потоки основных ионных осмолитов, определяющих изменения клеточного объема: Na^+ , K^+ , Cl^- . Органические осмолиты в модели представлены без разделения на заряженные и электронейтральные. На данном уровне сложности модели сравнение теоретических расчетов с экспериментальными данными показывает, что такое упрощение является допустимым. Сравнение двух подходов к выбору управляющего параметра модели показало хорошую конвергенцию результатов при использовании в качестве такого параметра как объема клетки, так и времени. Однако подход с использованием в качестве управляющего параметра объема клетки, несмотря на близкое совпадение с экспериментом, является чрезмерно упрощенным и механистичным. Механическая активация не отражает всей совокупности процессов, происходящих в клетке, подвергаемой осмотическому шоку. По крайней мере, не менее важны биохимические процессы, которые могут запускаться при изменении не только объема, но и концентраций сигнальных молекул, а также мембранного потенциала [8,10]. В этой связи, как попытка приближения к модели более высокого уровня, был создан вариант модели, в котором

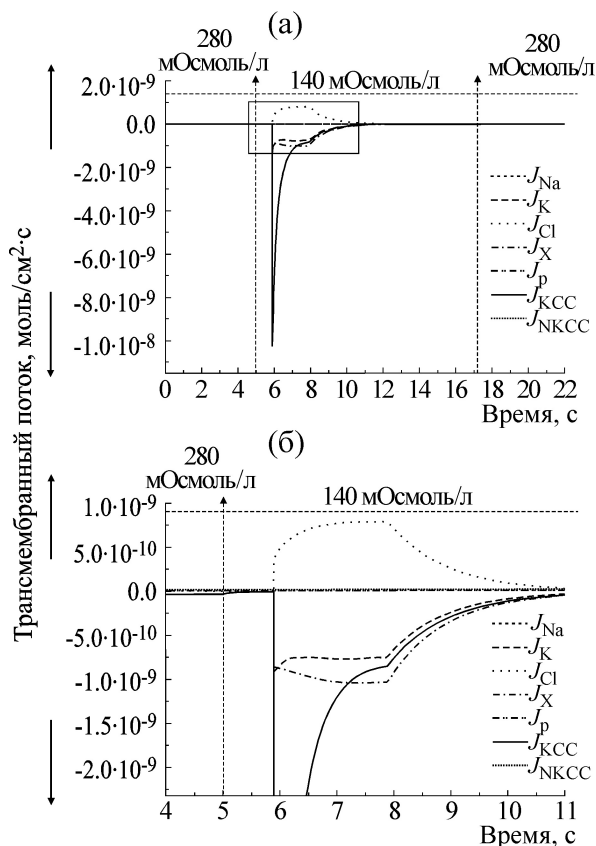


Рис. 3. Зависимости интенсивности трансмембранных потоков (моль/см² с) от времени; (а) – общее соотношение потоков, обусловленных различными транспортерами; (б) – увеличенный участок (выделен на (а) рамкой), соответствующий по времени процессу RVD при шоке. Верхняя шкала отражает изменение осмолярности омывающего раствора (мОсмоль/л). Стрелки вдоль оси ординат показывают направление потоков ионов: в клетку – стрелка направлена вверх; из клетки – стрелка направлена вниз.

изменение параметров проницаемости зависело от продолжительности регуляторных процессов, контролирующих активность переносчиков в плазматической мембране клетки.

Предполагая, что проницаемость транспортеров, участвующих в процессе RVD в клетке, управляется посредством цепи ферментативных реакций, которую можно рассматривать как «клеточные часы», проницаемости выражали как явные функции времени. Полученные в таком приближении аппроксимации уже несут достаточно важную информацию. С точностью, заданной имеющимися экспериментальными данными, определены: время задержки реакции регуляторного снижения объема, продолжительность стадии высокой проницаемости, а также характерное время спада регуляторной реакции. Во всех вариантах модели для согласования с экспериментом требуется возрастание

