

УДК 577.352

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

## ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ ВЫХОДЯЩИЕ ИОННЫЕ ТОКИ РАЗВИВАЮЩИХСЯ В КУЛЬТУРЕ МИОБЛАСТОВ ЛЯГУШКИ

С целью изучения особенностей проводимости мембраны скелетного мышечного волокна (СМВ) для  $K^+$  в раннем онтогенезе проведен феноменологический анализ набора выходящих потенциалзависимых ионных токов культивируемых миобластов лягушки *Rana temporaria*. Для приготовления культуры миобластов диссоциированные клетки дорсального участка эмбриона (стадия 27 — 28 [1]) высевались в чашки Петри диаметром 40 мм на покровные стекла. Развивающиеся совместно клетки нервной трубки не имели с миобластами визуально выявляемых контактов. Использовалась культуральная среда, исключавшая возможность слияния миобластов [3, 9], следующего состава: 55 % среды 199м, 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Получение неслившихся миобластов было важно для регистрации интегральных токов в условиях отведения от целой клетки. Культура содержалась в стерильных условиях при  $+20^\circ C$ . Эксперименты проводились в течение первых шести суток культивирования.

Токи регистрировали в условиях плотного контакта (whole cell). Для фиксации потенциала использовалась стандартная схема [5] с сопротивлением обратной связи 5 ГОм. Данные вводились в ЭВМ после удаления высокочастотных шумов при помощи фильтра Бесселя с полосой пропускания 3 кГц. Физиологический (наружный) раствор включал в себя (в миллимолях на 1 л): NaCl — 120, KCl — 1,5, CaCl<sub>2</sub> — 2, HEPES-NaOH — 8; pH 7,4. Раствор внутри пипетки имел следующий состав (в миллимолях на 1 л): KCl — 110, CaCl<sub>2</sub> — 1, MgSO<sub>4</sub> — 1, K<sub>2</sub>EGTA — 10, HEPES-KOH — 8; pH 7,2. Поддерживаемый потенциал ( $E_0$ ) составлял  $-80$  мВ. Значения кондиционирующего ( $E_1$ ) и тестирующего ( $E_2$ ) потенциалов изменялись в пределах  $-70 \div -30$  мВ, длительность стимула составляла 5 — 10 с. Опыты проводились при  $18 - 20^\circ C$ . Данные получены на 139 миобластах.

Анализ записей интегрального выходящего тока позволил выделить в нем девять компонентов ( $E_2 = -10$  мВ), каждый из которых по времени достижения пиковых значений амплитуды отличался от последующего ( $P < 0,001$ ). Обозначения компонентов по временным характеристикам даны в таблице. Почти равная осмолярность  $Cl^-$  в наружном растворе и растворе внутри пипетки обуславливала снижение до минимума возможности появления хлорных токов. На рисунке приведены пример регистрации одного из компонентов калиевого тока —  $I_K$  (б12) и результат его обработки. «Медленные» (м) компоненты были устойчивы к тетраэтиламмонию — ТЭА (30 — 110 ммоль/л), а «быстрые» (б) — к 4-аминопиридину (0,2 — 0,5 ммоль/л). Три компонента — м190, м700 и м2000 — встречались сравнительно редко и наблюдались только на фоне блокаторов в больших концентрациях (110 ммоль/л ТЭА и (или) 8 — 30 ммоль/л  $Ba^{2+}$ ), когда другие компоненты выходящего тока устранялись. Эти три компонента мы не можем с уверенностью отнести к  $I_K$ , хотя они, как и остальные компоненты, не регистрировались при использовании в растворе внутри пипетки вместо KCl эквимольного количества CsCl. Компоненты выходящего тока б5, б12, б20, б30, б50 и М были квалифицированы как различные типы потенциалзависимых выходящих  $I_K$ , поскольку в процессе изучения их кривых стационарной инактив-

Основные характеристики компонентов интегрального потенциалзависимого выходящего ионного тока миобластов лягушки, развивающихся в культуре  
 Main Characteristics of the Components of Integral Voltage-Dependent Outward Ionic Current in Cultured Frog Myoblasts

