

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ ВХОДЯЩИЕ ИОННЫЕ ТОКИ РАЗВИВАЮЩИХСЯ В КУЛЬТУРЕ МИОБЛАСТОВ ЛЯГУШКИ RANA TEMPORARIA

В. И. Лукьяненко, Г. А. Наследов, И. Е. Катина, А. В. Лонский

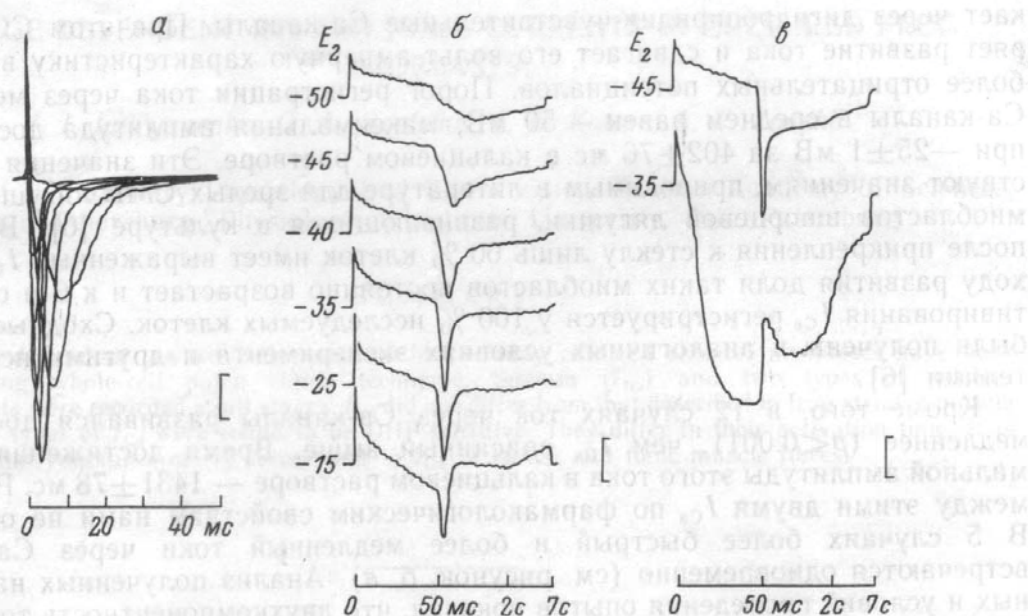
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Физиологический институт им. А. А. Ухтомского, Санкт-Петербургский  
университет

Развитие электровозбудимости в ходе онтогенеза — одна из важнейших проблем физиологии возбудимых мембран. Поскольку генерация возбуждения в основном связана с входящими токами катионов, нами проведен феноменологический анализ набора потенциал-зависимых входящих ионных токов мембраны миобластов лягушки, развивающихся в условиях культивирования.

Для приготовления культуры миобластов диссоциированные клетки дорсального участка эмбриона *Rana temporaria* (27—28-я стадии) по Дабагян и Слепцовой) высевали в чашки Петри диаметром 40 мм на покровные стекла. Для исключения слияния миобластов, что необходимо для регистрации токов от целой клетки, использовали редкий посев (клетки от одного эмбриона на 1 чашку) и культуральную среду следующего состава: 55 % среды № 99 м, 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (все ингредиенты произведены в СССР). При этом известно, что процессы развития в культуре мышечной ткани в нормальных условиях и в условиях блокирования слияния миобластов протекают сходно [1].

