

МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ И ОБЪЕМА КЛЕТОК

© 2018 г. О.О. Пономарчук* **, Ф. Будро**, А.А. Шиян* **, Г.В. Максимов*,
Р. Григорчик**, С.Н. Орлов* ***

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы 1/12

E-mail: sergeinorlov@yandex.ru, gmaxsimov@mail.ru

**Научно-исследовательский центр Монреальского университета,
H2X 0A9, Монреаль, ул. Сент-Дени, 900, Канада

E-mail: ryszard.grygorczyk@umontreal.ca

***Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2

Поступила в редакцию 14.03.17 г.

В данной работе предложен метод, позволяющий одновременно регистрировать изменения концентрации внутриклеточного кальция и объема одиночных клеток с помощью Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного зонда Fura-2 и трехмерной реконструкции топографии клеточной поверхности, соответственно. С помощью этого метода нами установлено, что нагрузка Fura-2 не оказывает существенного влияния как на кинетику набухания клеток легочного эпителия человека A549 в гипотоническом растворе, так и на кинетику восстановления объема. В исследованном диапазоне изменения объема клеток нам не удалось обнаружить достоверных изменений концентрации внутриклеточного кальция. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии вовлечения Ca^{2+} -опосредованных сигнальных систем в ауторегуляцию объема клеток A549 в гипотонических условиях.

Ключевые слова: клеточный объем, внутриклеточный кальций, трехмерная микроскопия, клетки A549.

Способность к долгосрочному поддержанию объема на постоянном уровне вне зависимости от изменений внутриклеточной или внеклеточной осмолярности – одна из фундаментальных функций клеток животных. Набухание клетки в гипотонических условиях приводит к активации объем-чувствительного анионного канала (Volume Regulated Anion Channel, VRAC), K^+ -каналов, K^+ , Cl^- -котранспорта, высвобождению ионов и осмотически связанной воды, и восстановлению объема до значений, близких к исходным, – явлению, получившему название regulatory volume decrease (RVD). Согласно общепринятой модели в клетках существует сенсор, воспринимающий информацию о набухании клетки и генерирующий сигнал, который контролирует работу перечисленных выше ионных каналов и переносчиков.

Природа сигнала, запускающего процесс RVD и активацию объем-чувствительного анионного канала в частности, остается неизвестной. Главным кандидатом на роль такого сигнала рассматривается прирост внутриклеточной концентрации кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), который происходит в ответ на набухание клетки. Согласно этой модели увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активирует ионотранспортирующие системы, вовлеченные в RVD и обеспечивающие потерю клетками ионов и осмотически связанной воды [1,2].

Основным доводом в пользу кальциевой модели RVD являются данные об увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при стимуляции гипотоническим шоком ряда клеток, включая клетки аденокарциномы легочного эпителия A549 [3], эпителиальные клетки бронхов 16HBE14o-3, раковые клетки шейки матки человека [4], астроциты крысы [5], опухолевые клетки асцитоза Эйрлиха [6], клетки эпителия почек крысы [7]. Следует, однако, отметить, что, согласно работе [8], не удалось обнаружить влияния гипотонического шока на концентрацию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в асцитных опухолевых клетках Эйрлиха. Отрицательные результаты

Сокращения: RVD – восстановление объема клетки до значений, близких к исходным (Regulatory Volume Decrease), DISUR – метод реконструкции поверхности на основе двух изображений (Double Image Surface Reconstruction Technique).

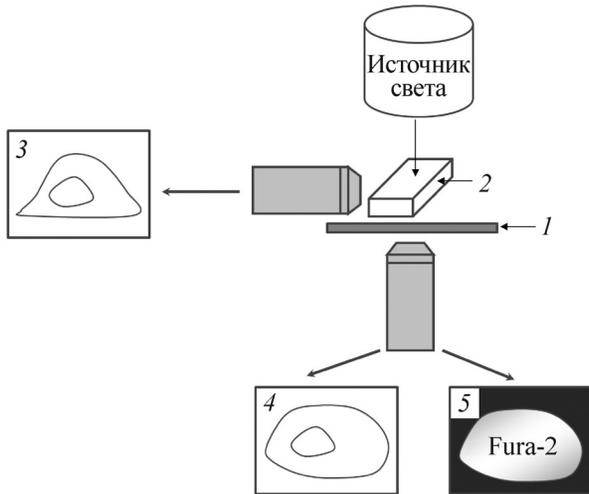


Рис. 1. Схема установки для одновременной регистрации изменений объема и внутриклеточной концентрации кальция. На рабочем столе (1) инвертированного флуоресцентного микроскопа расположена перфузируемая камера (2), в которой размещены прикрепленные к стеклу одиночные клетки. Непрерывная запись изображений вида сбоку (3) и поочередная запись светового изображения вида сверху (4) с одновременным изображением флуоресценции клетки, нагруженной Fura-2 (5), позволяют одновременно оценить изменения объема и $[Ca^{2+}]_i$.