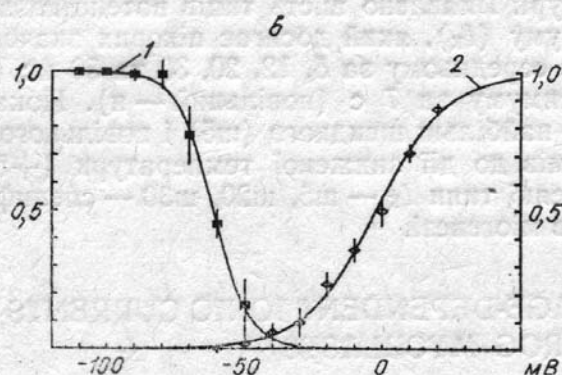
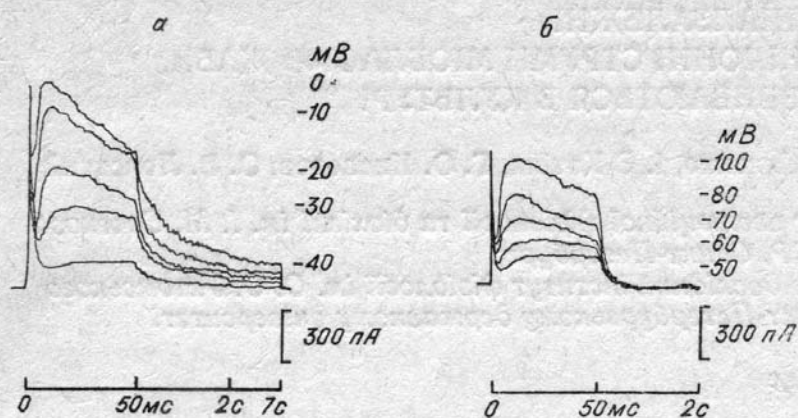
Тип компонента	Время активации при $E_2 = -10$ мВ		Характеристики потенциалзависимости			
	диапазон, мс	$M \pm m$ , мс	пиковая хордовая проводимость		стационарная инактивация	
			$E_{0,5}$ , мВ	$\kappa_g$ , мВ	$E_{0,5}$ , мВ	$\kappa_n$ , мВ
б5 25	4—8	$6,4 \pm 0,36$	—	—	$-55,0 \pm 2,1$	$6,3 \pm 1,05$
б12 58	10—15	$12,8 \pm 0,18$	$-2 \pm 0,30$	$-12,9 \pm 0,30$	$-61,0 \pm 1,3$	$6,5 \pm 0,70$
б20 66	19—25	$21,4 \pm 0,21$	$-22 \pm 0,25$	$-8,9 \pm 0,20$	$-43,0 \pm 2,1$	$8,9 \pm 0,60$
б30 44	29—34	$30,4 \pm 0,19$	$-14 \pm 0,60$	$-7,7 \pm 0,55$	$-39,4 \pm 1,8$	$9,1 \pm 0,40$
б50 20	40—70	$49,0 \pm 1,39$	$-16 \pm 0,80$	$-11,4 \pm 0,85$	-74,3	8,07
м190 9	110—250	$190 \pm 18,4$	—	—	—	—
м700 11	450—1110	$734 \pm 56,7$	$-18 \pm 0,80$	$-7,5 \pm 0,50$	—	—
м2000 7	1500—2550	$1865 \pm 165,0$	—	—	—	—
М 33	более 7000	—	$-44 \pm 0,20$	$-11,2 \pm 0,20$	—	—

Примечания.  $n$  — количество регистраций;  $M \pm m$  — среднее значение и его ошибка; б — «быстрый», М — «медленный» компоненты;  $\kappa$  — параметр, отражающий крутизну кривой;  $E_{0,5}$  — потенциал, соответствующий середине кривой;  $E_2$  — тест-потенциал;  $E_{0,5}$  и  $\kappa$  — параметры уравнения распределения Больцмана (приведены с указанием предела, в котором теоретическая кривая описывает данные в рамках экспериментальной погрешности).