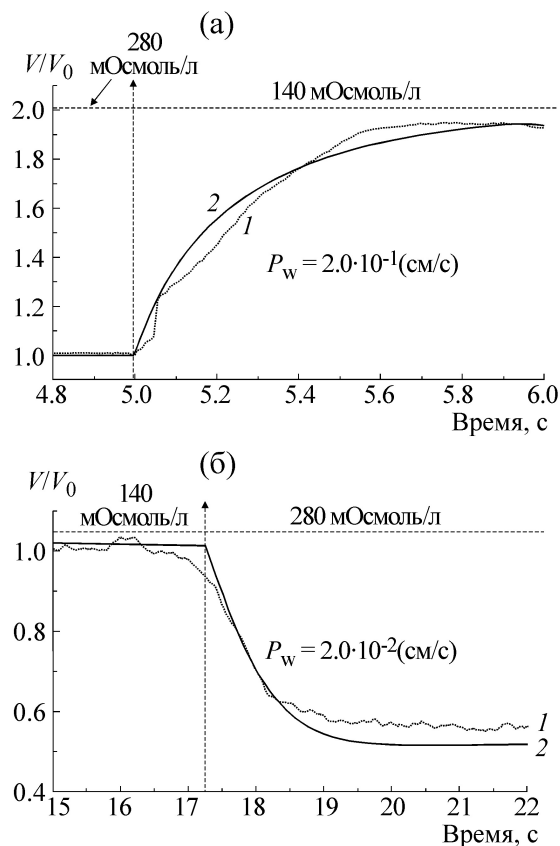


Рис. 4. Изменение относительного объема клеток в зависимости от времени в эксперименте (1) и модели (2) при переходе: (а) – в гипотоническую среду (280 → 140); (б) – в изотоническую среду (140 → 280). Верхняя шкала отражает изменение осмолярности омывающего раствора (мОсмоль/л).

проницаемости на три порядка. Это, по-видимому, отражает критическую важность регуляторных процессов для функционирования клетки в гипоосмотической среде.

С помощью модели можно теоретически оценить вклады потоков различных ионов в уменьшение объема клетки. Из рис. 3 видно, что в начале процесса RVD преобладает поток через KCl-котранспортер (J_{KCC}), откуда можно оценить значение вклада диффузионных потоков K^+ и органических анионов X (J_K и J_X) для стабилизации объема клетки в гипоосмотической среде. Следует отметить, что поток ионов хлора (J_{Cl}) при этом направлен внутрь клетки и напрямую не участвует в снижении внутриклеточной концентрации ионов Cl⁻.

Модель позволяет довольно точно описывать изменения объема реальной клетки, о чем свидетельствуют результаты анализа потоков и расчетного профиля клеточного объема в процессе RVD. Анализ результатов моделирования позволил провести количественную оценку из-

менения содержания осмотически активных веществ в клетке в процессе RVD. Расчеты внутриклеточного содержания отдельных ионов подтверждают существующую точку зрения, согласно которой снижение объема клетки связано с выходом ионов K^+ и Cl^- .

Заключения, сделанные на основе анализа результатов математического моделирования реакции клетки на гипотонический шок, нуждаются в экспериментальной проверке. Преимуществом настоящего подхода является то, что параметры модели допускают экспериментальную проверку. Если в дальнейших исследованиях будет показано соответствие экспериментальных величин и параметров модели, то данный подход можно будет использовать как инструмент для дифференцирования и предварительной оценки функций транспортеров плазматической мембраны, а также временных характеристик процессов RVD различных типов клеток.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Математическая модель определяет зависимость от времени объема клетки V , содержания Na^+ , K^+ , Cl^- и органических анионов X в клетке и электрического трансмембранного потенциала (E_m):

$$\frac{dV}{dt} = (AV_w P_w) \left[\frac{n_{Na} + n_K + n_{Cl} + n_X}{V} - \Pi_e \right], \quad (3)$$

$$E_m(t) = F(n_{Na} + n_K - n_{Cl} + zn_X) / C_m / A, \quad (4)$$

$$\frac{dn_{Na}}{dt} = A[-3J_p + J_{Na} + J_{NKCC}], \quad (5)$$

$$\frac{dn_K}{dt} = A[2J_p + J_K + J_{KCC} + J_{NKCC}], \quad (6)$$

$$\frac{dn_{Cl}}{dt} = A[J_{Cl} + 2J_{NKCC} + J_{KCC}], \quad (7)$$

$$\frac{dn_X}{dt} = AJ_X. \quad (8)$$

Диффузионные потоки ионов Na^+ , K^+ и Cl^- описываются выражениями [21,22]:

$$I_{Na} = P_{Na} \varepsilon(u) \left[[Na^+]_{out} \exp\left(-\frac{u}{2}\right) - \left(\frac{n_{Na}}{V}\right) \exp\left(\frac{u}{2}\right) \right], \quad (9)$$