были получены также при исследовании действия гипотонического шока на хромаффинные клетки быка [9] и ацинарные клетки крысы [10].

Другим аргументом в поддержку участия кальциевой сигнальной системы являются эксперименты, где использование хелаторов внутриклеточного и/или внеклеточного кальция приводит к исчезновению RVD [5,11]. Необходимо отметить, что Ca^{2+} -хелаторы не оказывали влияния на RVD в линии клеток нейробластомы N1E115 [12], а также в культуре нейронов [13] и астроцитов [14,15] крысы. Более того, нами было установлено, что добавление хелаторов внеклеточного кальция приводит к резкому увеличению проницаемости плазматической мембраны клеток для одновалентных катионов [16,17]. Противоречивый характер приведенных выше данных может быть результатом проведения экспериментов по измерению объема и $[Ca^{2+}]_i$ раздельно во времени. Часто эксперименты проводились не на одиночных клетках, а в монослоях, где флуктуации $[Ca^{2+}]_i$ выражены по-разному внутри популяции [1,3]. Учитывая вышесказанное, мы модифицировали ранее описанный метод реконструкции поверхности на основе двух изображений (Double Image Surface Reconstruction Technique, DISUR) [18,19] для возможности одновремен-

ного измерения изменений клеточного объема и внутриклеточной концентрации кальция в одиночных клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки линии аденокарциномы легкого человека A549 были выращены при $37^{\circ}C$ и 5% CO_2 в среде Дульбекко (DMEM) (HyClone, Logan, США), содержащей 10% бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Burlington, Канада). Для оценки изменений внутриклеточной концентрации кальция и клеточного объема клетки были посеяны на покровные стекла (25 мм). Концентрация клеток на покровном стекле составляла около 10 клеток/мм² в условиях низкого содержания бычьей сыворотки (0,1–0,5%) в питательной среде. Клетки использовали в течение 24–72 ч после посева.

Измерение объема клеток проводили с помощью обновленной версии метода DISUR [18, 19]. Схема установки изображена на рис. 1. Для предотвращения фотообесцвечивания красителя и предотвращения взаимодействия между изображением, регистрируемым в белом свете, и флуоресцентным изображением использовали красный светофильтр (рис. 2), пропускающий свет с длиной волны более 645 нм (Thorlabs, Newton, США). Прикрепленные к покровному стеклу одиночные клетки были размещены внутри проточной камеры размерами $5 \times 10 \times 25$ мм. Камера была расположена на рабочем столе инвертированного микроскопа NIKON TE300, оборудованного эпифлуоресцентным ультрафиолетовым освещением (Nikon Canada Inc., Mississauga, Канада) (рис. 2). На протяжении эксперимента клетки промывали изотоническим раствором при $37^{\circ}C$ со скоростью 0,5 мл/мин. После 15 мин промывания изотоническим раствором клетки в течение 45 мин подвергали воздействию гипотонического раствора, осмолярность которого была снижена в два раза.

Метод DISUR основан на фазово-контрастной цифровой видеомикроскопии и включает в себя трехмерное реконструирование формы одиночной клетки исходя из ее изображений, зарегистрированных во взаимно перпендикулярных плоскостях. Вид сбоку и сверху получали с помощью объективов 10× и 40× соответственно. Изображения сбоку и сверху регистрировали каждые 15 с посредством двух миниатюрных цифровых камер Moticam 352 (Motic Instruments Inc., Richmond, Канада) и mvBlueFOX (Matrix Vision, Oppenweiler, Германия). Плоскости изображений клетки вида сбо-

