

Бесплатно

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ  
И БИОХИМИИ имени И. М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

УДК 591.175 : 577.352.3/46+57.085.23 : 57.032

ЛУКЬЯНЕНКО  
Валерий Иванович

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ ТОКОВ  
МИОБЛАСТОВ ЛЯГУШКИ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ  
В КУЛЬТУРЕ

03.00.13 — физиология человека и животных

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД  
1991

Работа выполнена в лаборатории нейрорегуляции мышечной функции (зав. — доктор биологических наук Г. А. Наследов) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР и в лаборатории биофизики субклеточных структур (зав. — кандидат биологических наук А. В. Лонский) Физиологического института имени А. А. Ухтомского Ленинградского государственного университета.

Научный руководитель — доктор биологических наук Г. А. Наследов.

Официальные оппоненты — доктор биологических наук А. П. Наумов; доктор биологических наук Н. Я. Лукомская.

Ведущее учреждение — кафедра нормальной физиологии Ленинградского медицинского педиатрического института.

Защита диссертации состоится **19** ~~июня~~ 1991 г. в час. мин. на заседании Специализированного ученого совета (К-002.89.01) по присуждению ученой степени кандидата биологических наук в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР.

Адрес: 194223, Ленинград, проспект М. Тореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР.

Автореферат разослан **10** ~~июля~~ 1991 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета,  
кандидат биологических наук

Л. В. Зуева

Актуальность темы. Становление механизмов электровозбудимости в ходе онтогенетического развития организма — одна из важнейших проблем физиологии возбудимых мембран. Изучение развития электровозбудимости мембранны скелетного мышечного волокна (СМВ) с помощью эмбриофизиологического приёма исследования (Гинецинский, 1961) не только улучшает понимание физиологии проводящей функции мышечной мембранны, но и позволяет определить некоторые особенности ее становления в миогенезе и в эволюции.

Первые исследования электровозбудимости мышечной ткани лягушки в ходе ее онтогенетического развития были проведены еще в 1947 году (Szerrenvol). Возможности экспериментаторов были существенно расширены с разработкой методов монослоистого культивирования эмбриональной мышечной ткани (Colen, 1972) и методов измерения трансмембранных ионных токов при фиксации потенциала на мемbrane клеток (Hamill et al., 1981). Исследование функционирования ионных каналов на самых ранних стадиях миогенеза, определение набора функционирующих каналов и изучение закономерностей его изменения в миогенезе позволяет лучше понять особенности функционирования этих каналов у развивающихся волокон и правильно оценить связи между работой этих каналов и различными проявлениями функционирования мышечных клеток. Произвести качественную регистрацию интегральных ионных токов в процессе дифференцировки миобласта позволяет использование культуры одиночных миобластов, поскольку, как известно, слившиеся миобласти проходят те же стадии развития, что и клетки, слившиеся в миотрубки, но при этом сохраняют пригодную для фиксации потенциала на мемbrane целой клетки форму (Zemkova et al., 1989).

Наиболее подходящей для изучения представляется культура эмбриональной мышечной ткани лягушки. Методика ее культивирования сравнительно проста и не требует использования дефицитного оборудования. Кроме того, как объект исследования СМВ лягушки наиболее полно изучено по сравнению с СМВ других животных.

Таким образом, изучение закономерностей изменения качественного и количественного состава потенциалозависимых ионных токов и их характеристик в процессе развития миобласта в условиях культивирования не только поможет лучше понять значение ионных токов для процессов возбуждения и сокращения на различных этапах миогенеза, но и будет способствовать более четкому установлению закономерностей эволюции проводящей функции мышечной мембранны.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - выявление особенностей ионной проводимости мембранны скелетного мышечного волокна лягушки на ранних этапах его онтогенетического развития.

Задача исследования - произвести феноменологический анализ набора потенциалзависимых интегральных ионных токов миобласта лягушки, развивающегося в условиях культивирования.

Научная новизна. Впервые были исследованы кинетические и фармакологические характеристики интегральных потенциалзависимых ионных токов скелетной мышечной клетки лягушки *Rana temporaria* на ранних стадиях миогенеза в культуре. Показано, что миобласти лягушки, развивающиеся в культуре, обладают количественно и качественно изменяющимся в ходе миогенеза набором трансмембранных потенциалзависимых ионных токов через натриевые, кальциевые и калиевые ионные каналы.

Впервые показано существование на различных стадиях развития миобласта в культуре по крайней мере шести типов калиевого интегрального ионного тока. Также впервые приведены данные в пользу существования двух типов медленных кальциевых токов через дигидробиридин-чувствительные кальциевые каналы, различающиеся только по временным кинетическим параметрам. На основании сопоставления их характеристик с литературными данными для тонических и фазных СМВ лягушки предполагается существование миогенных механизмов дифференциации миобласта в тот или иной тип волокна.

Научно-практическое значение. Полученные данные дают существенный материал для понимания эволюции проводящей функции мышечной мембрани и развития процессов возбуждения и сокращения на ранних этапах миогенеза.

В работе впервые использована методика культивирования одиночных миобластов лягушки. Результаты исследования подтверждают, что культивирование одиночных миобластов лягушки дает уникальную возможность широкого изучения онтогенетических аспектов процессов возбуждения и сокращения.

Апробация работы. Основные положения работы были доложены и обсуждены: на IX Всесоюзном симпозиуме "Биофизика и биохимия биологической подвижности" (Тбилиси, 1990), на межлабораторном собрании сотрудников ИЭФИБ им. И.М.Сеченова АН СССР (Ленинград,

1990), на заседании Ленинградского отделения всесоюзного физиологического общества им. И.П.Павлова (Ленинград, 1991), на XI Всесоюзном симпозиуме "Физиология медиаторов. Периферический синапс" (Казань, 1991). По материалам диссертации опубликовано 4 работы.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 рисунками и 4 таблицами. Список литературы содержит 196 источников отечественных и зарубежных авторов.

#### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этом разделе была проанализирована литература, посвященная вопросам применения культуры эмбриональной мышечной ткани различных животных в физиологическом эксперименте, а также на основании анализа соответствующей литературы охарактеризованы все известные типы трансмембранных потенциалзависимых ионных токов как СМВ взрослых лягушек, так и миобластов, развивающихся в условиях культивирования. Кроме того, приводится анализ литературы, посвященной участию кальциевых ионных токов в активации сокращения СМВ и развивающихся в культуре миобластов различных животных.

#### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### I. Выращивание первичной культуры мышечной ткани лягушки.

Для получения первичной монослойной культуры мышечной ткани производилось искусственное осеменение икры лягушек *Rana temporaria* и отбирались эмбрионы на 27-28 стадиях развития (Дабаян, Слепцова, 1975). После стерилизационной обработки производилось хирургическое выделение дорзального участка эмбриона, включающего в себя мезодерму и нервную трубку. Выделенные участки эмбрионов переносились в диссоциирующий раствор следующего состава (мг/мл): 2943 NaCl, 50 KCl, 1300 NaHPO<sub>4</sub>, 116 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 NaHCO<sub>3</sub>, 700 EDTA. Через 10 минут инкубации можно было легко отделить эпидерму, клетки которой не должны были попасть в культуральную питательную среду (ПС). Далее смесь диссоциированных

клеток мезодермы и нервной трубы переносилась в чашки Петри диаметром 40 мм, заполненные 5 мл ПС следующего состава: 55% среды №199м, 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина и 50  $\mu$ г/мл стрептомицина. Операционный раствор отличался от культурального пониженным (2%) содержанием сыворотки.