Таблица 1. Параметры, используемые в модели и их обозначения

Параметр	Символ
Объем клетки	V
Площадь поверхности клетки	A
Шаг интегрирования	dt
Проницаемость мембраны для Na^+	P_{Na}
Проницаемость мембраны для K^+	P_K
Проницаемость мембраны для Cl^-	P_{Cl}
Проницаемость мембраны для органических анионов X	P_X
Водная проницаемость мембраны	P_w
Параметр проницаемости КСС котранспортера	Q_{KCC}
Параметр проницаемости НКСС котранспортера	Q_{NKCC}
Внутриклеточная концентрация и количество Na^+ соответственно	$[Na^+]_{in}, n_{Na}$
Внутриклеточная концентрация и количество K^+	$[K^+]_{in}, n_K$
Внутриклеточная концентрация и количество Cl^-	$[Cl^-]_{in}, n_{Cl}$
Количество органических анионов в клетке	n_X
Электрический трансмембранный потенциал	E_m
Общая плотность Na/K-насоса в мембране	N
Внеклеточная концентрация Na^+	$[Na^+]_{out}$
Внеклеточная концентрация K^+	$[K^+]_{out}$
Внеклеточная концентрация Cl^-	$[Cl^-]_{out}$
Общая внеклеточная концентрация осмолитов	Π_e
Электрическая емкость мембраны	C_m
Средний заряд органических ионов	z
Молярный объем воды	V_w
Константа Фарадея	F
Абсолютная температура	T
Газовая константа	R

$$I_K = P_K \varepsilon(u) \left[[K^+]_{out} \exp\left(-\frac{u}{2}\right) - \left(\frac{n_K}{V}\right) \exp\left(\frac{u}{2}\right) \right], \quad (10)$$

$$I_{Cl} = P_{Cl} \varepsilon(u) \left[[Cl^-]_{out} \exp\left(\frac{u}{2}\right) - \left(\frac{n_{Cl}}{V}\right) \exp\left(-\frac{u}{2}\right) \right], \quad (11)$$

где $u = FE_m/RT$, а $\varepsilon(u) = u/[\exp(u/2) - \exp(-u/2)]$.

Поток органических анионов из клетки определяется аналогичным выражением с учетом того, что внеклеточная концентрация $X = 0$:

Таблица 2. Исходные значения параметров модели реакции главных клеток собирательных трубок почки на гипотонический шок

Параметр	Символ	Значение
Объем клетки	V_0	$1 \cdot 10^{-9}$ см ³
Площадь поверхности клетки	A	$1 \cdot 10^{-5}$ см ²
Проницаемость мембраны для Na ⁺	P_{Na}	$3 \cdot 10^{-8}$ см/с
Проницаемость мембраны для K ⁺	P_K^0	$2 \cdot 10^{-8}$ см/с
Проницаемость мембраны для Cl ⁻	P_{Cl}^0	$2 \cdot 10^{-8}$ см/с
Проницаемость мембраны для воды	P_w^0	$2 \cdot 10^{-1}$ см/с
Параметр проницаемости котранспортера КСС	Q_{KCC}^0	$8 \cdot 10^{-3}$ см ⁴ моль ⁻¹ с ⁻¹
Параметр проницаемости котранспортера НКСС	Q_{NKCC}	$1,9 \cdot 10^6$ см ¹⁰ моль ⁻³ с ⁻¹
Внутриклеточная концентрация Na ⁺	$[Na^+]_{in}$	$2,05 \cdot 10^{-5}$ моль/см ³
Внутриклеточная концентрация K ⁺	$[K^+]_{in}$	$1,40 \cdot 10^{-4}$ моль/см ³
Внутриклеточная концентрация Cl ⁻	$[Cl^-]_{in}$	$3,63 \cdot 10^{-5}$ моль/см ³
Количество органических осмолитов в клетке	n_X	$8,3 \cdot 10^{-14}$ моль
Трансмембранный потенциал	E_m	-0,051 В
Плотность Na/K-насоса в мембране	N	$3 \cdot 10^{-13}$ моль/см ²
Внеклеточная концентрация Na ⁺	$[Na^+]_{out}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$ моль/см ³
Внеклеточная концентрация K ⁺	$[K^+]_{out}$	$5 \cdot 10^{-6}$ моль/см ³
Внеклеточная концентрация Cl ⁻	$[Cl^-]_{out}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/см ³
Полная концентрация внеклеточных осмолитов	Π_e	$2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/см ³
Электрическая емкость мембраны	C_m	$7 \cdot 10^{-7}$ Ф/см ²
Средний заряд органических осмолитов X	Z	-1,5