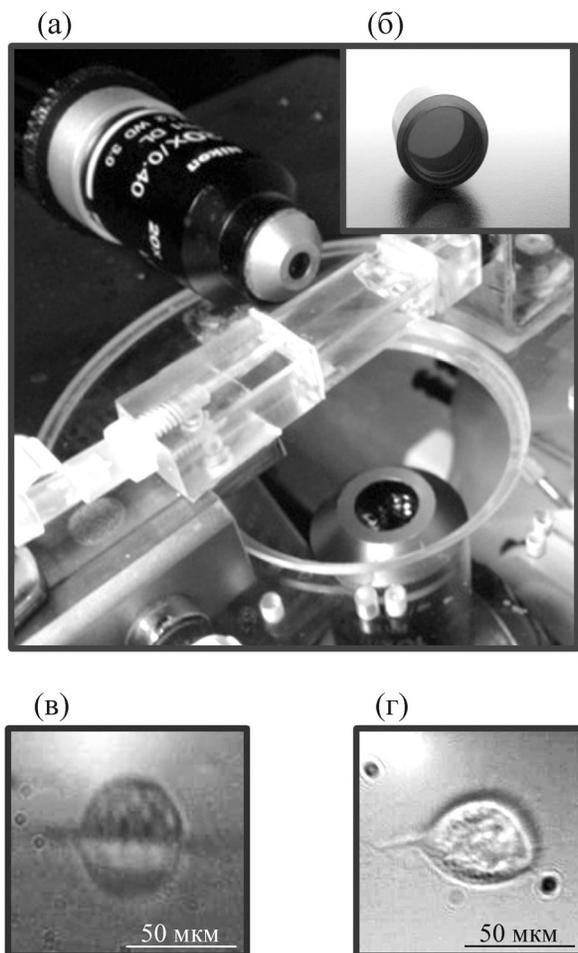


Рис. 2. Установка для одновременной регистрации изменений объема и внутриклеточной концентрации кальция: (а) – специально разработанная камера для перфузии клеток; (б) – красный фильтр, предотвращающий фотообесвечивание красителя и взаимодействие между изображением, регистрируемом в белом свете, и флуоресцентным изображением; (в) – вид клетки сбоку; (г) – вид клетки сверху.

ку и сверху являются взаимно перпендикулярными и пересекаются между собой по линии LL' , расположенной горизонтально (рис. 3а,б). Линия LL' пересекает основание клеточного профиля в точках (точки A и B , вид сбоку), которые в то же время являются пересечением линии LL' с контуром основы клетки (точки A и B , вид сверху). Вертикальная ось, проходящая через центр ядра клетки, делит профиль клетки на две половины. В MATLAB (MathWorks, Inc., Natick, США) контур основы клетки при виде сверху оцифровывали вручную (всего m точек), а профиль изображения клетки сбоку оцифровывали посредством последовательного приближения к функции, являющейся полиномом пятой степени (метод наименьших

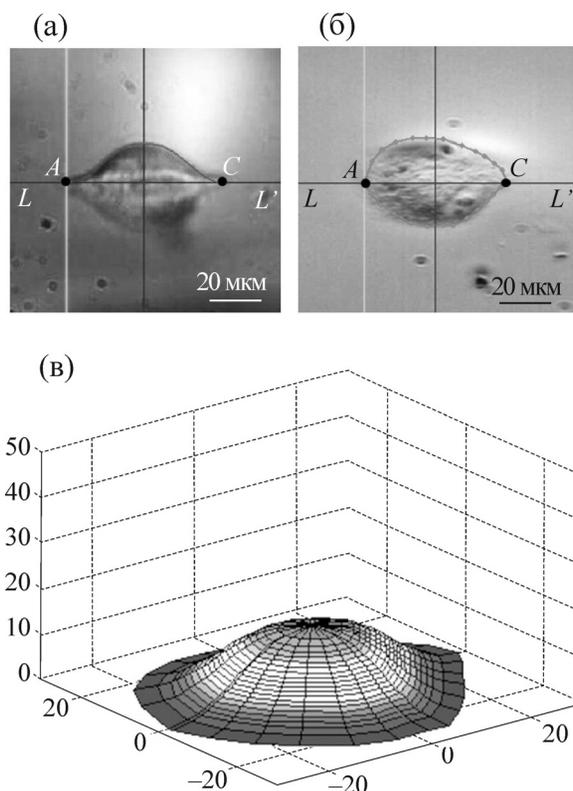


Рис. 3. Реконструкция клетки на основе метода DISUR. (а) – Профиль клетки при виде сбоку; (б) – профиль клетки при виде сверху; (в) – трехмерная реконструкция клеточной поверхности со следующими параметрами: высота – 14,5 мкм; площадь поверхности – 4783 мкм²; объем – 9800 мкм³.