В одну чашку Петри высевались клетки одного эмбриона, после чего чашки помещались в стерильные условия и содержались в термостате при температуре +20 $^{\circ}$ С до эксперимента. Иногда для продления возможности экспериментирования часть чашек Петри с посевами, но еще не прикрепившимися клетками помещали на 5-7 суток в холодильник (+5 $^{\circ}$ С). В термостате прикрепление клеток к поверхности стекла происходило обычно через сутки. С этого момента отсчитывалось время культивирования. Основная часть опытов была проведена в течение первых шести суток.

После прикрепления клеток к субстрату их можно легко дифференцировать визуально. Прикрепившиеся миобlastы имеют веретеновидную форму, а их размеры варьируют от 1,5 до 2 мкм в толщину и от 15 до 40 мкм в длину. К шестым суткам культивирования форма миобластов становится менее выраженной, а размеры возрастают в 1,5-2 раза. Для регистрации ионных токов использовали одиночные миобlastы, которые не имели видимых контактов с другими клетками ( $n = 193$ ).

## 2. Регистрация потенциалозависимых ионных токов миобlasta.

Регистрация трансмембранных потенциалозависимых ионных токов миобластов производилась от целой клетки в условиях плотного контакта (*whole-cell*). Для фиксации потенциала на мемbrane исследуемой клетки использовалась стандартная принципиальная схема (Hamill et al., 1981). Пропорциональное протекающему через мембрану току выходное напряжение усиливалось и через АЦП вводилось в ЭВМ. Преобразователь ток-напряжение, фильтр Бесселя второго порядка (полоса пропускания - 3 кГц), ЭВМ, формирователь импульсов для ускорения установления фиксированного напряжения на мембране клетки, ЦАП и АЦП собраны на кафедре биофизики ЛГУ из деталей отечественного производства.

В качестве основного наружного использовался раствор следующего состава (мМ): 120 NaCl, 1,5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 8 Нерес (КОН до pH = 7,4). Внутрипипеточные растворы имели следующие составы (мМ): 1) для регистрации выходящих ионных токов: 110 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>,

1 MgSO<sub>4</sub>, 10 EGTA, 8 Нерес (КОН до pH = 7,2);  
2) для регистрации входящих ионных токов состав раствора тот же, но вместо хлорида калия использовали хлорид цезия.

Приведенные составы растворов соответствуют нормальным условиям регистрации. В качестве дополнительных для изучения кальциевых ионных токов использовались наружные растворы с различными концентрациями ионов бария (2, 8 и 80 мМ). Кроме того, при необходимости в наружных растворах использовались следующие вещества: верапамил, 4-аминопиридин (4-АП), Д-600 (метоксиверапамил), тетродотоксин (ТТХ), тетраэтиламмоний (ТЭА), дигидропиридиновый агонист кальциевых каналов ССР, растворенный в диметилсульфоксиде, а также соли: CoCl<sub>2</sub> и Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.

Постоянный поддерживаемый потенциал ( $E_0$ ) был равен -80 мВ. Значения кондиционирующего ( $E_1$ ) и тестирующего ( $E_2$ ) потенциалов изменяли в пределах -70 - +30 мВ, а их длительность от 100 мс до 10 с. Частота предъявления тестирующих программ не превышала 1 в минуту. Считывание данных производилось с интервалами - 0,1 мс (в первые 50 мс стимуляции), 10 мс (от 50 мс до 2 с стимуляции) и 100 мс (от 2 с до 7 с стимуляции). Опыты проводились при температуре 18-20 $^{\circ}$ С.

Для описания потенциалозависимости и кинетики исследуемых токов использовались формальные выражения модели Ходжкина-Хаксли и её модификации для кальциевых каналов (Костюк, 1986). Оценка относительной ионной избирательности калиевых каналов проводилась с помощью уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца. Потенциал реверсии определяли по мгновенным вольт-амперным характеристикам (ВАХ). Сплошные линии на графиках никовой хордовой проводимости и стационарной инактивации проводились в соответствии с уравнением распределения Больцмана, причем, параметры  $K$  и  $E_{0,5}$  подбирались по методу наименьших квадратов с поиском по методу градиентного спуска. Расчеты проводились на ЭВМ.

Факты сокращения миобlasta фиксировались по его отрыву от кончика микропипетки во время подаваемого стимула, что находило отражение в изменении картины регистрируемого ионного тока.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### I. Входящие потенциалозависимые ионные токи.

Для изучения входящих ионных токов отводящую пипетку заполняли раствором, который содержал 110 мМ хлорида цезия, что в зна-

чительной степени снижало выходящий ток. При этом, как правило, отмечали существование двух компонентов входящего тока: быстро-го высокоамплитудного и низкоамплитудного медленного.

**Натриевый ток.** Поскольку самый быстрый компонент входящего тока блокировался ТТХ в концентрациях до 2 мкМ ( $n = 27$ ), исчезал при удалении ионов натрия из наружного раствора ( $n = II$ ), никогда не наблюдался в отсутствии ионов натрия и появлялся при их добавлении в наружный раствор ( $n = 3$ ), то он был квалифицирован как натриевый ток.

Натриевый ионный ток был зарегистрирован у 70 исследованных миобластов. Он достигал измеримого уровня при деполяризации мембранны миобласти в среднем до -40 мВ. Диапазон времени достижения пиковых значений — от 1,5 до 16,8 мс от начала подачи  $E_2$ , а постоянной времени инактивации — от 0,4 до 24,4 мс при различных значениях  $E_2$  (рис. I). Натриевый ток максимальной величины наблюдался при  $E_2 = -16 \pm 1,9$  мВ. ВАХ и графики потенциалозависимых кинетических характеристик натриевого тока приведены на рисунке IБ. Возможные изменения кинетических характеристик натриевого тока в миогенезе проследить не удалось из-за больших величин амплитуды тока на поздних стадиях культивирования. Однако, следует отметить, что в первые сутки культивирования он был зарегистрирован только у 15% исследованных миобластов, но к 5 суткам уже 80% клеток имело выраженный натриевый ток. При этом отмечен значительный рост количества миобластов, имеющих натриевый ток, на 4-5 сутки развития миобластов в культуре.

