

ФОРМИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМОСТИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МИОЦИТАХ ЛЯГУШКИ

© И. Е. Катина, В. И. Лукьяненко, Д. А. Терентьев,
Н. В. Томилин, Г. А. Наследов

Лаборатория нейрорегуляции мышечной функции Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Россия, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44;
Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного университета,
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; Группа патоморфологии
Института токсикологии РАМН, Россия, 193019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

С помощью метода фиксации потенциала были исследованы количественные изменения натриевого и калиевого токов в эмбриональных скелетных миоцитах лягушки *Rana temporaria*, развивающихся в культуре 1—10 дней в условиях, исключающих слияние и деление клеток. Показано, что средние значения амплитуды и плотности натриевого тока в течение первых 7 дней культивирования возрастают в 12 и 7 раз соответственно. Амплитуда и плотность калиевого тока за тот же период увеличиваются соответственно в 3 и 1.8 раза преимущественно за счет быстрой составляющей. Параллельно наблюдалось увеличение скорости инактивации (в 25 раз) быстрого калиевого тока. Характер ответа на действие постоянного стимула в условиях фиксации тока у клеток ранних стадий имел вид пассивного электротонического ответа. Для клеток 5—8-го дня культивирования были зарегистрированы натриевые потенциалы действия, основные параметры которых зависели как от плотности натриевого тока, так и от соотношения плотностей Na^+ - и K^+ -токов.

Ключевые слова: культивируемые скелетные миоциты, натриевые токи, калиевые токи, потенциал действия.

I. E. Katina, V. I. Lukyanenko, D. A. Terentyev, N. V. Tomilin and G. A. Nasledov. FORMATION OF ELECTRICAL EXCITABILITY IN CULTURES OF THE CULTURED FROG EMBRYONIC MYOCYTES. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Acad.Sci., 194223, St.Petersburg, Torez Av., 44, Russia; St.Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, Universitetskaya Nab., 7/9, Russia; Institute of Toxicology, 193019, St. Petersburg, Bechtereva St., 1, Russia.

Quantitative changes of sodium and potassium ionic currents were studied in the frog embryonic skeletal myocytes cultures under conditions preventing cell fusion and division. During 7 days of culturing the mean values of the sodium and potassium currents densities were 7- and 1.8-fold increased, resp. In currents clamp records the APs were observed only after 5 days of culturing, and in cells with proportion of sodium and potassium conductances above the critical level.

Key words: embryonic skeletal myocytes, sodium and potassium currents, action potentials.

Известно, что у одиночных эмбриональных миоцитов лягушки, развивающихся в культуре, происходит экспрессия потенциалзависимых ионных Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -каналов. При этом натриевый ток (I_{Na}) в ходе развития миоцитов не меняет своих кинетических характеристик, которые подобны характеристикам мышечных волокон у взрослых амфибий, однако увеличивает свою амплитуду в первые дни развития, одновременно с ростом количества клеток, в которых I_{Na} обнаруживается [10, 21].

Относительно выходящего калиевого тока (I_{K}) у культивируемых миоцитов лягушки имеются данные о существовании 4 [14] и даже 9 [21] его компонентов,

различающихся по скорости активации и фармакологическим свойствам [2, 22]. У эмбриональных культивируемых мышечных клеток цыпленка идентифицировано 7 типов K^+ -каналов [37]. Было показано, что соотношение разных по кинетическим свойствам быстрых и медленных I_K претерпевает существенные изменения за время развития миоцитов в первичной культуре с 1-го по 10-й день. В частности, в первые дни культивирования получает преимущественное развитие группа быстро активирующихся I_K , а в последние дни количество типов быстрых I_K резко уменьшается — до 1—2 в каждой клетке [21]. Быстрый и медленный компоненты I_K на поздних сроках культивирования могут быть сравнимы с быстрым и медленным I_K задержанного выпрямления мышечных волокон взрослой лягушки [4, 6, 23, 30].

Задачей настоящего исследования явилось проследить становление электровозбудимости скелетных мышечных клеток лягушки в зависимости от динамики экспрессии потенциалзависимых Na^+ - и K^+ -каналов. Для устранения влияний слияния миоцитов в миотрубки и нейрональных факторов на дифференцировку мышечных клеток, становление потенциала покоя и уровня экспрессии каналов, определяющих электровозбудимость, отмечавшихся рядом авторов [10, 13, 19], наши опыты проводились в условиях, исключающих как слияние, так и деление клеток.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Первичную монослойную культуру скелетномышечных клеток pripravляли из эмбрионов *Rana temporaria* на стадии ранней нейрулы. После стерилизационной обработки производили хирургическое выделение дорсального участка эмбриона, включающего в себя мезодерму. Выделенные участки эмбрионов переносили в диссоциирующий раствор следующего состава (мг/л): 2943 — $NaCl$, 50 — KCl , 1300 — $NaHPO_4$, 200 — $NaHCO_3$, 700 EDTA [12]. Через 10 мин инкубации диссоциированные клетки мезодермы переносили в чашки Петри диаметром 40 мм, заполненные 4 мл культуральной питательной среды следующего состава: 55 % среды 199м (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва), 10 % бычьей эмбриональной сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Использование среды 199м предотвращало деление [33], а повышенное содержание сыворотки — слияние [10] клеток при редком посеве. В экспериментах использовали одиночные миоциты 1—10-го дня культивирования, не имевшие видимых контактов с другими клетками. Для измерения длины и ширины клеток использовали световой микроскоп. Увеличение светового микроскопа определяли при помощи стандартной измерительной линейки (1 деление = 0.1 мм).