квадратов). Уравнение, задаваемое функцией, было использовано для генерации набора из n равноудаленных точек вдоль оси z . Точки этого набора представляют собой начальные координаты для построения $(n - 1)$ клеточных срезов с контуром основы клетки, принятым за шаблон. Для построения каждого среза $(m - 1)$ точек были экстраполированы от такой начальной координаты. Положение экстраполированной точки определяется методом, основанным на паре параллельных векторов. Две соседние точки в контуре основы образуют вектор (v_{ij}) , являющийся отправным для аналогичного вектора, лежащего в срезе выше $(v_{(i+1)j})$. Начальная точка вектора в следующем срезе известна из данных по оцифровке профиля клетки. Величина и направление искомого вектора находятся на основании допущения, что вышеупомянутые вектора параллельны и что вектор $v_{(i+1)j}$ пропорционален по модулю вектору v_{ij} в соответствии с его расстоянием от вертикальной оси. Зная величину вектора $v_{(i+1)j}$, легко определить координаты его конечной точки. Процесс экстраполяции повторяется шаг за шагом

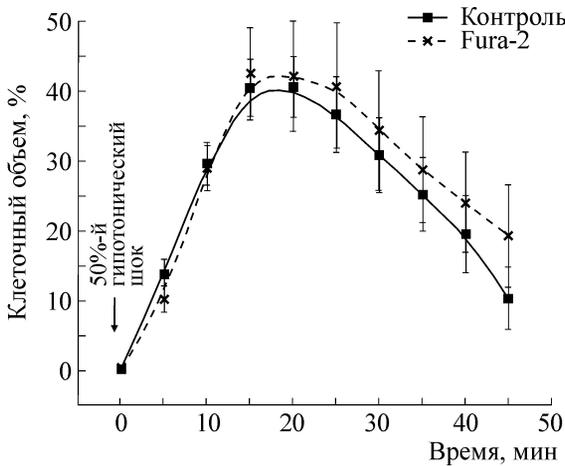


Рис. 4. Усредненные кинетики изменения объема контрольных клеток A549 ($n = 18$) и клеток, нагруженных флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fura-2 ($n = 11$). Момент уменьшения осмолярности (50%-й гипотонический шок) показан стрелкой. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

до тех пор, пока новый срез, состоящий из m точек, завершен. Результатом проделанных манипуляций должны быть срезы клетки, соответствующие сечениям плазматической мембраны вдоль оси z . Пример оцифровки изображений и конечный результат представлены на рис. 3в. Более детально метод описан в работе [18].

Полученные реконструкции клеточных моделей позволяют рассчитать объем клетки в MATLAB. Клеточный объем аппроксимируется суммой ($n - 1$) элементарных объемов V_i , каждый из которых является приближением пространства, ограниченного двумя прилегающими плоскостями и клеточной поверхностью. Уравнение (1) описывает поперечное сечение клетки int_i . Уравнение (2) служит описанием элементарного объема, который является результатом произведения усреднения двух прилегающих площадей поперечного сечения ($int_i + int_{i+1}$) на расстояние, разделяющее эти плоскости (Δz). Объем всей клетки V рассчитывается с помощью уравнения (3) и является суммированием всех элементарных объемов V_i :

$$int_i = \sum_{j=1}^m \frac{(x_{i(j+1)} - x_{ij})(y_{ij} + y_{i(j+1)})}{2}, \quad (1)$$

$$V_i = \frac{\Delta z(int_i + int_{i+1})}{2}, \quad (2)$$

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} V_i. \quad (3)$$

Для регистрации изменений $[Ca^{2+}]_i$ прикрепленные к покровному стеклу клетки инкубировали 60 мин при $37^\circ C$ в среде без фенола красного DMEM/F-12(1 : 1) (HyClone, Logan, США), содержащей 10 мкМ Fura-2-AM, и промывали 30 мин в той же среде, не содержащей Fura-2-AM. На следующем этапе стекло с клетками A549 помещали в перфузируемую камеру, где подвергали клетки облучению (300 мс), генерируемому ртутной лампой высокого давления (100 Вт, Osram GmbH, Германия) при 340 или 380 нм с помощью интерференционных светофильтров (Chroma Technology, Brattleboro, США), встроенных на вращающееся колесо Sutter Lambda 10-C (Sutter Instrument, Novato, США). Флуоресцентные изображения записывали с пятнадцатисекундным интервалом с помощью цифровой камеры MicroMAX (Princeton Instruments Inc., Trenton, США). В конце эксперимента для регистрации максимального уровня флуоресценции концентрацию внутриклеточного кальция увеличивали добавлением 10 мкМ Ca^{2+} -ионофора иономицина. Изменения концентрации кальция регистрировали в виде изменения соотношения флуоресценции Fura-2, зарегистрированной на 340 нм, к флуоресценции на 380 нм. Соотношение флуоресценций F_{340}/F_{380} нормализовали к начальному значению до стимуляции клеток 50% гипотоническим шоком.