**Кальциевый ток.** Более медленный компонент входящего тока не блокировался ТТХ. После дополнительной проверки он был квалифицирован как кальциевый ток ( $I_{Ca}$ ) через дигидропиридин-чувствительные Ca-каналы (рис. 2). Такой вывод был сделан на основании следующих данных: 1) амплитуда этого компонента увеличивается при повышении концентрации ионов кальция ( $n = 7$ ) или бария ( $n = 51$ ) в наружном растворе; 2) этот компонент существенно или полностью ингибируется известными специфическими блокаторами Ca-каналов в соответствующих их действию концентрациях: ионами кобальта ( $n = 13$ ) и кадмия ( $n = 2$ ) в концентрации 2 мМ, верапамилом в концентрациях от 0,1 до 0,4 мМ ( $n = 9$ ) и Д-600 в концентрациях от 0,5 до 3 мкМ ( $n = 4$ ); 3) амплитуда медленного компонента увеличивалась в несколько раз при добавлении в наружный раствор 20-100 мкМ CGP — специфического агониста Ca-каналов

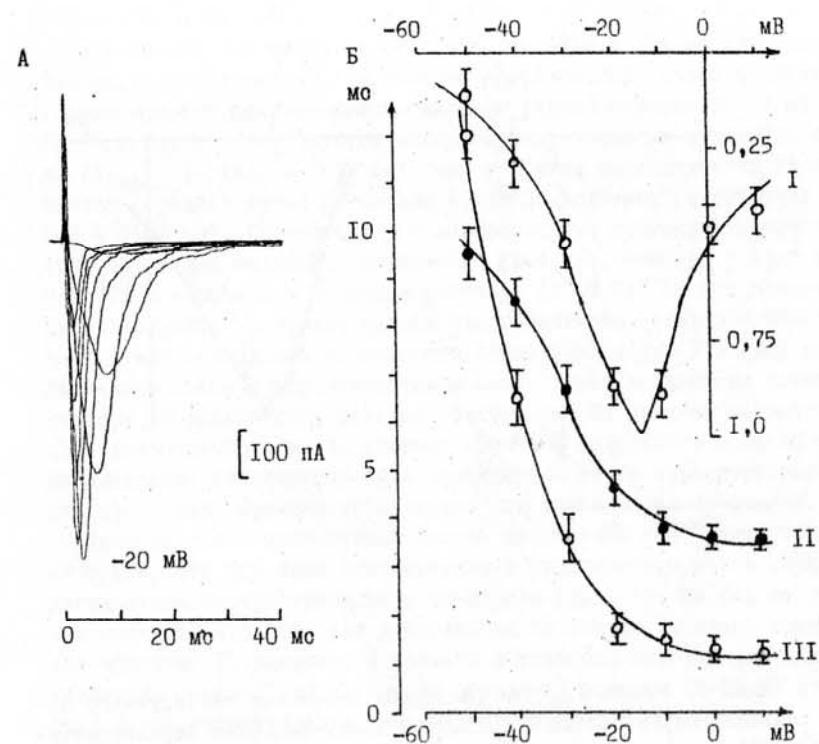


Рис. I. Потенциалозависимость кинетических характеристик натриевого тока.

А — записи натриевого тока при различных значениях тестирующего потенциала ( $E_2$ ) (от -60 до +20 мВ); миобласт № 4.25.5 ;  
 Б — усреднённые по данным 5-10 опытов значения кинетических характеристик: I — вольт-амперная характеристика, II — время достижения максимальных значений амплитуды тока, III — постоянная времени инактивации; вертикальные отметки — ошибки соответствующих средних.

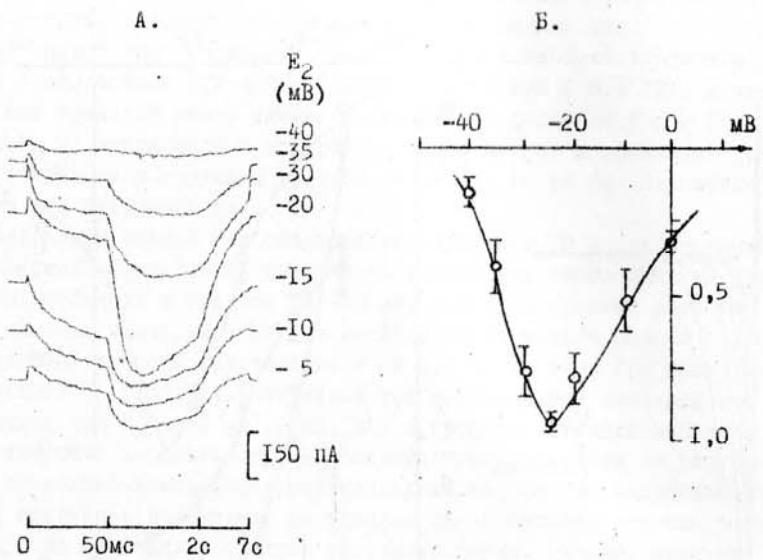


Рис. 2. Записи  $I_{Ca}$  при указанных значениях тестирующего потенциала (А) (миобласт № 3.23.5) и вольт-амперная характеристика (Б), построенная по усредненным данным 15 опытов.

В наружном растворе – 2 мМ  $Ca^{++}$ . Считывание данных производилось с интервалами 0,1 мс (в первые 50 мс стимуляции), 10 мс (от 50 мс до 2 с стимуляции) и 100 мс (от 2 с до 7 с стимуляции). На рисунке Б по оси ординат – значения пиковых амплитуд, нормированные к максимальному значению; вертикальные отметки – ошибки соответствующих средних.

L-типа ( $n = 24$ ).

Выраженный ток через  $Ca$ -каналы наблюдался у 114 миоцитов. Однако, у 12 из них он был достоверно ( $P < 0,001$ ) более медленным (среднее время активации в нормальном наружном растворе (2 мМ  $Ca^{++}$ ) и  $E_2$ , соответствующем максимальному значению амплитуды тока ( $E_{2\max}$ ) –  $1431 \pm 78,5$  мс), чем у других исследованных нами клеток (среднее время активации в тех же условиях регистрации –  $402 \pm 75,8$  мс). Кроме того у 5 миоцитов на записях входящего тока видны два медленных компонента (рис. 3), причем, у двух миоцитов в нормальном наружном растворе (2 мМ  $Ca^{++}$ ), что исключает возможность трактовки такого одновременного появления компонентов как аномальной зависимости от мольной доли. Различий по фармакологическим характеристикам между двумя медленными компонентами входящего тока нами не обнаружено. По причине наложения двух компонентов и из-за влияния остатков выходящего ионного тока оказалось невозможным проанализировать такую характеристику как постоянная времени инактивации для токов через  $Ca$ -каналы.

Приведенные в диссертации данные по влиянию CGP свидетельствуют о том, что оба типа тока связаны с прохождением ионов через дигидропиридин-чувствительные  $Ca$ -каналы (рис. 3). Из тех же данных следует, что CGP при действии на  $Ca$ -каналы вызывает следующие эффекты: 1) уменьшение времени достижения пиковых значений амплитуды тока; 2) сдвиг порога появления тока на 15–20 мВ в сторону более отрицательных значений тестирующего потенциала.

Изучение суточной динамики доли миоцитов, имеющих выраженный  $I_{Ca}$  в нормальных условиях регистрации (2 мМ  $Ca^{++}$ ) показало, что уже в первые сутки после прикрепления более половины миоцитов (60%) имел хорошо выраженный  $I_{Ca}$  более быстрого типа, причем, процент таких клеток ежесуточно возрастал, и к 6 суткам  $I_{Ca}$  регистрировался у всех исследованных миоцитов.