После посева культуру содержали в стерильных условиях при температуре 20 °С. Прикрепление миобластов происходило в течение сут. Токи регистрировали от целой клетки в условиях плотного контакта (whole-cell). Для фиксации потенциала на мембране использовали стандартную принципиальную схему [2]. Сопротивление обратной связи — 5 ГОм. Напряжение, пропорциональное протекающему через мембрану току, усиливалось и вводилось в ЭВМ. Микропипетки с внутренним диаметром кончика 1 мкм изготавливали из мягкого стекла по стандартной методике [2]. Внутрипипеточный раствор (мМ): 110 CsCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 10 K<sub>2</sub>EGTA (Sigma), 8 Hepes·KOH (Sigma), pH 7.2. Основной наружный раствор (мМ): 120 NaCl, 1.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 8 Hepes·NaOH, pH 7.4. Для изучения токов через кальциевые каналы применяли наружный раствор (мМ): 2 BaCl<sub>2</sub>, 111 ТЭАСл, 0.001 ТТХ (Sankyo), 8 Hepes·NaOH, pH 7.4. Кроме того, в наружных растворах использовали: верапамил (Sigma), D-600 (Sigma), дигидропиридин (ДГП) CGP, а также соли: CoCl<sub>2</sub> и Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Постоянный поддерживаемый потенциал ( $E_0$ ) был равен —80 мВ. Значения тестирующего потенциала ( $E_2$ ) изменяли в пределах от —70 до 30 мВ при длительности стимула 7 с. Опыты проводили при температуре 18—20 °С. Миобласты исследовали в течение первых 6 сут культивирования ( $n=136$ ). Использовали миобласты, не имевшие непосредственных контактов с другими клетками.

Опыты показали, что в большинстве случаев регистрируются два компонента входящего тока: высокоамплитудный быстрый ( $n=70$ ) и низкоамплитудный медленный ( $n=102$ ). Первый блокируется тетродотоксином (ТТХ) в концентрации 1 мкм ( $n=27$ ), а также исчезает при удалении ионов натрия из наружного раствора ( $n=11$ ). Он был квалифицирован как натриевый ионный ток ( $I_{Na}$ ) (см. рисунок, а).  $I_{Na}$  начинает регистрироваться при деполяризации мембраны в среднем до —40 мВ. Максимальная амплитуда  $I_{Na}$  наблюдается



Входящие потенциалозависимые трансмембранные ионные токи культивируемых миобластов лягушки.

*a* — натриевый ток при тестирующих потенциалах в пределах от  $-45$  до  $15$  мВ. Постоянный поддерживаемый потенциал  $-85$  мВ, 6-е сут культивирования. *б* — ток через кальциевые каналы в бариевом растворе ( $2$  мМ  $Ba^{++}$ ) при указанных значениях тестирующего потенциала. Видно появление второго, более медленного тока. Постоянный поддерживаемый потенциал  $-80$  мВ; 6-е сут культивирования. *в* — в том же опыте после добавления дигидропиридинового агониста CGP ( $50$  мкМ). Видно увеличение обоих медленных токов. Считывание данных производилось с интервалами  $0.1$  мс (в первые  $50$  мс),  $10$  мс (до  $2$  с),  $100$  мс (от  $2$  до  $7$  с).  $E_2$  — значения тестирующего потенциала (мВ). Калибровка  $150$  нА.

при  $E_2 = -16 \pm 2$  мВ. Время достижения максимума —  $4 \pm 0.4$  мс. Время достижения пиковых значений амплитуды  $I_{Na}$  колеблется от  $1.5$  до  $17$  мс, а постоянная времени инактивации — от  $0.4$  до  $24.4$  мс при различных значениях  $E_2$ . При сопоставлении этих данных с приведенными в литературе для зрелых скелетных мышечных волокон (СМВ) лягушки обращает на себя внимание более медленная активация  $I_{Na}$  и более высокий порог его регистрации у миобластов. Последнее может быть объяснено более низкой плотностью натриевых каналов в мембране миобласта. Ранее в опытах с регистрацией токов через одиночные каналы культивируемых миобластов шпорцевой лягушки было показано увеличение мембранной плотности натриевых каналов в ходе миогенеза [3]. Такое объяснение подтверждается и тем фактом, что в нашем эксперименте  $I_{Na}$  регистрировался в 1-е сут только у  $15\%$  миобластов, затем доля миобластов, имевших выраженный  $I_{Na}$ , постоянно возрастала и к 6-м сут культивирования доходила до  $80\%$ . При этом отмечен рост максимальной амплитуды  $I_{Na}$ .

Быстрый кальциевый ток ( $I_{Ca}$ ), свойственный зрелым СМВ лягушки [4, 5], нам, как и другим авторам [6], на культивируемых миобластах амфибий зарегистрировать не удалось.