Растворы и реактивы. Физиологический изотонический раствор содержал (в мМ): NaCl – 140, KCl – 5, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 1, глюкоза – 10, HEPES – 10; pH 7,4, доведенный раствором NaOH. Гипотонический раствор был приготовлен путем снижения концентрации NaCl. Осмолярность растворов измеряли с помощью криоскопического осмометра Micro Osmometer 3320 (Advanced Instruments Inc., Norwood, США) и составляла 309 мОсм/кг H_2O для изотонического раствора и 161 мОсм/кг H_2O для гипотонического раствора. Стоковые растворы Fura-2-AM (2 мМ) и иономицина (1 мМ) были приготовлены в диметилсульфоксиде. Реактивы были получены: $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl – от Fisher Scientific (Pittsburgh, США); NaCl, NaOH – от ACP Chemicals Inc. (Montreal, Канада); HEPES – от BioShop Canada Inc. (Burlington, Канада); Fura-2-AM – от Molecular Probes, Invitrogen Corp. (Burlington, Канада). Остальные реактивы были поставлены Sigma-Aldrich Canada Co (Oakville, Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 4 представлена кинетика набухания при перфузии клеток 50%-м гипотоническим

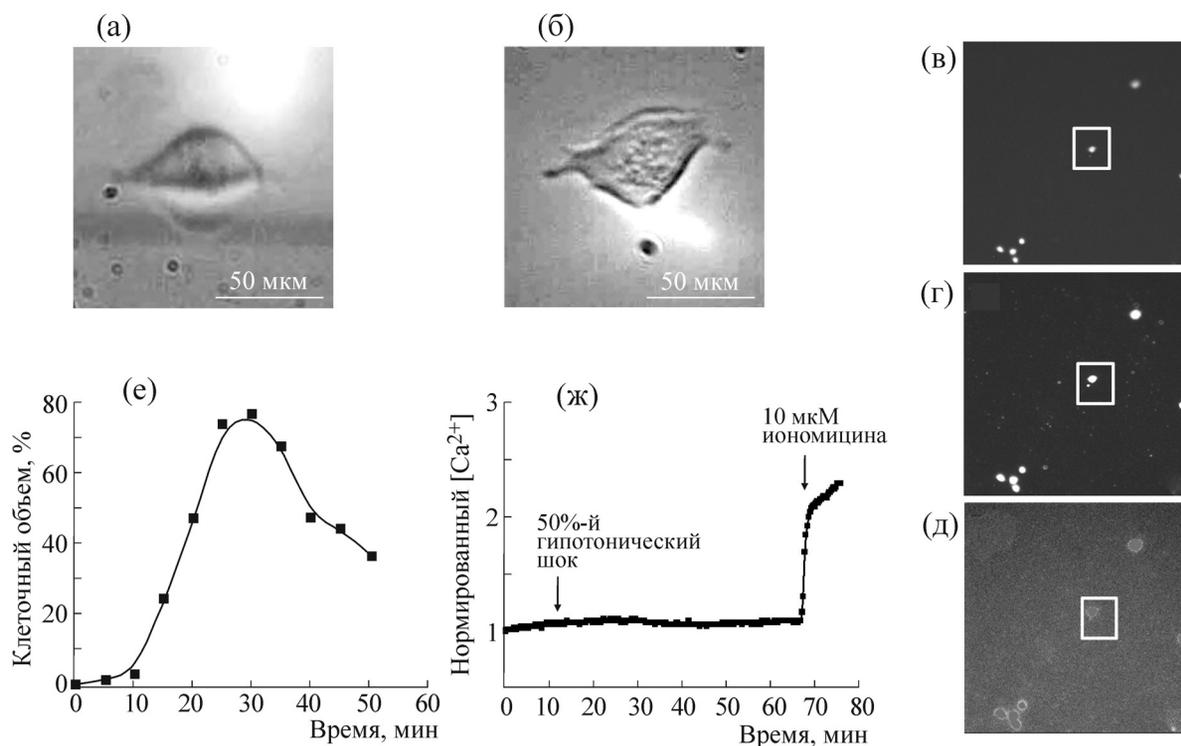


Рис. 5. Типичный эксперимент с одновременной регистрацией изменений объема и $[Ca^{2+}]_i$ в одиночной клетке: (а) – вид клетки сбоку; (б) – вид клетки сверху; (в) – флуоресценция Fura-2 при 340 нм; (г) – флуоресценция Fura-2 при 380 нм; (д) – соотношение F_{340}/F_{380} ; (е) – кинетика изменения клеточного объема при стимуляции 50%-м гипотоническим шоком; (ж) – кинетика изменения $[Ca^{2+}]_i$, измеренная по соотношению F_{340}/F_{380} .