Сокращения миоцитов, вызывавшие отрыв от кончика микропипетки, наблюдались уже со второго дня культивирования ( $n = 14$ ), но только при нормальном наружном растворе (2 мМ  $Ca^{++}$ ) без добавочных агентов и внутримикропипеточном растворе, содержащем вместо ионов калия ионы цезия (выходящий ток устраивался почти полностью). Сокращений в других условиях регистрации не происходило. Натриевый ток не оказывал заметного влияния на сокращаемость миоцита: он не был зарегистрирован у 62,5% клеток, сократившихся в момент подачи деполяризующего мембрану  $E_2$ . Не зарегистрировано сокра-

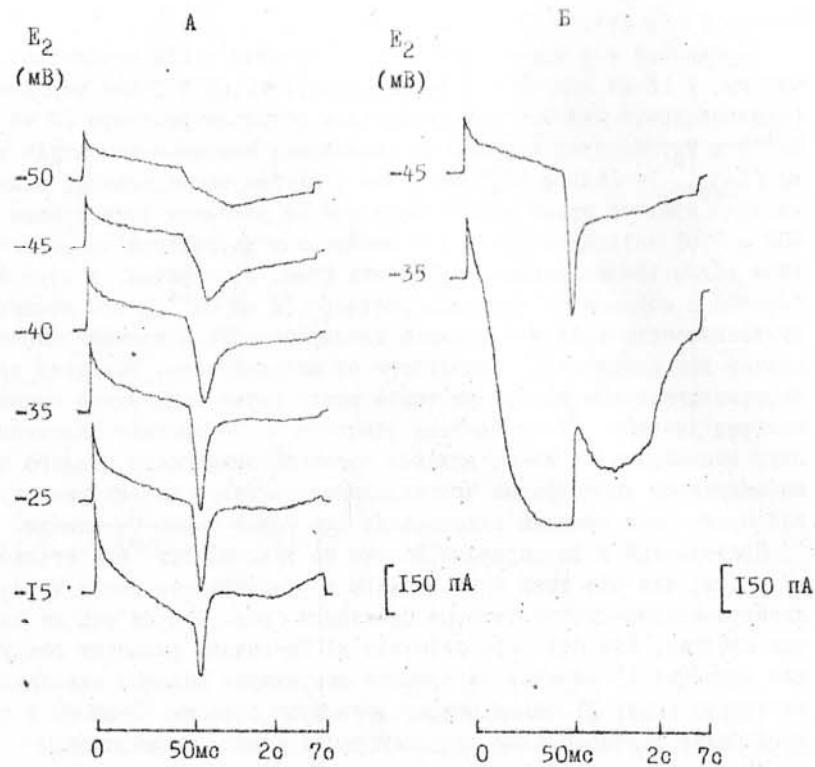


Рис. 3. Появление второго компонента медленного тока через кальциевые каналы с увеличением значения тестирующего потенциала ( $E_2$ ).

А - в наружном растворе 2 мМ  $\text{Ba}^{++}$  и 110 мМ ТЭА $^+$ ;  
Б - после добавления в наружный раствор 50 мкМ CGP.  
Интервалы считывания данных как на рисунке 2.  
Миобласт № 2.I6.6.

10

щений и в растворах с различными концентрациями ионов бария (в отсутствии ионов кальция).

Сокращения наблюдали только после пикового значения амплитуды  $I_{\text{Ca}}$  при различных значениях  $E_2$  (среднее значение  $E_2 = -25 \pm 3,5$  мВ).

## 2. Выходящие потенциалозависимые ионные токи миобласта.

Выходящий потенциалозависимый трансмембранный ионный ток миобласта был квалифицирован как калиевый по следующим причинам: 1) он исчезает почти полностью при замещении во внутренней среде ионов калия на ионы цезия без изменения концентраций других ионов ( $n = 100$ ); 2) он ингибитируется в значительной степени специфическими блокаторами калиевых каналов: ТЭАСІ в концентрации 30–110 мМ снаружи и 4-АП в концентрациях от 0,2 до 0,5 мМ снаружи и изнутри; 3) почти равная осмомолярность ионов хлора в наружном и внутрипипеточном растворах до минимума снижала возможность появления хлорных токов.

При анализе записей интегрального калиевого тока ( $I_K$ ) было выделено девять его компонентов, которые достоверно ( $P < 0,001$ ) отличались по времени достижения пиковых значений амплитуды при  $E_2 = -10$  мВ. Предлагаемые условные обозначения компонентов и соответствующие временные характеристики приведены в таблице I, при этом быстрыми предлагается считать компоненты, достигающие пиковых значений амплитуды при  $E_2 = -10$  мВ в течение первых 70 мс от начала стимуляции.

Иногда на некоторых стадиях развития миобласта или с помощью фармакологических агентов удавалось наблюдать один из компонентов  $I_K$ , что позволяло изучить потенциалозависимость некоторых кинетических характеристик (рис. 4А). Инактивационные кривые были построены исходя из величины амплитуды соответствующего компонента при различных  $E_1$ . Примеры записей тока в таком опыте приведены на рисунке 4Б.

Потенциал реверсии определяли по мгновенным ВАХ. Он не зависел от длительности постоянного  $E_1$  (30 или 150 мс) и в среднем был равен  $-77,5 \pm 0,54$  мВ. Зная значение потенциала реверсии легко вычислить значения пиковой хордовой проводимости. По полученным и усредненным значениям пиковой хордовой проводимости и стационарной инактивации были построены графики (пример на рисунке 4Б), сплошные линии на которых проведены согласно уравнению распределения Больцмана. Построение этих графиков позволило по-

ТАБЛИЦА I. Основные характеристики компонентов интегрального потенциалозависимого выходящего ионного тока миоblastов лягушки, развивающихся в культуре.

Тип компонента	Время активации при $E_2 = -10$ мВ	Характеристики потенциалозависимости			
		Диапазон (мс)	$M \pm m$ (мс)	Пиковая хордовая проводимость $K_E$ (мБ)	Стационарная инактивация $E_{0,5}$ (мВ)
65	25	4 - 8	$6,4 \pm 0,36$	-	$-55,0 \pm 2,1$
012	58	10 - 15	$12,8 \pm 0,18$	$-2 \pm 0,30$	$-61,0 \pm 1,3$
020	66	19 - 25	$21,4 \pm 0,21$	$-22 \pm 0,25$	$-8,9 \pm 0,20$
030	44	29 - 34	$30,4 \pm 0,19$	$-14 \pm 0,60$	$-7,7 \pm 0,55$
050	20	40 - 70	$49,0 \pm 1,39$	$-16 \pm 0,80$	$-11,4 \pm 0,85$
0190	9	110 - 250	$190,0 \pm 18,40$	-	-
0700	11	450 - 1110	$734,0 \pm 56,70$	$-18 \pm 0,80$	$-7,5 \pm 0,50$
M2000	7	1500 - 2550	$1865,0 \pm 165,00$	-	-
M	33	более 7000	-	$-44 \pm 0,20$	$-11,2 \pm 0,20$

д - количество регистраций;  $(M \pm m)$  - среднее значение и его ошибка; б - быстрый; м - медленный;  
 $\Sigma$  - параметр, отражающий крутизну кривой;  $E_{0,5}$  - потенциал, соответствующий середине кривой.  
 $E_{0,5}$  и  $\Sigma$  - параметры уравнения распределения Больцмана:  $\Sigma_b = I/(I + \exp(E - E_{0,5})/k)$ . Они приводятся с указанием предела, в котором теоретическая кривая описывает данные в рамках экспериментальной погрешности.