Регистрация потенциалзависимых ионных токов и изменений мембранного потенциала. Для регистрации токов в условиях фиксации потенциала и изменений мембранного потенциала в условиях фиксации тока на одиночной клетке при плотном контакте (сопротивление плотного контакта 5—30 ГОм) применяли стандартный метод пэтч-кламп в конфигурации whole cell [15]. Использовали усилители РОК-3М (Россия) и List-7 (Германия), сопротивление обратной связи 0.5—10 ГОм. Считывание данных производили при помощи АЦП с частотой 0.01—10 кГц [1, 21]. Сопротивление кончика пипетки составляло 3—5 МОм. В качестве стандартного внутрипипеточного использовали раствор следующего состава (мМ): 110 — KCl , 1 — $CaCl_2$, 1 — $MgCl_2$, 10 — K_2EGTA (Sigma), 8 — HEPES-KOH (Sigma), pH 7.2. Для регистрации входящего потенциалзависимого натриевого тока в растворе 110 мМ KCl заменяли соответственно на 60 мМ $CsCl$ и 50 мМ TEACl. В качестве основного наружного использовали раствор (мМ): 120 — $NaCl$, 1.5 — KCl , 2 — $CaCl_2$, 8 HEPES-NaOH (Sigma), pH 7.4. При необходимости в наружном растворе использовали следующие вещества: тетродотоксин (San-kyo), 4-аминопиридин (Sigma) и нифедипин (Sigma). Опыты проводили при температуре 18—20 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате исследований с использованием световой микроскопии установлено, что после прикрепления к стеклу клетки имеют вытянутую симметричную веретенообразную форму. С увеличением срока культивирования ширина центральной части изменялась незначительно и составляла 12—14 мкм, длина клеток увеличивалась от

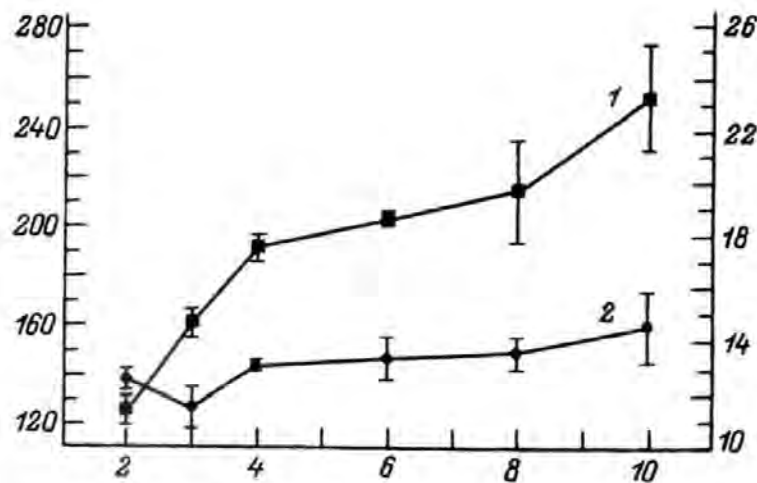


Рис. 1. Изменение длины (1) и ширины (2) клеток в процессе культивирования ($n = 25$). По оси абсцисс — время культивирования после прикрепления клеток, дни; по оси ординат: слева — длина клеток, мкм; справа — ширина клеток, мкм.

80—100 мкм на первые сутки до 250 мкм к десятым суткам (рис. 1). Полученные данные позволяют для оценки площади поверхности ($S_{кл}$) использовать формулу для геометрического тела, ограниченного двумя круговыми конусами

$$S_{кл} = 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L, \quad (1)$$

где R — радиус сечения центральной части ($1/2$ ширины клетки), l — длина клетки, L — длина образующей каждого из конусов [$L^2 = R^2 + (1/2)^2$].

Расчеты, выполненные с использованием данных, приведенных на рис. 1, показали, что средние значения $S_{кл}$ возрастают от $(15 - 20) \cdot 10^{-6}$ до $(45 - 60) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2$ от 1-го к 10-му дню (см. таблицу).

После образования конфигурации whole cell все основные электрофизиологические характеристики претерпевают некоторые изменения и достигают стационарного состояния через 10—15 мин. Среднее значение собственного мембранного потенциала клеток к моменту достижения стационарного уровня составляло $-41.0 \pm 3.4 \text{ мВ}$ (среднее \pm стандартная ошибка, $n = 17$). Этот уровень мембранного потенциала лежит в области практически полной инактивации основных потенциалзависимых компонентов ионного тока миоцитов [21]. В связи с этим при исследовании электрогенеза

Изменение площади поверхности, плотности ионных токов и удельной максимальной проводимости в зависимости от срока культивирования эмбриональных скелетных миоцитов лягушки

Дни	$S_{кл}$, 10^{-6} см^2	i_{Na} , 10^{-3} мА/см^2	g_{Na} , мС/см^2	i_K , 10^{-3} мА/см^2	g_K , мС/см^2	g_{Na}/g_K
2	25	7.35	0.56	24	0.45	1.24
3	30	13.3	1.05	27.8	0.55	1.9
4	34	29.4	2.27	45	0.82	2.6
5	37	38.7	3.01	44	1.2	2.6
6	40	48.32	3.74	40	1.3	2.9
7	43	50.4	3.9	40.7	1.3	3
8	45	45.9	3.4	33	1.15	2.25
9	46	44.0	3.15	34.5	1.1	2.86

Примечание. $S_{кл}$ — площадь поверхности, рассчитанная по формуле (1) в соответствии с данными об изменении длины клеток (рис. 1), i_{Na} — плотность максимального натриевого тока, i_K — плотность калиевого тока при значениях тестирующего потенциала $\pm 10 \text{ мВ}$, g_{Na} и g_K — максимальные значения проводимостей в расчете на единицу площади поверхностной мембраны.