Медленный низкоамплитудный компонент входящего тока был квалифицирован нами как ионный ток через кальциевые каналы (см. рисунок, *б*), поскольку в опытах он блокировался специфическими блокаторами кальциевых каналов в соответствующих для их действия концентрациях: ионами кобальта и кадмия ( $2-5$  мМ), верапамилом ( $0.1-0.4$  мМ) и D-600 ( $0.5-3$  мкМ). Увеличение амплитуды тока при эквимоллярной замене ионов кальция на ионы бария и (или) при добавлении агониста кальциевых каналов CGP ( $50$  мкМ) (см. рисунок, *в*) показывает, что регистрируемый медленный ионный ток проте-

кает через дигидропиридин-чувствительные Са-каналы. При этом СГР ускоряет развитие тока и сдвигает его вольт-амперную характеристику в область более отрицательных потенциалов. Порог регистрации тока через медленные Са-каналы в среднем равен  $-50$  мВ; максимальная амплитуда достигается при  $-25 \pm 1$  мВ за  $402 \pm 76$  мс в кальциевом растворе. Эти значения соответствуют значениям, приводимым в литературе для зрелых СМВ лягушки и для миобластов шпорцевой лягушки, развивающихся в культуре [6]. В 1-е сут после прикрепления к стеклу лишь 60 % клеток имеет выраженный  $I_{Ca}$ , но по ходу развития доля таких миобластов постоянно возрастает и к 6-м сут культивирования  $I_{Ca}$  регистрируется у 100 % исследуемых клеток. Сходные данные были получены в аналогичных условиях эксперимента и другими исследователями [6].

Кроме того, в 12 случаях ток через Са-каналы развивался достоверно медленнее ( $p < 0.001$ ), чем  $I_{Ca}$  описанный выше. Время достижения максимальной амплитуды этого тока в кальциевом растворе —  $1431 \pm 78$  мс. Различий между этими двумя  $I_{Ca}$  по фармакологическим свойствам нами не отмечено. В 5 случаях более быстрый и более медленный токи через Са-каналы встречаются одновременно (см. рисунок, б, в). Анализ полученных нами данных и условий проведения опытов показал, что двухкомпонентность тока через Са-каналы не может быть известным аномальным влиянием мольной доли [7]. При сопоставлении наших данных с литературными для зрелых СМВ лягушки оказалось, что более быстрый  $I_{Ca}$  (402 мс) сопоставим по времени активации при  $E_2$  макс с медленным  $I_{Ca}$  мембраны фазного СМВ (до 200 мс по [4] и 600 мс по [5]), а более медленный  $I_{Ca}$  (1430 мс) сопоставим с  $I_{Ca}$  на мембране тонического СМВ лягушки (1700 мс по [5]). На этом основании можно предположить существование миогенных, независимых от непосредственного контакта с нервными элементами, механизмов дифференциации СМВ лягушки на фазный и тонический типы. Если бы такое предположение оказалось верным, то самое интересное заключалось бы в том, что разделение ДГП-чувствительных Са-каналов на более быстрые и более медленные соответственно двум типам мышечных волокон происходит раньше, чем разделяются в миогенезе фазные и тонические волокна, и оба подтипа Са-каналов обнаруживаются на мембране одной и той же клетки как общего зачатка будущих специализированных волокон.