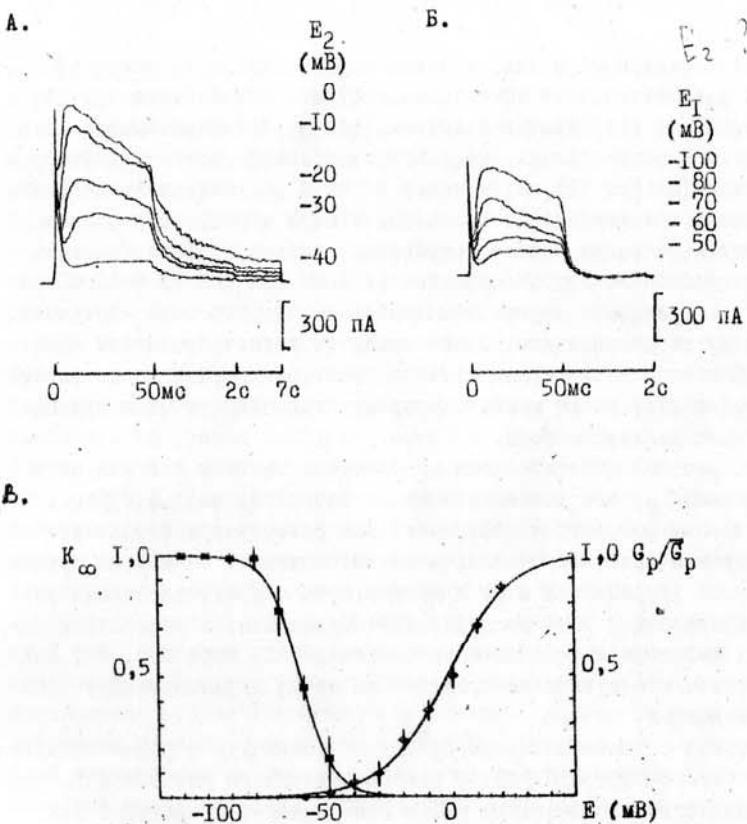


Рис. 4. Записи компонента типа BI2 интегрального выходящего ионного тока миоblastов лягушки, развивающихся в культуре, при различных значениях тестирующего (А) и кондиционирующего (Б) потенциалов и графики (В): кривая пиковой хордовой проводимости и инактивационная кривая.

Интервалы считывания данных как на рисунке 2. На рисунке В сплошные линии проведены в соответствии с уравнением распределения Больцмана; вертикальные отметки - ошибки соответствующих средних.

лучить дополнительные характеристики некоторых компонентов  $I_K$  (табл. I).

Что касается фармакологических характеристик компонентов  $I_K$ , то было отмечено, что компоненты, развивающиеся менее чем за 50 мс, более устойчивы к действию 4-АП в указанных выше концентрациях. В свою очередь, медленные компоненты более устойчивы к действию ТЭА (до 111 мМ) и ионов бария в концентрациях 8-30 мМ. При этом, три компонента  $I_K$ : mI90, m700 и m2000, встречались сравнительно редко и регистрировались только на фоне больших концентраций блокирующих агентов (111 мМ ТЭА и(или) 8-30 мМ  $Ba^{++}$ ), устраивавших другие компоненты выходящего тока. Хотя они, как и другие компоненты, практически не регистрировались при использовании во внутривипеточном растворе хлорида цезия вместо хлорида калия, мы не можем с уверенностью отнести их к отдельным типам калиевого тока.

По суточной динамике доли миобластов, имевших тот или иной выраженный  $I_K$ , все компоненты можно разделить на две группы. Одна из них (65, 620 и 630) имеет пик регистрируемости к третьим суткам культивирования, а затем "исчезает" к шестым суткам.  $I_K$  другой группы (612 и M) к шестым суткам культивирования регистрировались у 100% исследованных миобластов в нормальных условиях регистрации. Исключение составляет  $I_K$  типа 650, так как его судьба к 6 суткам не проясняется из-за недостаточного количества данных.

В связи с вышеизложенным нельзя не упомянуть о факте исчезновения самого быстрого (65) и самого медленного (M) типов  $I_K$  после воздействия на культуру ткани пониженной температуры. Так, миобlastы, которые до прикрепления к поверхности стекла находились в холодильнике (+5°C) в течение 5-7 суток (n = 24) вообще не имели тока типа M, а ток типа 65 был зарегистрирован только у одного такого миобlastа. На проявление других компонентов, как входящих, так и выходящих, токов предварительное выдерживание культуры при +5°C заметного влияния не оказывало.

Изменений основных характеристик по стадиям культивирования обнаружено не было, поскольку из-за одновременного присутствия (временного наложения) нескольких компонентов и невозможности их полного фармакологического разделения детальный анализ кинетических характеристик был весьма затруднен.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Натриевый ток.** Приведенные кинетические и фармакологические характеристики натриевого тока миобластов почти полностью совпадают с имеющимися в литературе соответствующими характеристиками натриевого тока СМВ взрослой лягушки, развившегося в организме (Adrian et al., 1970 a; Campbell, Hille, 1976; и др.). Исключение составляет более высокий порог появления выраженного тока в нашем эксперимента (-40 мВ) по сравнению с литературными данными для зрелых СМВ. Как высокий порог, так и постепенное увеличение суточной доли исследованных миобластов, имеющих выраженный натриевый ток, могут быть объяснены увеличением числа натриевых каналов в процессе развития миобlasta. То, что амплитуда натриевого тока может увеличиваться в результате повышения плотности натриевых каналов в мембране дифференцирующегося миобlasta лягушки было установлено Десино и Кидокоро (DeCino, Kido-koro, 1985). Естественно, что амплитуда натриевого тока, а следовательно, и его выраженность на фоне выходящего тока могла зависеть не только от плотности каналов в мембране, но и от сильно варьировавших размеров исследованных нами миобластов.

Почти полное отсутствие миобластов, имевших выраженный натриевый ток, в первые сутки развития и резкий рост доли таких миобластов на 4-5 сутки культивирования указывает на возможное существование стадии появления или резкого увеличения количества натриевых каналов в мембране миобlasta. Ранее в опытах с мечеными блокаторами натриевых каналов на культуре эмбриональной мышечной ткани цыпленка было показано, что натриевые каналы отсутствуют на ранних стадиях культивирования и появляются только на вторые-третьи сутки развития, причем, только к 5-7 суткам после прикрепления миобластов к субстрату количество каналов достигает максимальных величин (Frelin et al., 1981; Strichartz et al., 1983).