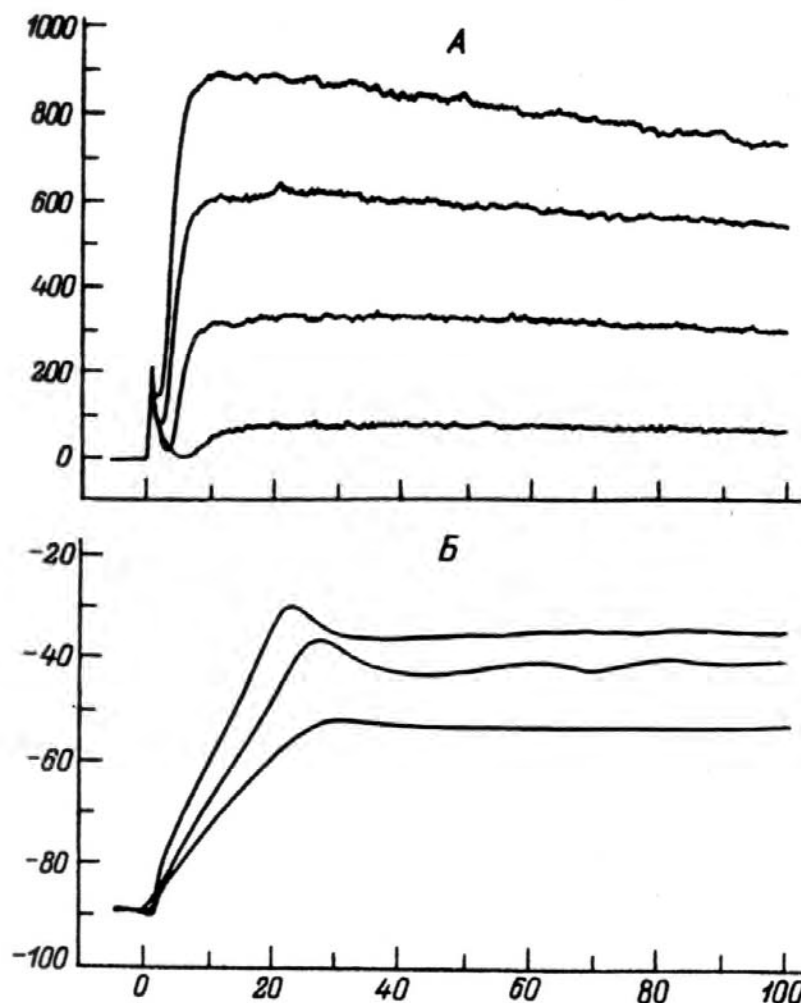


Рис. 2. Суммарные ионные токи в условиях фиксации потенциала (А) и изменения мембранного потенциала в условиях фиксации тока (Б) в миоците 3-го дня культивирования.

По оси абсцисс — время, мс; по оси ординат: на А — ток, пА (поддерживаемый потенциал -80 мВ, значения тестирующего потенциала от -40 до -10 мВ с шагом 10 мВ), на Б — мембранный потенциал, мВ. Постоянный гиперполяризующий ток -50 пА, стимулирующие деполяризующие токи — 50 , 100 и 200 пА. Собственный мембранный потенциал клетки перед началом регистрации -43 мВ.

в режиме фиксации тока уровень постоянного мембранного потенциала смещали до $-80 \dots -90$ мВ за счет приложения постоянного гиперполяризующего тока.

На ранних стадиях культивирования миоцитов (1—3-й дни после прикрепления клеток к субстрату) основным компонентом суммарного ионного тока является выходящий калиевый ток. Этот ток имеет относительно быструю кинетику активации (время достижения пика около 20 мс) и медленную кинетику инактивации: время спада до уровня 0.5 от максимального значения ($t_{0.5}$) более 0.5 с при значении тестирующего потенциала 0 мВ. Запись ионных токов, типичных для миоцитов ранних стадий развития, представлена на рис. 2, А. Входящий натриевый ток отсутствовал вовсе или не превышал 30 пА. На рис. 2, Б приведена регистрация на той же клетке изменений мембранного потенциала при подаче деполяризующих стимулов в условиях фиксации тока. При амплитуде стимулирующего тока 50 пА (нижняя кривая) наблюдался пассивный электротонический ответ, отражающий кинетику перезарядки мембраны. Однако и при амплитуде стимулирующих токов 100 и 200 пА наблюдались относительно медленные изменения мембранного потенциала с величиной пика не более -30 мВ. Смещение мембранного потенциала после достижения пика в сторону гиперполяризации, вероятно, является результатом активации калиевой проводимости.