раствором со скоростью $\sim 0,4 \text{ мин}^{-1}$ в контрольных условиях (обозначена сплошной линией). Снижение тоничности раствора приводило к набуханию клетки с максимальным значением увеличения объема на $40 \pm 6\%$ (V_{\max}) через 22 ± 2 мин. Медленная скорость набухания клеток обусловлена выбранными нами условиями, а именно объемом используемой камеры и скоростью замещения среды, что позволило нам улучшить качество получаемых изображений. Следует отметить, что в этих условиях клетки набухали до значений, сравнимых со значениями, полученными в условиях быстрого набухания [20]. После достижения максимального набухания наблюдалась классическая реакция RVD – восстановление объема до начальных значений. Медленное набухание клеток, использованное в наших экспериментах, не оказывало влияния на кинетику RVD, что согласуется с опубликованными ранее данными [21].

Установив кинетики изменения объема в наших условиях, мы переключились на изучение вклада кальциевой сигнальной системы в процесс набухания и восстановления объема используя клетки, нагруженные Fura-2, флуоресцентным индикатором Ca^{2+}_i . Как видно из рис. 4, нагрузка клеток этим соединением не

оказывает достоверного влияния на кинетику изменения объема клеток, вызванную гипотоническим шоком. Незначительное замедление кинетики RVD в клетках, нагруженных Fura-2, может быть следствием небольшого увеличения Ca^{2+} -буферной емкости цитоплазмы, отмеченное при использовании этого флуоресцентного зонда в других типах клеток [10] и/или повреждений, вызванных действием ультрафиолетового облучения, которые могут влиять на свойства цитоплазмы как биогеля и процессы перестройки цитоскелета, участвующие в регуляции объема клеток [22–24].

Мы не обнаружили достоверных изменений в концентрации внутриклеточного кальция, оцениваемого по соотношению F_{340}/F_{380} как в течение фазы набухания клетки, так и при восстановлении ее объема (рис. 5е), что указывает на Ca^{2+} -независимый механизм RVD. В этой связи необходимо отметить, что нами зарегистрировано быстрое, ярко выраженное увеличение соотношения F_{340}/F_{380} в ответ на добавление Ca^{2+} -ионофора иономицина (рис. 5ж). Кроме того, в ряде клеток мы наблюдали спонтанные осцилляции соотношения F_{340}/F_{380} как до стимуляции гипотоническим шоком (рис. 6а), так и во время их максимального набухания