**Кальциевые токи.** Из зарегистрированных ранее в экспериментах на СМВ взрослых лягушек двух типов кальциевого тока (быстрого и медленного) в наших условиях проведения эксперимента был обнаружен только один — медленный кальциевый ионный ток через дигидропиридин-чувствительные  $Ca^{++}$ -каналы. В литературе описано несколько причин, по которым быстрый  $I_{Ca}$  может быть не замечен экспериментатором. Так, отмечалось, что быстрый  $I_{Ca}$  очень чувствителен к высоким концентрациям ТЭА и к гипertonичности наружного раствора

(Cota et al., 1983; Garcia, Stefani, 1987). Кроме того, известно, что амплитуда быстрого  $I_{Ca}$  в несколько раз ниже, чем у медленного  $I_{Ca}$ . В то же время, в нашем эксперименте редко встречались миобласты, которые имели достаточную для опыта в нормальных условиях регистраций амплитуду  $I_{Ca}$ . В случае недостаточной выраженности  $I_{Ca}$  мы заменяли наружный раствор, замещая при этом ионы кальция на ионы бария, а остальные катионы – на ТЭА<sup>+</sup>, что увеличивало амплитуду медленного входящего тока за счет устранения остатков  $I_K$  и более высокой проницаемости дигидропиридин-чувствительных каналов для ионов бария. Однако, как отмечалось выше, высокая концентрация ТЭА (у нас III мМ) способна ингибировать и без того низкоамплитудный быстрый  $I_{Ca}$ , а ионы бария не увеличивают амплитуду тока, идущего через каналы Т-типа. Следовательно, возможность регистрации быстрого  $I_{Ca}$  в таких условиях была практически исключена. При нормальных условиях регистрации низкоамплитудный быстрый  $I_{Ca}$  вполне мог маскироваться остатками быстрых выходящих токов. Нужно отметить, что в аналогичных экспериментах на миобластах шпорцевой лягушки он также не был зарегистрирован (Moody-Corbett et al., 1989). Поэтому вполне вероятно, что на этих стадиях развития быстрый  $I_{Ca}$  у миобластов лягушек еще не выражен, хотя в аналогичных экспериментах на миобластах млекопитающих он был зарегистрирован. Во всяком случае поиски быстрого  $I_{Ca}$  следует продолжить на более поздних стадиях онтогенеза СМВ лягушки.

Обнаруженный нами второй тип тока через Са-каналы оказался более медленным, чем медленный  $I_{Ca}$  известный для фазных СМВ взрослой лягушки. Кроме того, оба зарегистрированных в наших опытах тока через Са-каналы чрезвычайно похожи по кинетическим и фармакологическим характеристикам. Достоверно отличается лишь время от начала импульса до достижения максимального пикового значения амплитуды тока. На то, что это различные типы тока, прежде всего указывает их одновременная регистрация (рис. 3). Правда, на первый взгляд это очень напоминает известный эффект аномальной зависимости от мольной доли (*anomalous mole-fraction behaviour*) (Almers, McCleskey, 1984). Однако, при проверке оказалось, что два компонента входящего медленного тока одновременно регистрировались нами и в нормальном наружном растворе ( $n=2$ ). В отдельных случаях в результате многократной замены наружного раствора исключалась возможность сохранения сколько-нибудь су-

щественного количества ионов кальция, но при этом регистрировались оба компонента. Если остатки  $Ca^{++}$  могли сохраняться в недоразвитой Т-системе, то они должны были связываться высокой концентрацией EGTA (10 мМ) внутри миобласта при первых же тестирующих импульсах. Одновременная регистрация двух медленных компонентов входящего ионного тока вряд ли может быть и результатом плохого клампа, поскольку считается, что при опытах на зрелых СМВ лягушки, имеющих диаметр около 20–30 мкм, временная и пространственная неоднородность фиксации потенциала на мембране не наблюдается (Beaty et al., 1987). У миобласта с его менее развитой Т-системой и меньшими размерами качество клампа, вероятно, должно быть еще более высоким. Однако, необходимы дополнительные исследования, поскольку более медленный ток наблюдался только на 4–6 сутки культивирования миобластов и, возможно, его появление все же было связано с развитием мембранных структур.

В аналогичных экспериментах на миобластах шпорцевой лягушки (Moody-Corbett et al., 1989) был зарегистрирован один тип медленного  $I_{Ca}$ . От описанных нами токов через Са-каналы он отличался только более быстрой активацией (200 мс при  $E_{2\text{макс.}}$  и комнатной температуре). Более медленный тип тока вряд ли мог быть зарегистрирован этими авторами, поскольку длительность стимулирующего импульса в их эксперименте была равна только 500 мс, тогда как время активации нашего более медленного  $I_{Ca}$  при различных значениях  $E_2$  было более 1 с.

По фармакологическим характеристикам описанные нами медленные токи через Са-каналы не отличаются от медленного тока через Са-каналы, описанного Муди-Корбетт и соавт. (1989) для культивируемых миобластов шпорцевой лягушки. Влияние специфических блокаторов Са-каналов: верапамила, Д-600, ионов кобальта и кадмия, в соответствующих для их воздействия концентрациях однозначно говорит о том, что регистрируемые нами медленные входящие токи были кальциевыми. То, что эти токи идут через дигидропиридин-чувствительные Са-каналы, подтверждается увеличением их амплитуды как при эквимолярной замене ионов кальция на ионы бария в наружном растворе, так и при добавлении в наружный раствор 50 мМ CGP – дигидропиридинового агониста Са-каналов (Nowycky et al., 1985).

При сопоставлении полученных нами данных с литературными дан-

ными, приведенными для зрелых фазных СМВ лягушки (Almers, Palade, 1981; Cota et al., 1982-1984; Cota, Stefani, 1984-1989; и др.), оказалось, что описанный нами медленный  $I_{Ca}$  более быстрого типа полностью соответствует по своим кинетическим и фармакологическим характеристикам медленному  $I_{Ca}$  фазных СМВ лягушки. Редко встречающийся медленный ток через Са-каналы более медленного типа по своим характеристикам очень похож на медленный  $I_{Ca}$  тонических СМВ взрослой лягушки. Известно, что медленные  $I_{Ca}$  фазных и тонических СМВ взрослой лягушки отличаются друг от друга только по времени развития. Так, Хуэрта и Стефани (Huerta, Stefani, 1983, 1986) в опытах на СМВ взрослой лягушки показали, что амплитуда медленного  $I_{Ca}$  тонического волокна достигает максимальных пиковых значений в течение 900-1200 мс (при  $E_2$  макс. и комнатной температуре). В сравнительных экспериментах на СМВ лягушки Генчек и соавт. (Genček et al., 1988) показали, что если медленный  $I_{Ca}$  фазных волокон достигает пиковых значений при различных  $E_2$  менее чем за 600 мс, то у тонических - более чем за 1000 мс, причем максимального значения амплитуда тока достигает примерно за 1700 мс. На основании сказанного можно считать, что описанный нами более быстрый тип медленного  $I_{Ca}$  соответствует по своим характеристикам медленному  $I_{Ca}$  фазных СМВ взрослой лягушки, а более медленный тип - медленному  $I_{Ca}$  тонических СМВ. Меньшая выраженность медленного  $I_{Ca}$  у волокон тонического типа (Zacharova et al., 1985) могла оказаться на количестве регистраций тока более медленного типа в нашем эксперименте, поскольку он мог маскироваться током более быстрого (фазного) типа. В свою очередь более медленный ток (тонического типа) мог быть одной из существенных причин, по которой вычисленные при различных  $E_2$  значения постоянной времени инактивации для более быстрого типа  $I_{Ca}$  оказались несопоставимыми.