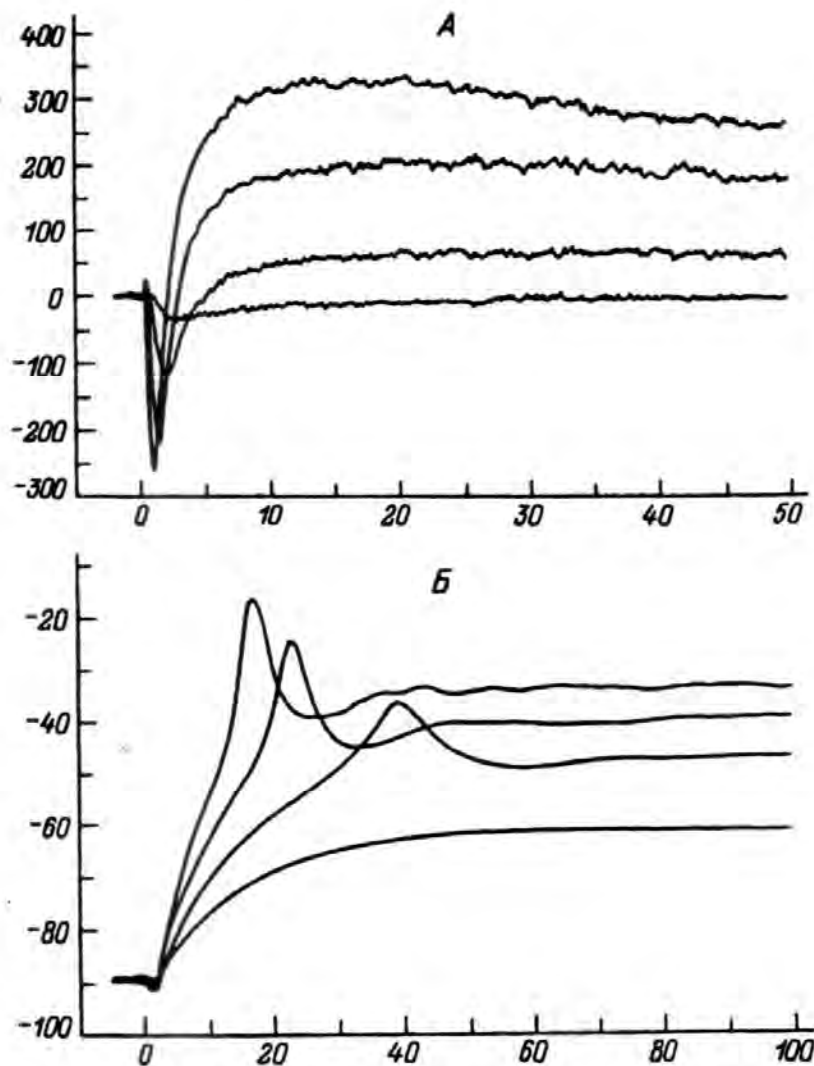


Рис. 3. Суммарные ионные токи в условиях фиксации потенциала (А) и изменения мембранного потенциала в условиях фиксации тока (Б) в миоците 7-го дня культивирования.

По оси ординат: на Б — мембранный потенциал, мВ. Постоянный гиперполяризующий ток — 50 пА, стимулирующие деполаризующие токи — 50, 100, 150 и 200 пА. Собственный мембранный потенциал клетки перед началом регистрации: -65 мВ. Критический уровень деполаризации -48. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

На более поздних стадиях развития (после 3-го дня) суммарный ионный ток содержит компонент входящего I_{Na} , максимальное значение которого сравнимо по амплитуде или превышает значения I_K , регистрируемые при тестирующем потенциале ± 10 мВ. Ответы клетки в условиях фиксации тока при значениях стимулирующего тока более 50 пА имеют характер, типичный для натриевого потенциала действия (рис. 3).

Динамика изменений максимального значения натриевого тока и амплитуды выходящего калиевого тока, регистрируемого при значениях тестирующего потенциала около 0 мВ (± 10 мВ), приведены на рис. 4, А. Для всех сроков культивирования приведены результаты усреднения не менее чем по 10 клеткам (среднее \pm стандартная ошибка). Несомненно, что количественные изменения амплитуды I_{Na} значительно более выражены: от 2-го к 7-му дню культивирования происходит увеличение максимальных значений от 180 до 2200 пА, тогда как амплитуда I_K возрастает от 600 до 1800 пА за тот же период. Кроме того, наиболее существенное увеличение амплитуды I_K приходится на период от 2-го до 4-го дня.

В отличие от I_{Na} , основные кинетические характеристики которого остаются неизменными, калиевые токи в процессе культивирования претерпевают не только

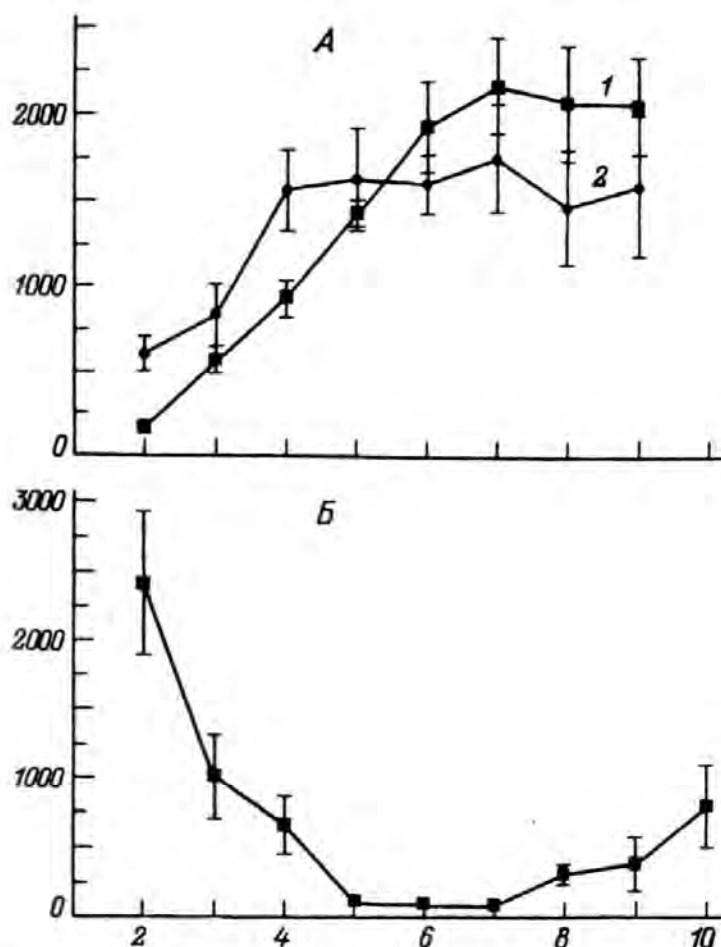


Рис. 4. Максимальная амплитуда потенциалзависимых натриевых токов (1) и калиевых токов (2) при деполяризующем смещении вблизи 0 мВ (А) и скорость инактивации суммарного калиевого тока (Б) в зависимости от срока культивирования клеток ($n = 10$).