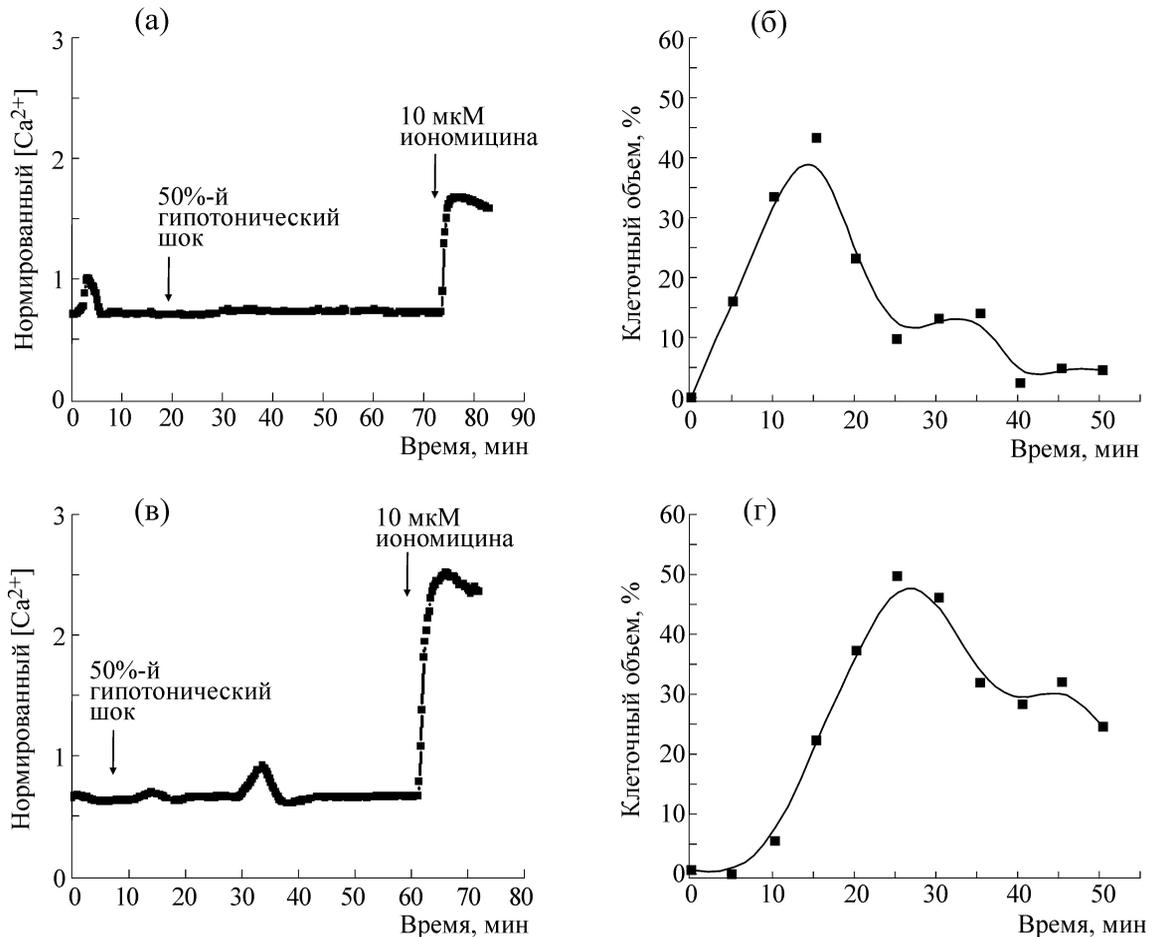


Рис. 6. Типичные эксперименты, в которых обнаружены спонтанные осцилляции внутриклеточной концентрации кальция до (а) и после (в) воздействия на клетки гипотонического шока. Кинетика изменения объема клеток представлена на рисунках (б) и (г) соответственно. В этом случае начало гипотонического шока соответствует нулевому моменту времени.

(рис. 6в). Последние два факта являются убедительным доказательством того, что наша система обладает достаточной чувствительностью для регистрации изменений концентрации внутриклеточного кальция.

В этой связи следует отметить, что предложенные ранее методы одновременной регистрации изменений $[Ca^{2+}]_i$ и объема клеток имеют существенные ограничения. Так, например, метод измерения интенсивности флуоресценции красителей в изобестической точке как информация об изменении объема внутриклеточной воды [2,25] основан на предположении об их равномерном распределении в клетке. Конфокальная микроскопия в комбинации с применением флуоресцентных зондов [26] имеет лучшее временное и пространственное разрешение, чем традиционная микроскопия, однако требует использования высокоэнергетического источника света, что может воздействовать на функциональные свойства образца при длительном

использовании. Преимуществом нашего метода является использование одного источника света низкой интенсивности. Ограничение данного метода связано с особенностями Fura-2 и других родственных флуоресцентных зондов, не способных зарегистрировать локальные изменения $[Ca^{2+}]_i$ на субклеточном уровне и в прилегающих к мембране областях, т.е. в местах локализации Ca^{2+} -чувствительных каналов и рецепторов [27]. Таким образом, для окончательного доказательства Ca^{2+} -независимого механизма RVD, продемонстрированного в данной работе, необходимо использование дополнительных методов, включая метод одновременной регистрации $[Ca^{2+}]_i$ в примембранных компартментах и активности ионных транспортеров, вовлеченных в регуляцию объема клетки [28].