$$J_X = -P_X \varepsilon(u) \left[\left(\frac{n_X}{V} \right) \exp\left(\frac{uz}{2}\right) \right]. \quad (12)$$

Активность Na⁺/K⁺-насоса описывается детальной кинетической схемой, подробно изложенной в работах [4,5,29], которая определяет поток J_p как:

$$J_p = \left(\frac{1}{\Sigma} \right) (\alpha - \beta), \quad (13)$$

где α – функция констант скоростей прямых реакций, β – функция констант скоростей обратных реакций, Σ – функция всех констант скоростей реакций, описывающих работу насоса.

Поскольку один цикл работы Na⁺/K⁺-насоса состоит в переносе трех ионов Na⁺ наружу и двух ионов K⁺ внутрь клетки, потоки Na⁺ и K⁺, обусловленные работой насоса, равны $-3J_p$ и $2J_p$ соответственно.

Потоки через котранспортеры НКСС и КСС описываются следующими выражениями:

$$J_{NKCC} = Q_{NKCC} ([Na^+]_{out} [K^+]_{out} [Cl^-]_{out}^2 - [Na^+]_{in} [K^+]_{in} [Cl^-]_{in}^2), \quad (14)$$

$$J_{KCC} = Q_{KCC} ([K^+]_{out} [Cl^-]_{out} - [K^+]_{in} [Cl^-]_{in}). \quad (15)$$

Эти потоки моделируются с использованием параметров проницаемости Q_{NKCC} и Q_{KCC} [5,6]. Потоки через котранспортеры не зависят от значения трансмембранного потенциала [24], а определяются только трансмембранными градиентами концентрации ионов. Начальные значения параметров модели приведены в табл. 2.

В соответствии с условиями эксперимента гипотонический шок моделировался уменьшением в два раза значений внеклеточных концентраций $[Na^+]_{out}/2$, $[K^+]_{out}/2$ и $[Cl^-]_{out}/2$ ($\Pi_e/2 = [Na^+]_{out}/2 + [K^+]_{out}/2 + [Cl^-]_{out}/2$).

Оптимизацию параметров модели проводили для достижения максимального соответствия с усредненной экспериментальной записью изменения относительного объема клеток по кривую (1).