К сожалению, нам не удалось наблюдать изменение характеристик  $I_{Ca}$  в ходе развития миобласта. Посуточное изменение доли исследованных миобластов, имевших выраженный медленный  $I_{Ca}$  (более быстрого типа), свидетельствует о том, что миобласты лягушки даже на самых ранних стадиях своего развития имеют довольно высокую мембранные плотность медленных Са-каналов. Аналогичные данные приводят и другие авторы. Так, в опытах Муди-Корбет и соавт. (Moody-Corbett et al., 1989) 69% исследованных миобластов ширцевой лягушки, в первые сутки культивирования имело выраженный

медленный ток через Са-каналы, при этом, как и в нашем эксперименте, доля таких миобластов в последующие сутки развития увеличивалась и достигала 100%.

Что касается фактов регистрации сокращения, то применяемая методика представляется достаточно чувствительной, поскольку малейшее движение миобласта могло привести к нарушению высокомного контакта между микропипеткой и мембраной миобласта, что влечет за собой серьёзные изменения в записи регистрируемого тока. Известны случаи, когда экспериментаторы отмечали сократительную активность миобласта лягушки в нормальных условиях регистрации и с целью её предотвращения заменили ионы кальция в наружном растворе на эквимолярное количество ионов бария. О том, что миобласт лягушки уже через сутки после прикрепления к субстрату способен отвечать сокращением на деполяризующее воздействие, говорит и установленная в гистологических и биохимических экспериментах других авторов высокая развитость сократительного аппарата на самых ранних стадиях развития миобласта в культуре.

По нашим данным для активации сократительного аппарата миобласта необходимы три обязательных условия: 1) достаточный уровень длительной (более 1 с) деполяризации мембранны; 2) наличие достаточного количества ионов кальция в наружном растворе; 3)  $I_K$  должен быть ингибиран в значительной степени. Соблюдение первых двух пунктов, вероятно, должно обеспечить открытие такого количества Са-каналов, чтобы ионов кальция, вошедших в клетку во время тестирующего импульса, было бы достаточно для активации сокращения. Тут возникает ряд вопросов, требующих отдельного рассмотрения. Один из них - способны ли кальциевые каналы обеспечить вход такого количества ионов кальция ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  м по Rotureau, Raymond, 1980)? В многочисленных работах на СМВ взрослой лягушки показано, что Са-каналы Т-системы не способны обеспечить вход необходимого для активации сокращения количества ионов кальция. Однако, нужно учесть различное соотношение площади поверхности и объёма: у миобласта это соотношение гораздо выше. Следовательно, выше и способность насыщения саркоплазмы ионами кальция за счёт работы мембранных Са-каналов. То, что в зарегистрированных нами сокращениях миобластов основную роль действительно играл медленный  $I_{Ca}$ , подтверждает и целый ряд полученных нами данных: 1) сокращение развивалось только при наличии  $I_{Ca}$ ; 2) сокращение не зависело от наличия натриевого тока, что может

свидетельствовать и об отсутствии триадных структур; 3) сокращение развивалось только после достижения пикового значения амплитуды  $I_{Ca}$ ; 4) сокращение не развивалось в бариевом растворе.

К сожалению в литературе существуют лишь косвенные данные, подтверждающие наше предположение об особой роли ионов кальция в активации сокращения мышц лягушки на ранних стадиях онтогенеза. Так, Дёрке (1986) показал, что в безкальциевой среде происходит подавление калиевой контрактуры мышц хвоста головастика. Позже Радзюкевич (1990) в сравнительных экспериментах на мышцах конечностей головастиков (миотрубки и мышечные волокна) и лягушат-сеголеток показала, что понижение наружной концентрации ионов кальция от  $1,8 \cdot 10^{-3}$  до  $2 \cdot 10^{-5} M$ , как и действие верапамила, значительно снижает амплитуду одиночных и тетанических сокращений мышц головастика, тогда как у лягушат лишь проявляется неспособность удерживать амплитуду тетануса. Особая роль  $I_{Ca}$  в сокращении миобластов при длительном деполяризующем воздействии подтверждается и результатами исследований на культивируемых эмбриональных мышечных клетках крысы и мыши (Cognard et al., 1988; Romeo et al., 1988).

Что касается роли  $I_K$  в активации сокращения, то существует работа (Шевчук, Рыбальченко, 1990), выполненная на гладкомышечных клетках морской свинки, в которой показано, что блокада  $I_K$  при помощи 10 mM ТЭА или 1-5 mM 4-АП приводит к усилению сократительной активности. Активирующий эффект этих агентов снимался блокаторами  $I_{Ca}$ : верапамилом, ионами кадмия и кобальта. Авторы делают вывод, что блокада  $I_K$  создает условия для повышенного притока  $Ca^{++}$  в клетки. В то же время, возможно и другое объяснение активирующего процесса сокращения влияния блокаторов  $I_K$ . Так, Миледи и соавт. (Miledi et al., 1984) в опытах с  $Ca$ -чувствительным красителем показали, что действие 3,4-диаминопиридинина приводит и к спонтанному выбросу  $Ca^{++}$  из СР. Вполне вероятно, что аналогичный эффект мог иметь место и в нашем эксперименте.

Калиевые токи. Прежде всего необходимо отметить, что приведенные данные позволяют рассматривать компоненты  $I_K$  б5, б12, б20, б30, б50 и М как отдельные типы токов через соответствующие типы калиевых каналов. Каждый тип тока кроме временных характеристик обладает и другими отличительными чертами. Так, например, тип М имеет самое низкое значение  $E_{0,5}$  кривой пиковой хордовой проводимости (-44 мВ). Каналы, через которые идет  $I_K$  типа М, как

и каналы  $I_K$  типа б5, не образуются или не функционируют после выдерживания стволовых миобластов при +5°C.  $I_K$  типов б5, б20 и б30 исчезают к 6 суткам культивирования, тогда как б12 и М регистрируются у 100% шестисуточных миобластов. Токи типа б20 и б30 очень похожи, но у этих типов  $I_K$  различны значения параметра  $E_{0,5}$  кривой пиковой хордовой проводимости.  $I_K$  типа б50 отличается от других быстрых токов очень большой чувствительностью к сдвигам кондиционирующего потенциала ( $E_L$ ) вблизи потенциала реверсии. Значение параметра  $E_{0,5}$  его инактивационной кривой (-74 мВ) очень близко к значению потенциала реверсии (-77,5 мВ).

Возможность существования такого количества типов  $I_K$  подтверждается и литературными данными. Так, в аналогичных экспериментах на культуре эмбриональной мышечной ткани Муди-Корбет и Жильберт (Moody-Corbett, Gilbert, 1988; Gilbert, Moody-Corbett, 1989) обнаружили 4 выходящих потенциалозависимых  $I_K$  на ранних стадиях развития миобластов шпорцевой лягушки. Полученные нами данные показывают, что при тщательном разделении выходящих токов можно выделить по крайней мере 6 типов  $I_K$ . Если сопоставлять кинетические характеристики наших  $I_K$  с описанными в работах Муди-Корбета и Жильberta миобластов шпорцевой лягушки, то можно заметить, что описанные авторами медленный и быстрый  $I_K$  соответствуют описанным нами  $I_K$  типов М и б12. При этом, как и в нашем эксперименте, медленный  $I_K$  не блокировался до конца ТЭА. Что касается двух других быстрых  $I_K$ , о которых сообщали эти авторы, то они по своим кинетическим и фармакологическим характеристикам с наибольшей вероятностью соответствуют нашим  $I_K$  типов б5 и б50.