Работа выполнена при финансовой поддержке Канадского фонда поддержки научных и инженерных проектов (грант 435517-2013, для Р. Григорчика и С.Н. Орлова) и Российского

фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00063, для С.Н. Орлова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. A. McCarty and R. G. O'Neil, *Physiol. Rev.* **72**, 1037 (1992).
2. J. Altamirano, M. S. Brodwick, and F. J. Alvarez-Leefmans, *J. Gen. Physiol.* **112**, 145 (1998).
3. F. Boudreault and R. Grygorczyk, *J. Physiol.* **561**, 499 (2004).
4. M. R. Shen, P. Furla, C. Y. Chou, et al., *Pflugers Arch.* **444**, 276 (2002).
5. E. R. O'Connor and H. K. Kimelberg, *J. Neurosci.* **13**, 2638 (1993).
6. S. F. Pedersen, J. Prenen, G. Droogmans, et al., *J. Membr. Biol.* **163**, 97 (1998).
7. H. Tinel, E. Kinne-Saffran, and R. K. Kinne, *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 297 (2000).
8. N. K. Jorgensen, S. Christensen, H. Harbak, et al., *J. Membr. Biol.* **157**, 281 (1997).
9. P. Doroshenko and E. Neher, *J. Physiol.* **449**, 197 (1992).
10. T. Speake, I. J. Douglas, and P. D. Brown, *J. Membr. Biol.* **164**, 283 (1998).
11. J. S. Adorante and P. M. Cala, *Am. J. Physiol.* **268**, C721 (1995).
12. B. J. Lippmann, R. Yang, D. W. Barnett, and S. Misler, *Brain Res.* **686**, 29 (1995).
13. H. Pasantes-Morales, T. E. Maar, and J. Moran, *J. Neurosci. Res.* **34**, 219 (1993).
14. H. Pasantes-Morales, R. A. Murray, L. Lilja, and J. Moran, *Am. J. Physiol.* **266**, C165 (1994).
15. R. Sanchez-Olea, M. Morales Mulia, J. Moran, and H. Pasantes-Morales, *Neurosci. Lett.* **193**, 165 (1995).
16. S. N. Orlov, S. L. Aksentsev, and S. V. Kotelevtsev, *Cell Calcium* **38**, 53 (2005).
17. S. V. Koltsova, J. Tremblay, P. Hamet, and S. N. Orlov, *Cell Calcium* **58**, 317 (2015).
18. F. Boudreault and R. Grygorczyk, *J. Microscopy* **215**, 302 (2004).
19. N. Groulx, F. Boudreault, S. N. Orlov, and R. Grygorczyk, *J. Membr. Biol.* **214**, 43 (2006).
20. S. Tatur, N. Groulx, S. N. Orlov, and R. Grygorczyk, *J. Physiol.* **584**, 419 (2007).
21. E. K. Hoffmann, I. H. Lambert, and S. F. Pedersen, *Physiol. Rev.* **89**, 193 (2009).
22. J. Fels, S. N. Orlov, and R. Grygorczyk, *Biophys. J.* **96**, 4276 (2009).
23. A. Platonova, F. Boudreault, L. V. Kapilevich, et al., *J. Membr. Biol.* **247**, 571 (2014).
24. A. Platonova, O. Ponomarchuk, F. Boudreault, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2337 (2015).
25. K. J. Bibby and A. G. McCulloch, *Am. J. Physiol.* **266**, C1639 (1994).
26. R. Liu, and A. E. Persson, *J. Physiol.* **563**, 895 (2005).
27. R. Thul, S. Coombes, H. L. Roderick, and M. D. Bootman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 2150 (2012).
28. O. Ponomarchuk, F. Boudreault, S. N. Orlov, and R. Grygorczyk, *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **468**, 2075 (2017).

The Method for Simultaneous Registration of Changes in Intracellular Ca²⁺ Concentration and Cell Volume

**O.O. Ponomarchuk* **, F. Boudreault*, A.A. Shiyan* **, G.V. Maksimov*,
R. Grygorczyk**, and S.N. Orlov* *****

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

***Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,
Tour Viger, rue St-Denis 900, Québec H2X 0A9, Montreal, Canada*

****Siberian State Medical University, Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634050 Russia*

In this study, we developed a method to determine changes in intracellular calcium concentration in single cells in which changes in volume can be measured simultaneously using Ca²⁺-sensitive fluorescent probe Fura-2 and a three-dimensional image surface reconstruction technique, respectively. This method shows that Fura-2 loading has no significant effect on kinetics of human lung epithelial A549 cells swelling in a hypotonic solution, and on kinetics of volume restoration. In the investigated range of cell volume modulation, we did not observe any significant changes in intracellular calcium concentration. Our data point to the fact that Ca²⁺-mediated signaling systems are not involved in autoregulation of volume in A549 cells under hypotonic conditions.

Keywords: cell volume, intracellular calcium, three-dimensional microscopy, A549 cells