Реакцию регуляторного снижения объема RVD моделировали запуском комплекса регуляторных событий: 1) быстрым возрастанием проницаемости мембраны для ионов K⁺ и Cl⁻; 2) выходом из клетки органических анионов X.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 08-04-00541, 09-04-00197 и интеграционного проекта СО РАН № 58.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Armstrong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 6257 (2003).
2. R. Jacob, D. Piwnica-Worms, R. Horres, and M. Lieberman, J. Gen. Physiol. **83**, 47 (1984).
3. R. Moreton, J. Exp. Biol. **51**, 181 (1969).
4. J. Hernandez, J. Fischbarg, and L. S. Liebovitch, J. Theor. Biol. **137**, 113 (1989).
5. J. Hernandez and S. Chifflet, J. Membr. Biol. **176**, 41 (2000).
6. J. Fraser, J. Physiol. **559** (2), 459 (2004).
7. S. Nielsen, et al., Physiol. Rev. **82**, 205 (2002).
8. F. Lang, et al., Physiol. Rev. **78**, 247 (1998).
9. K. Strange, Advan. Physiol. Edu. **28**, 155 (2004).
10. E. Hoffmann, I. Lambert, and S. Pedersen, Physiol. Rev. **89**, 193 (2009).
11. A. G. Pogorelov and V. N. Pogorelova, Biophysics, **54**(3), 336 (2009).
12. E. I. Solenov, H. Watanabe, G. T. Manley, and A. S. Verkman, Am. J. Physiol. Cell. Physiol. **286**, C426 (2004).
13. J. Legato and M. A. Knepper, Physiol. Genomics., **13**, 179 (2003).
14. M. Reif, S. Troutman, and J. Schafer, J. Clin. Invest., **77**, 1291 (1986).
15. G. Frindt and L. Palmer, Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol. **252**, F458 (1987).
16. G. Frindt and L. Palmer, Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol. **256**, F143 (1989).
17. W. Wang, S. Hebert, and G. Giebisch, Annu. Rev. Physiol. **59**, 413 (1997).
18. S. Muto, Physiol. Rev. **81**(1), 85 (2001).
19. M. Haas and B. Forbush, Annu. Rev. Physiol. **62**, 515 (2000).
20. S. Wall, M. Fischer, P. Mehta, K. Hassell, and S. Park, Am. J. Physiol. Renal. Physiol. **280**, 913 (2001).
21. D. E. Goldman, J. Gen. Physiol. **27**, 37 (1943).
22. A. Hodgkin and B. Katz, J. Physiol. **108**, 37 (1949).
23. T. Hill, New York: Academic Press, (1977), pp. 1–32.
24. P. Lauf and N. Adragna, Cell. Physiol. Biochem. **10**, 341 (2000).
25. L. Mullins and K. Noda, J. Gen. Physiol. **47**, 117 (1963).
26. J. Gifford, J. Galla, R. Luke, and R. Rick, Am. J. Physiol. **259**, F778 (1990).
27. C. Pappas and B. Koeppe, Am. J. Physiol. **263**, F1004 (1992).
28. B. Stanton, Am. J. Physiol. **256**, F862 (1989).
29. I. Chapman, E. Johnson, and J. Kootsey, J. Membrane. Biol. **74**, 139 (1983).
30. L. Wang, G. Ding, Q. Gu, and W. Schwarz, Eur. Biophys. J. **39**(5), 757 (2010).
31. A. Dyrda, et al., PLoS ONE **5** (2), 9447 (2010).
32. S. Lee, Z. Shen, D. Robinson, S. Briggs, and R. Firtel, Mol. Biol. Cell. (in press).
33. R. Kaunas, P. Nguyen, P. Usami, and S. Chien, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** (44), 15895 (2005).
34. H. Multhaupt, A. Yoneda, J. Whiteford, et al., J. Physiol. and Pharm. **60**, 31 (2009).

A Mathematical Model of the Response of Principal Cells of Collecting Ducts to Hypotonic Shock

A.V. Ilyaskin*, G.S. Baturina*, D.A. Medvedev ***,
A.P. Ershov** ***, and E.I. Solenov* *****

**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk 630090 Russia*

***Lavrent'ev Institute of Hydrodynamics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Lavrent'eva 15, Novosibirsk, 630090 Russia*

****Novosibirsk State University, Universitetskii pr. 2, 630090 Russia*

The regulatory decrease in the volume of principal cells of collecting ducts to hypoosmotic shock has been investigated experimentally and using the mathematical modeling. A mathematical model of the response of collecting duct principal cells to hypotonic shock has been constructed on the basis of the experimental time course of changes in cell volume measured by the fluorescent dye Calcein. It was shown that the regulatory decrease in volume under hypotonic conditions occurs via a marked release of osmolytes and is accompanied by a decrease in water permeability of the cell membrane. The mathematical modeling of transmembrane transport processes allowed us to quantitatively estimate the changes in membrane water permeability, which decreased tenfold, from $2 \cdot 10^{-1}$ cm/s to $2 \cdot 10^{-2}$ cm/s. It was also shown that the effective regulatory decrease in the volume of collecting duct principal cells in hypotonic medium results from a significant increase in membrane permeability for K^+ , Cl^- , and organic anions.

Key words: regulation of cell volume, mathematical modeling, kidney