По оси абсцисс — время культивирования после прикрепления клеток, дни; по оси ординат: на А — ток, пА; на Б — средние значения времени инактивации калиевых токов до уровня 0.5 от пикового значения при тестирующих потенциалах ± 10 мВ, мс.

количественные, но и качественные изменения. На уровне анализа суммарного I_K эти изменения относятся в основном к скорости инактивации (рис. 4, Б): у миоцитов более поздних сроков наблюдается значительно более быстрая инактивация, в то время как по скорости активации различий практически не наблюдается. Кроме того, доля неинактивирующегося I_K (или инактивирующегося чрезвычайно медленно, $I_{K\infty}$) падает от 35—50 % на 2-е сутки до 10—15 % к 6—7-м суткам. На рис. 5, В представлены кривые $I_K(t) - I_{K\infty}$ в полулогарифмическом масштабе, нормированные к максимальному значению, соответствующие записям токов на рис. 5, А, Б, зарегистрированным при тестирующем потенциале 0 мВ. Сплошные линии соответствуют аппроксимации кривых экспоненциальной функцией $[A_0 \cdot \exp(-t/\tau)]$. Экспериментальные данные для миоцита 7-го дня достаточно хорошо описываются экспоненциальной функцией при значении $\tau = 105$ мс. Инактивация I_K у миоцита 3-го дня значительно более медленная ($\tau = 1080$ мс). Очевидно, что кинетика инактивации не является моноэкспоненциальной, но может быть удовлетворительно аппроксимирована суммой двух экспонент ($A_1 = 0.7$, $\tau_1 = 1200$ мс; $A_2 = 0.3$, $\tau_2 = 180$ мс). В большинстве экспериментов кинетика инактивации не являлась моноэкспоненциальной. В связи с этим в качестве характеристики скорости инактивации в целом было выбрано время спада до половинного уровня от максимального значения I_K ($t_{0.5}$). Средние значения этого параметра уменьшаются более чем в 25 раз от 2-го до 5-го дня культивирования (рис. 4, Б) и остаются практически неизменными вплоть до 8-го дня.