В какой-то мере подтверждают правомерность сделанных в данной работе выводов о многочисленности типов  $I_K$  в мембране развивающейся в культуре миобlasta данных, полученные Земковой и соавт. (Zemkova et al., 1989) в опытах с регистрацией одиночных каналов на культуре мышечной ткани цыпленка. В ходе развития миобlasta авторами было зарегистрировано по крайней мере 7 типов потенциалозависимых калиевых каналов с различными кинетическими и фармакологическими свойствами. При этом важно отметить, что качественный и количественный набор каналов, как и в нашем эксперименте, менялся в ходе развития миобластов: один из трех каналов с высокой проводимостью со временем исчезал, а два других встречались в два раза чаще на стадии миобластов, чем на стадии миотрубок. Последнее в случае регистрации от целой клетки могло при-

вести к невыраженности типа тока на поздних стадиях миогенеза. Следовательно, можно предположить, что "исчезавшие" в ходе развития наших миобластов  $I_K$  типов б5, б20 и б30 могут играть особую роль на различных этапах слияния миобластов. Действительно, по литературным данным слияние миобластов в миотрубки в культуре обычно наступает на 2-3 сутки после прикрепления миобластов к субстрату независимо от вида животного-донора, а это соответствует пику выраженности данных типов  $I_K$  в нашем эксперименте.

Полученные в нашем эксперименте данные по калиевым токам трудно сопоставлять с данными, приведенными в литературе для СМВ взрослых лягушек. Так,  $I_K$  типа M вполне соответствует по кинетическим характеристикам описанному в литературе медленному  $I_K$  СМВ лягушки (Adrian et al., 1970; Lynch, 1985; и др.), но по времени развития превышает максимальные из приведенных авторами значений (3 с при  $E_2 = -30$  мВ и  $+3^{\circ}\text{C}$ ). Последнее, вероятно, можно объяснить как кинетическими свойствами соответствующих ионных каналов, так и влиянием условий проведения экспериментов на зрелых СМВ (имеется в виду пониженная температура, что, как показано нами, не безразлично для калиевых каналов).

Описанный в данной работе  $I_K$  типа б12 по своим характеристикам полностью не соответствует быстрому  $I_K$  задержанного выпрямления. Можно предположить, что либо характеристики  $I_K$  типа б12 могут изменяться в процессе дальнейшего онтогенетического развития миобlasta, либо  $I_K$  задержанного выпрямления зрелых СМВ лягушки обеспечивается работой нескольких типов калиевых каналов, обладающих различными кинетическими характеристиками. Проведение экспериментов на более поздних стадиях развития миобlasta вероятно поможет найти ответы на эти вопросы.

Нужно отметить, что и остальные описанные нами быстрые  $I_K$  по своим характеристикам не сопоставимы с  $I_K$  зрелого СМВ лягушки. Невозможно сопоставить их и с каким-либо из типов  $I_K$  клеток других тканей различных животных (Rudy, 1988). В какой-то мере исключение составляет  $I_K$  типа б5. Оказалось, что очень похожий по фармакологической зависимости и временными параметрами ток найден у нейронов морской свинки (Spigelman, Puill, 1989). Этот ток был назван авторами T-током (*transient*). Аналогично описанному нами  $I_K$  типа б5 он блокировался низкими концентрациями ТЭА (10 мМ) снаружи и был устойчивее более медленных  $I_K$  к добавлению в наружный раствор 5 мМ 4-аминопиридина.

## Выводы

Были изучены интегральные потенциалозависимые ионные токи одиночных миобластов лягушки *Rana temporaria*, развивающихся в культуре эмбриональной мышечной ткани с I по 6 день от момента прикрепления клеток к поверхности субстрата. Полученные результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Миобlastы обладают количественно и качественно изменяющимися в ходе миогенеза набором трансмембранных потенциалозависимых ионных токов через натриевые, кальциевые и калиевые ионные каналы.

2. Изучение компонентов интегрального выходящего калиевого тока ( $I_K$ ) показало, что у культивируемых миобластов лягушки существует шесть типов  $I_K$ , которые различаются совокупностью кинетических, фармакологических и других характеристик: б5, б12, б20, б30, б50 и М, где "Б" - быстрый, а "М" - медленный неинактивирующийся калиевые токи; цифры - среднее время активации тока при тестирующем потенциале -10 мВ. В ходе развития миобластов  $I_K$  типов б5, б20 и б30 наиболее выражены на третьи сутки культивирования, после чего частота их встречаемости значительно падает, тогда как доля миобластов, имеющих выраженный  $I_K$  типов б12 и М, постоянно возрастает в процессе онтогенетического развития.

3. Натриевый ток культивируемых миобластов лягушки по своим кинетическим и фармакологическим характеристикам не отличается от натриевого тока зрелых скелетных мышечных волокон лягушки.

4. Изучение кинетических и фармакологических характеристик медленных компонентов входящего тока показало, что у культивируемых миобластов лягушки могут регистрироваться два типа медленного тока через дигидропиридин-чувствительные кальциевые каналы, отличающиеся только временными характеристиками (время активации и постоянная времени инактивации), при этом более медленный ток встречается реже (только у 10% миобластов), чем более быстрый ток (у 95% миобластов).

5. Доля миобластов, имеющих выраженный натриевый ток, как и миобластов, имеющих выраженный кальциевый ток (более быстрый тип), постоянно возрастает в процессе культивирования.

6. Медленный кальциевый ток через дигидропиридин-чувствительные кальциевые каналы в условиях ингибиции  $I_K$  с помощью хлорида цезия (110 мМ внутривипипеточно) может активировать процесс сокращения миобlasta при продолжительном деполаризующем воздействии (более одной секунды).

ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ И ПЕРЕДАНЫ В ПЕЧАТЬ

СЛЕДУЮЩИЕ РАБОТЫ:

1. Наследов Г.А., Дёрке Ш., Лукьяненко В.И., Катина И.Е. Входящие кальциевые токи в миогенезе поперечно-полосатых мышечных волокон лягушки // IX Всесоюзный симпозиум "Биофизика и биохимия биологической подвижности (мышечное сокращение)". - Тбилиси, 1990.- С. 87.
2. Наследов Г.А., Лебединская И.И., Лукьяненко В.И., Катина И.Е. О миогенном механизме детерминации фазного и тонического типов мышечного волокна лягушки в онтогенезе // XI Всесоюзный симпозиум "Физиология медиаторов. Периферический синапс". - Казань, 1991.- С. 72.
3. Лукьяненко В.И., Наследов Г.А., Катина И.Е., Лонский А.В. Потенциалозависимые входящие ионные токи развивающихся в культуре миобластов лягушки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии.- 1991.- №6.- (в печати).
4. Nasledov G.A., Lukyanenko V.I., Katina I.E., Lonsky A.V. The ionic requirements for the activation in embryonic frog myoblasts in culture // Gen. Physiol. Biophys..-1991.- (в печати).

В.Лукьяненко