#### Список литературы

- [1] Zemkova H., Vyskočil F., Tolar M., Vlachova V., Ujec E. Singl  $K^+$  currents during differentiation of embryonic muscle cells in vitro // Biochem. Biophys. Acta. 1989. V. 986. N 1. P. 146—150.
- [2] Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // Pflüg. Arch. 1981. V. 391. P. 85—100.
- [3] DeCino P., Kidokoro Y. Development and subsequent neural tube effects on the excitability of cultured *Xenopus* myocytes // J. Neurosci. 1985. V. 5. N 6. P. 1471—1482.
- [4] Beaty G. N., Cota., Siri L. N. et al. Skeletal muscle  $Ca^{++}$  channels // Structure and physiology of the slow inward calcium channel. New York: Allan R. Liss, 1987. P. 123—140.
- [5] Henček M., Zacharova D., Zachar J. Fast calcium currents in cut skeletal muscle fibres of the frogs *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* // Gen. Physiol. Biophys. 1988. V. 7, N 6. P. 651—656.
- [6] Moody-Corbett F., Gilbert R., Akbarali H., Hall J. Calcium current in embryonic *Xenopus* muscle cells in culture // Can. j. Physiol. Pharmacol. 1989. V. 67. P. 1259—1264.
- [7] Almers W., McCleskey E. W. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore // J. Physiol. 1984. V. 353. P. 585—608.

Поступило 21 II 1991

## VOLTAGE-DEPENDENT INWARD IONIC CURRENTS IN CULTURED FROG MYOBLASTS

V. I. Luk'yanenko, G. A. Nasledov, I. E. Katina, A. V. Lonskii

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg; Physiological Institute, University, Saint-Petersburg

### SUMMARY

Voltage-dependent inward ionic currents in 1—6-day cultured skeletal myoblasts have been studied using whole-cell patch clamp technique. Sodium ( $I_{Na}$ ) and two types of calcium ( $I_{Ca}$ ) currents were recorded at all stages.  $I_{Na}$  did not differ from that described in frog striated muscle fibres. Both types of  $I_{Ca}$  were found to be DHP-sensitive. They differ in their activation time. It is suggested that two types of  $I_{Ca}$  correspond to  $I_{Ca}$  of twitch and tonic muscle fibres.

УДК 591.147 : 597.82

© Ж. эвол. биох. и физиол., № 1, 1992 г.

## ВЛИЯНИЕ ИНЪЕКЦИЙ АРГИНИН-ВАЗОТОЦИНА И МЕЗОТОЦИНА НА СОСТОЯНИЕ ИНТЕРРЕНАЛОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛЯГУШКИ RANA TEMPORARIA СПУСТЯ ДВА МЕСЯЦА ПОСЛЕ УДАЛЕНИЯ ПЕРЕДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА

Е. О. Лукьяненко, М. А. Беленький, А. А. Кравцова, А. Л. Поленов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Адреноркортотропный гормон, вырабатываемый клетками передней доли гипофиза (ПДГ), является основным гормоном, регулирующим функциональную активность интерреналовой железы (ИРЖ) у Ануга [1]. Последние литературные данные [2—5] позволяют предположить, что непосредственное участие в регуляции ИРЖ могут принимать также и неонапептидные нейрогормоны гипоталамуса: аргинин-вазотонин (АВТ) и мезотонин (МТ). Для решения этого вопроса мы изучили влияние инъекций МТ и АВТ на состояние ИРЖ лягушек спустя два месяца после удаления ПДГ. В опыте использовали половозрелых самцов *Rana temporaria* весом около 30 г. В течение ноября—января всех животных содержали в банках с небольшим количеством воды, при температуре 15 °С. Спустя неделю лягушек анестезировали, помещая в 5 %-ный водный раствор эфира. Затем у одной части лягушек удаляли ПДГ. Для этого анестезированных лягушек фиксировали в положении на спине, с раскрытым ртом; разрезали слизистую оболочку ротоглоточной полости над парасфеноидом; с помощью бормашины в центре парасфеноида делали отверстие диаметром около 2 мм; удаляли надкостницу; микропипеткой отсасывали ПДГ. Оставшихся животных не оперировали (контрольная группа). Через 2 мес оперированных животных разделили на четыре группы: 1-я — без инъекций, 2-я — с введением физиологического раствора (ФР) для пойкилотермных животных (NaCl 140 мМ, водный раствор), 3-я — с инъекциями МТ и 4-я — с инъекциями АВТ. Как и в предыдущих экспериментах [2], МТ и АВТ растворяли в ФР в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  М/мл, ФР и гормональные препараты вводили внутримышечно в количестве 0.5 мл/100 г. Инъекции проводили три раза с интервалами в 30 мин. Через 30 мин после последней инъекции лягушек декапитиро-