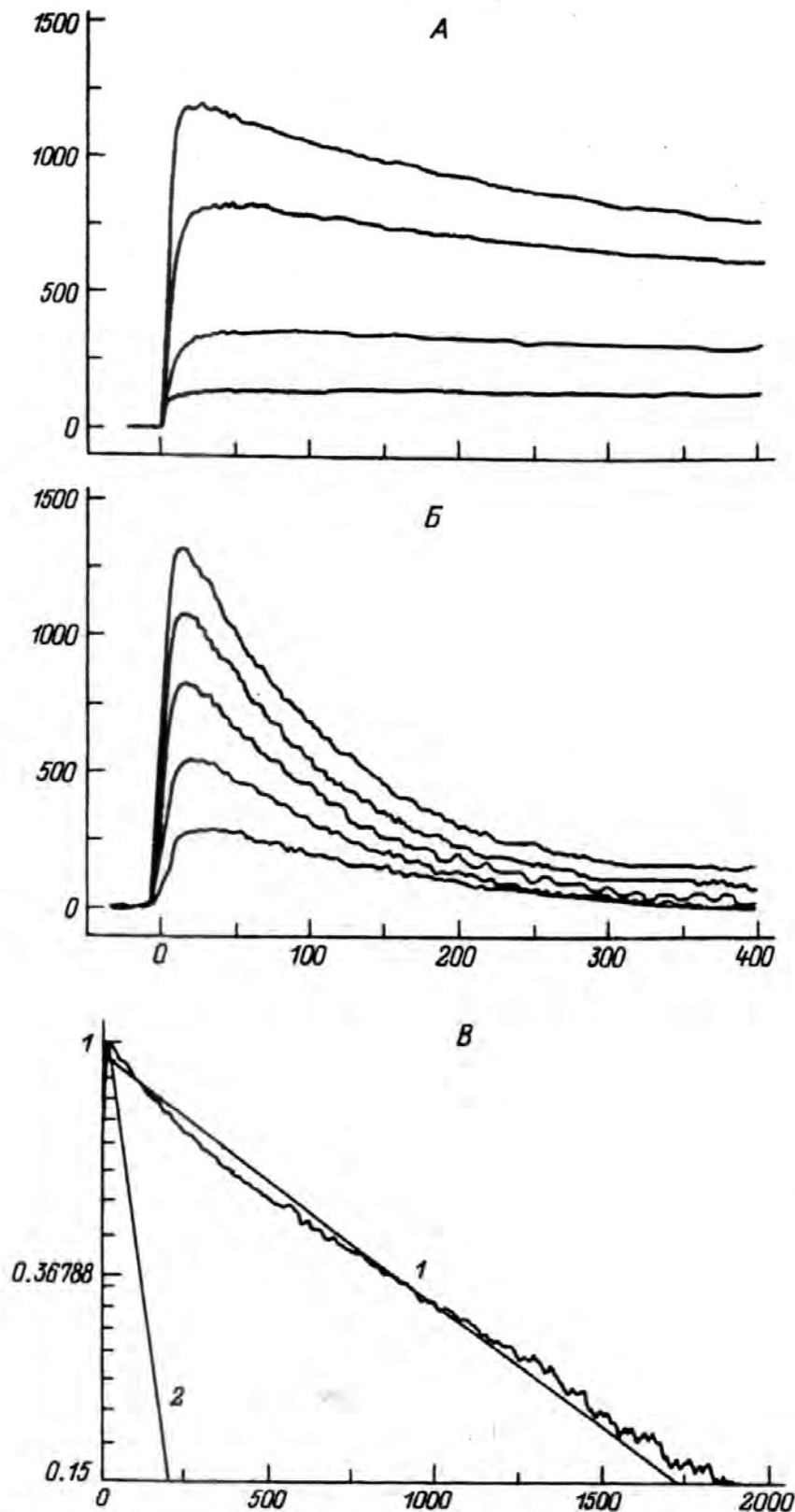


рис. 5. Калиевые токи при деполяризации в миоцитах 3-го (А) и 7-го (Б) дней культивирования. По оси абсцисс — время, мс; по оси ординат: на А, Б — ток, пА (поддерживаемый потенциал -80 мВ; значения тестирующих потенциалов: для А от -30 до 0 мВ, для Б от -40 до 0 мВ с шагом 10 мВ. Наружный раствор содержал 1 мкМ ТТХ и 300 мкМ нифедипина для устранения натриевых и кальциевых токов), на Б — в полупологарифмическом масштабе приведены кривые $I_K(t) - I_{K\infty}$, соответствующие записям токов на рис. 5, А (1) и 5, Б (2), зарегистрированным при тестирующем потенциале 0 мВ, нормированные к максимальному значению. Сплошные линии соответствуют экспоненциальным функциям с постоянными времени 1080 мс (1) и 105 мс (2).

Установленное нами значение собственного мембранного потенциала в стационарной фазе (41.0 ± 3.4 мВ) значительно ниже (по абсолютной величине), чем значение потенциала покоя у зрелых скелетных мышечных волокон лягушки (-95 мВ) [3, 17]. Известно, что потенциал покоя зрелых мышечных волокон позвоночных в значительной степени определяется высокой проницаемостью мембраны для ионов хлора [8, 17]. В выбранных нами экспериментальных условиях трансмембранный градиент ионов хлора близок к нулю, что может служить одной из причин для низких значений собственного мембранного потенциала в стационарной фазе. Однако во всех исследованных клетках различия между исходным и стационарным уровнем мембранного потенциала не превышали ± 15 мВ. Возможно, низкие значения мембранного потенциала являют собой общее свойство малодифференцированных одиночных одноядерных миоцитов, так как в ряде работ, выполненных на эмбриональных мышечных клетках позвоночных, было показано, что значительное увеличение мембранного потенциала достигается после слияния миоцитов и достижения миотрубок значительных размеров [13, 29, 31].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в период от 2-го к 7-му дню культивирования происходит увеличение интегрального Na^+ -тока (более чем в 10 раз) и K^+ -тока (примерно в 3 раза). Используя средние значения интегральных токов (рис. 4, А) и значения площади поверхности, рассчитанные по формуле (1), была произведена оценка плотности Na^+ (i_{Na}) и K^+ (i_{K}) токов (см. таблицу). На ранних стадиях культивирования (2-е сутки) плотность натриевого тока составила $7 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ мА/см², а калиевого — $24 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ мА/см². i_{Na} достигала максимального значения ($50 \pm 8 \cdot 10^{-3}$ мА/см²) на 7-е сутки. i_{K} достигала максимума к 4-м суткам и составляла $45 \pm 8 \cdot 10^{-3}$ мА/см², что значительно (в 40—300 раз) меньше, чем в зрелых мышечных волокнах. Имеющиеся в литературе данные о плотности Na^+ - и K^+ -токов у зрелых мышечных волокон в расчете на единицу площади поверхностной мембраны несколько различаются (в зависимости от конкретного типа исследуемых мышц, используемой методики, условий регистрации) и составляют 1—3 мА/см² [3—5, 16, 23]. Значения удельной максимальной проводимости для Na^+ и K^+ (g_{Na} и g_{K}) в расчете на единицу площади поверхностной мембраны зрелых мышечных волокон, обеспечивающих количественное описание ионных токов в терминах модели Ходжкина—Хаксли [3, 5, 18], могут быть получены из формул

$$g_{\text{K}} = g_{\text{K}} \cdot n^4 \cdot k \quad (2)$$

$$g_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} \cdot m^3 \cdot h, \quad (3)$$

где n и m — переменные процесса активации для I_{K} и I_{Na} соответственно, k и h — переменные процесса инактивации соответственно для I_{K} и I_{Na} .

Аналогичный анализ I_{Na} и I_{K} , зарегистрированных в наших экспериментах, показал, что величина g_{Na} возрастает от 0.55 до 3.9 мС/см², а величина g_{K} — от 0.45 до 1.3 мС/см² со 2-го к 7-му дню культивирования. Таким образом, их соотношение не превышает 3 (см. таблицу).

Ранее нами было показано, что все основные кинетические и фармакологические характеристики I_{Na} остаются неизменными в течение всего срока культивирования и близки к таковым для зрелых мышечных волокон [21]. Это позволяет считать, что натриевый ток в эмбриональных миоцитах обеспечивается функционированием однородной популяции каналов, по совокупности свойств идентичных натриевым каналам зрелой мышцы. Тогда различия в плотности натриевого тока и удельной максимальной проводимости непосредственно отражают различия плотности натриевых каналов в поверхностной мембране между зрелым мышечным волокном и эмбриональными клетками. Таким образом, плотность Na^+ -каналов в эмбриональных миоцитах значительно ниже, чем в зрелых мышечных волокнах. Аналогичные результаты были получены на эмбриональных скелетно-мышечных клетках цыпленка

[13]. Данные этой работы свидетельствуют, что значительное увеличение плотности Na^+ -каналов происходит только после слияния миоцитов в миотрубки и коррелирует с увеличением потенциала покоя.

Изменения мембранного потенциала в ответ на фиксированное смещение стимулирующего тока существенным образом различаются у миоцитов ранних и поздних сроков культивирования. Если для ранних сроков характерным является пассивный электротонический ответ (либо подпороговый ответ), то на поздних сроках с увеличением амплитуды стимулирующего тока можно проследить изменение ответа от пассивного до генерации потенциала действия. Значение собственного мембранного потенциала в обоих случаях были близки (около -50 мВ), и постоянный потенциал в результате приложения постоянного гиперполяризующего тока поддерживался на уровне -90 мВ. Ответ клетки на приложение стимула, сопоставимый с потенциалом действия, мы наблюдали у 30 % клеток в диапазоне от 4-го до 8-го дня культивирования. Наличие потенциала действия зависело от плотности тока Na^+ ($i_{\text{Na}} > 35 \pm 8 \cdot 10^{-3}$ мА/см²), а основные его параметры, кроме того, от соотношения $i_{\text{Na}}/i_{\text{K}}$. У клеток поздних стадий, на которых отсутствовал натриевый потенциал действия, характер ответа был близок к ответу клеток ранних стадий. Таким образом, в процессе развития одиночных миоцитов лягушки на более ранних стадиях дифференцировки происходит формирование механизма генерации натриевого потенциала действия, тогда как для развивающихся скелетно-мышечных клеток цыпленка было показано, что в эмбриогенезе кальциевый ответ возникает раньше натриевого потенциала действия [19].

I_{K} в процессе культивирования претерпевает более сложные изменения, чем увеличение интегральной проводимости. Ранее нами было описано 9 компонентов I_{K} , различающихся по времени достижения пика: быстрая группа (5 компонентов) с временем достижения пика менее 70 мс и выраженной инактивацией, а также медленная группа с медленной инактивацией (или ее полным отсутствием) и временем достижения пика 1—7 с [21]. В эмбриональных клетках различного происхождения и клетках тканей в процессе постнатального эмбриогенеза также отмечается присутствие калиевых каналов, по числу типов или характеристикам отличных от K^+ -каналов в зрелых тканях [9, 34, 37]. При этом изменение «набора» и/или смена доминирующего типа коррелирует с критическими стадиями эмбрио- или морфогенеза [9, 20]. В соответствии с полученными нами данными наибольшее многообразие K^+ -каналов и наиболее значительное увеличение интегральной калиевой проводимости приходится на 3—4-й дни культивирования, т. е. на временной интервал, соответствующий слиянию миоцитов в миотрубки при определенных условиях. Вероятно, присутствие калиевых каналов с широким спектром кинетических характеристик при низком соотношении $g_{\text{Na}}/g_{\text{K}}$ снижает вероятность спонтанной генерации потенциалов действия и, следовательно, самопроизвольных сокращений.

Суперсемейство потенциалзависимых калиевых каналов включает в себя большое число типов с широким спектром кинетических и фармакологических характеристик. Молекулярно-генетической основой этого многообразия является существование нескольких локусов, контролирующих синтез α -субъединиц K^+ -каналов [26—28, 32, 35]. Разнообразие в пределах семейства определяется большим числом вариантов альтернативного сплайсинга для каждого из локусов, формирования канала как гомо- или гетеротетрамера [25] и модификацией канала в результате интеграции с инактивационной β -субъединицей [26, 36], а также модулирующими влияниями различного происхождения [7, 11]. Компоненты, входящие в состав быстрой фазы I_{K} , в миоцитах имеют идентичные фармакологические свойства и качественно сходные характеристики активации [2, 22], потому скорее всего являются подтипами одного семейства. Увеличение частоты встречаемости отдельных компонентов быстрого I_{K} свидетельствует о повышении уровня экспрессии каналов всех типов. Последующее уменьшение по ходу развития частоты встречаемости компонентов 65, 620, 630, 650 на фоне относительно стабильных величин i_{K} наиболее вероятно является результатом посттрансляционной модификации каналов одного семейства.

Авторы выражают благодарность д. б. н. Б. В. Крылову, к. б. н. С. А. Подзоровой, Ю. Ю. Вилину за предоставленную возможность проведения части экспериментов на базе лаборатории рецепции Института физиологии им. И. П. Павлова РАН и использования разработанной ими программной системы автоматизации научных исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 96-04-50608).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Крылов Б. В., Подзорова С. А., Вилин Ю. Ю. Кинетика инактивации натриевых каналов в сенсорных нейронах зависит от буфера водородных ионов. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 82 (7) : 1—10. 1996.
- [2] Лукьяненко В. И., Катина И. Е., Наследов Г. А. Влияние блокаторов кальциевого тока на потенциалозависимые калиевые токи развивающихся в культуре скелетномышечных клеток лягушки. ДАН. 338 (1) : 119—121. 1994.
- [3] Adrian R. H., Chandler W. K., Hodgkin A. L. Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. J. Physiol. (L.). 208 : 607—644. 1970.
- [4] Adrian R. H., Chandler W. K., Hodgkin A. L. Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. J. Physiol. (L.). 208 : 645—668. 1970.
- [5] Adrian R. H., Peachey L. D. Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle. J. Physiol. (L.). 235 : 103—131. 1973.
- [6] Almers W., Palade P. T. Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with vaseline-gap technique. J. Physiol. (L.). 312 : 159—176. 1981.
- [7] Breitweiser G. E. Mechanisms of K⁺ channel regulation. Membrane Biol. 152 : 1—11. 1996.
- [8] Bretag A. H. Muscle chloride channels. Physiol. Rev. 67 : 618—724. 1987.
- [9] Davies M. P., An R. U., Doevendas P., Kubabak S., Chien K. R., Kass R. S. Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. Circulation Res. 78 (1) : 15—25. 1996.
- [10] DeCino P., Kidokoro Y. Development and subsequent neural tube effects on the excitability of cultured *Xenopus* myocytes. J. Neurosci. 5 (6) : 1471—1482. 1985.
- [11] Ernsberger U., Spitzer N. C. Convertible modes of inactivation of potassium channels in *Xenopus* myocytes differentiating in vitro. J. Physiol. (L.). 484 (2) : 313—329. 1995.
- [12] Freed J. J., Mezger-Freed L. Culture methods for anuran cells. In: Methods in cell physiology. Ed. D. M. Prescott. N. Y. Acad. Press. 1970.
- [13] Frelin C., Lombet A., Vigne P., Romey G., Lazdunski M. The appearance of voltage-sensitive Na⁺ channels during the in vitro differentiation of embryonic chick skeletal muscle cells. J. Biol. Chem. 256 (23) : 12355—12361. 1981.
- [14] Gilbert R., Moody-Corbett F. Four outward potassium currents in *Xenopus* skeletal muscle cells in culture. Can. J. Physiol. Pharmacol. 67 (5) : Axiii—Axiv. 1989.
- [15] Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch. 391 (1) : 85—100. 1981.
- [16] Hille B., Campbell D. T. An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. J. Gen. Physiol. 67 : 265—293. 1976.
- [17] Hodgkin A. L., Horovicz P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J. Physiol. (L.). 148 : 127—160. 1959.
- [18] Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. (L.). 117 : 500—544. 1952.
- [19] Kano M. Development of excitability in embryonic chick skeletal muscle cells. J. Cell. Physiol. 86 : 503—510. 1975.
- [20] Kilborn M. J., Felida D. A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. J. Physiol. (L.). 430 : 37—60. 1990.
- [21] Lukyanenko V. I., Katina I. E., Nasledov G. A., Lonsky A. V. Voltage dependent ionic currents in frog cultured myocytes. Gen. Physiol. Biophys. 12 : 231—247. 1993.
- [22] Lukyanenko V. I., Katina I. E., Nasledov G. A., Terentyev D. A. Pharmacological analysis of voltage-dependent potassium currents in cultured skeletal myocytes of the frog *Rana temporaria*. Gen. Physiol. Biophys. 14 : 525—534. 1995.

- [23] *Lynch C.* Ionic conductances in frog short skeletal muscle fibres with slow delayed rectifier currents. *J. Physiol. (L.)*. 386 : 359—392. 1985.
- [24] *McCormack K., Lin J. W., Iverson L. E., Rudy B.* Shaker K⁺ channel subunits form heteromultimeric channel with novel functional properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 : 1361—1371. 1990.
- [25] *Murell-Landago R. D., Aldrich R. W.* Interaction of amino terminal domains of shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J. Gen. Physiol.* 102 : 947—975. 1993.
- [26] *Pongs O.* Molecular biology of voltage-dependent potassium channel. *Physiol. Rev.* 72 (4) : S69—S88. 1992.
- [27] *Pongs O.* Structure-function studies on the pore of potassium channels. *Membrane Biol.* 136 : 1—8. 1993.
- [28] *Ribera A. B.* A potassium channel gene is expressed at neural induction. *Neuron.* 5 : 691—700. 1990.
- [29] *Ritchie A. K., Fambrough D. M.* Electrophysiological Properties of the membrane and acetylcholine receptor in developing rat and chick myotubes. *J. Gen. Physiol.* 66 : 327—355. 1975.
- [30] *Stanfield P. R.* The effects of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J. Physiol. (L.)*. 209 : 209—229. 1970.
- [31] *Spector I., Prives J. M.* Development of electrophysiological and biochemical membrane properties during differentiation of embryonic skeletal muscle in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74 : 5166—5170. 1977.
- [32] *Takumi T.* A protein with a single transmembrane domain forms an ion channel. *NIPS.* 8 : 175—178. 1993.
- [33] *Taylor-Papadimitrou J., Rozengurt E.* The role of thymidine uptake in the control of cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 119 : 393—396. 1979.
- [34] *Valmier J., Richard S., Devis E., Nargeot J., Simonnoau M., Baldy-Moulinier M.* Dihydropyridines interact with calcium-independent potassium currents in embryonic mammalian sensory neurons. *Pflügers Arch.* 419 : 281—287. 1991.
- [35] *Warmke J. R., Drysdale R., Ganetzky B.* A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* ead locus. *Science (Wash. DC)*. 252 : 1560—1562. 1991.
- [36] *Wittka R., Stocker M., Boheim G., Pongs O.* Molecular basis for different rates of recovery from inactivation in the shaker potassium channel family. *FEBS Let.* 286 (1, 2) : 193—200. 1991.
- [37] *Zemková H., Vyskocil F., Tolar M., Vlachová V., Ujec E.* Single K⁺ currents during differentiation of embryonic muscle cells in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* 986 (1) : 146—150. 1989.

Поступила 18 XII 1996