вазии и пиковой хордовой проводимости были выявлены дополнительные отличительные черты. В таблице приведены значения параметров уравнения распределения Больцмана, при которых обеспечивалось наибольшее соответствие теоретической кривой усредненным экспериментальным данным (см. рисунок, в). Потенциал реверсии, использованный для вычисления хордовой проводимости, определялся по мгновенным вольт-амперным характеристикам. Он не зависел от длительности  $E_1$  и был равен  $-77,5 \div 0,54$  мВ. По потенциалу реверсии с помощью уравнения Гольдмана — Ходжкина — Катца относительная избирательность калиевых каналов оценена как  $P_K/P_{Na} = 30$ , что совпадает с аналогичным значением для зрелых СМВ лягушки [2].

Обычно у одного миобласти обнаруживались два-три выраженных типа  $I_K$ . Относительное количество миобластов с  $I_K$  типов б5, б20 и б30 увеличивалось в течение трех суток культивирования, после чего начинало уменьшаться, и к шестым суткам  $I_K$  этих типов уже не регистрировался. Возможно, что данные токи играют особую роль на стадии слияния миобластов (в культуре — вторые-третьи сутки [6]). Доля клеток, имеющих выраженный  $I_K$  типов б12 и М, постоянно возрастала, и к шестым суткам такие токи наблюдались уже у 100 % исследованных миобластов. Вполне вероятно, что они соответствуют известным для мембраны СМВ взрослых лягушек быстрому и медленному токам задержанного выпрямления [3], хотя и обладают иными кинетическими характеристиками.

В пользу существования различных калиевых каналов, соответствующих различным типам  $I_K$ , свидетельствует и обнаруженное нами исчезновение токов типа б5 и М у миобластов, которые до прикрепления к субстрату в течение пяти — семи суток содержались при  $+5^\circ\text{C}$  ( $n = 24$ ). Если каналы  $I_K$  типа б5 в условиях холода могли не появиться, то функционирование каналов типа М, которые в первые сутки нормального культивирования выявлялись у 80 % миобластов, заведомо было заблокировано холодным воздействием. Этот феномен, вероятно,



Записи компонента типа 612 интегрального выходящего ионного тока миобластов лягушки на третий день культивирования при различных значениях тестирующего (а) и кондиционирующего (б) потенциалов и соответствующие кривые пиковой хордовой проводимости — 1 и инактивации — 2 (в).

Сплошные линии на в проведены в соответствии с уравнением распределения Больцмана; вертикальные отметки — соответствующие ошибки средних. Считывание данных производилось с интервалами 0,1 (в первые 50 мс стимуляции), 10 (до 2 с) и 100 (от 2 до 7 с стимуляции) мс.

Registration of the component of 612 type of the integral outward ionic current in frog myoblasts on the third day of cultivation under different values of testing (a) and conditioning (b) potentials and corresponding curves of the peak chorda conductivity — 1 and inactivation 2 (v).

может объяснить значительные расхождения приводимых в литературе характеристик медленного  $I_k$  задержанного выпрямления, поскольку эксперименты на зрелых СМВ лягушки часто выполняют при 3—5°C [2].

Таким образом, нами показано существование у миобластов лягушки, которые развиваются в культуре, по крайней мере шести типов  $I_k$ , различающихся по кинетическим, фармакологическим и другим характеристикам. Ранее [4] в аналогичных экспериментах на миоблестах *Xenopus* было показано наличие четырех выходящих потенциалзависимых  $I_k$  [4], по кинетическим и фармакологическим характеристикам сопоставимых с нашими  $I_k$  типов б5, 612, 650 и М. На культивируемых миоблестах цыпленка обнаружили шесть типов калиевых токов и соответственно каналов, качественный и количественный состав которых изменялся в ходе миогенеза как при слиянии миобластов, так и при его блокировании [10]. Выявленные нами быстрые токи по своим характеристикам отличаются от известных  $I_k$  типа «А» [7]. Лишь Т-ток нейронов морской свинки [8] имеет аналогию с описанным нами током б5.

ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНІ  
ВИХІДНІ ІОННІ СТРУМИ МІОБЛАСТІВ ЖАБИ,  
ЩО РОЗВИВАЮТЬСЯ В КУЛЬТУРІ

В. І. Лук'яненко, І. Є Катіна, Г. О. Наследов, О. В. Лонський

*Інститут еволюційної фізіології та біохімії ім. І. М. Сеченова  
АН СРСР, Санкт-Петербург;  
Науково-дослідний інститут фізіології ім. О. О. Ухтомського  
при Санкт-Петербурзькому державному університеті*

Резюме

За допомогою методики відведення іонних струмів від цілої клітини в умовах щільного контакту здійснено феноменологічний аналіз набору вихідних потенціалзалежних іонних струмів міобластів жаби, що розвиваються в культурі. Виявлено шість типів потенціалзалежного вихідного калієвого струму ( $I_K$ ), який досягає пікових значень при тест-потенціалі  $-10$  мВ в середньому за 5, 12, 20, 30 та 50 мс (швидкий — ш) і не досягає максимуму за 7 с (повільний — п). Показана особлива чутливість каналів найбільш швидкого (ш5) і повільного, що не інактивується (П), струмів до дії зниженої температури ( $+5^\circ\text{C}$ ). Робиться припущення, що деякі типи  $I_K$  — ш5, ш20, ш30 — специфічні для стадії злиття міобластів в міогенезі.

OUTWARD VOLTAGE-DEPENDENT IONIC CURRENTS  
IN CULTURED FROG MYOBLASTS

V. I. Lukyanenko, I. E. Katina, G. A. Nasledov, A. V. Lonsky

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Saint Petersburg;  
A. A. Ukhomsky Research Institute of Physiology  
at the State University, Saint Petersburg*

Summary

Variety of outward voltage-dependent currents in cultured frog myoblasts were registered by means of whole cell voltage clamp. Six types of potassium currents ( $I_K$ ) which reach the peak value ( $-10$  mV) in 5, 12, 20, 30, 50 ms (fast) and do not reach the maximum in 7 s (slow) were established. High sensitivity to low temperature ( $+5^\circ$ ) was shown for channels of very fast and of slow noninactivated  $I_K$ . The assumption is made that some of  $I_K$  — 5, 20 and 30 ms to peak are especially characteristic of myoblasts fusion stage.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дабагян Н. В., Слепцова Л. А. Травяная лягушка // Объекты биологии развития. — М.: Наука, 1975. — С. 442—462.
2. Adrian R. H., Chandler W. K., Hodgkin A. L. Voltage clamp experiments in striated muscle fibres // J. Physiol. — 1970. — 208, N 3. — P. 607—645.
3. Anderson M. J., Cohen M. W., Zorychta E. Effects of innervation on the distribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells // Ibid. — 1977. — 268, N 4. — P. 731—756.
4. Gilbert R., Moody-Corbett F. Four outward potassium currents on *Xenopus* skeletal muscle cells in culture // Can. J. Physiol. and Pharmacol. — 1989. — 67, N 5. — P. Axiii—Axiv.
5. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell-free membrane patches // Pflügers Arch. — 1981. — 391, N 1. — P. 85—100.

6. Rubin L. L., Barald K. F. Neuromuscular development in tissue culture // Somatic and autonomic nerve-muscle interactions.— Amsterdam etc.: Elsevier, 1983.— P. 109—151.
7. Rudy B. Diversity and uniqueness of K channels // Neuroscience.— 1988.— 25, N 3.— P. 729—749.
8. Spigelman I., Puil E. K<sup>+</sup>-channel blockade in trigeminal root ganglion neurons: effects on membrane outward currents // J. Neurophysiol.— 1989.— 62, N 3.— P. 802—809.
9. Teylor-Papadimitrou J., Rosengurt E. The role of thymidine uptake in the control of cell proliferation // Exp. Cell Res.— 1979.— 119, N 2.— P. 393—396.
10. Zemková H., Vyskočil F., Tolar M. et al. Single K<sup>+</sup> currents during differentiation of embryonic muscle cells in vitro // Biochim. et Biophys. acta.— 1989.— 986, N 1.— P. 146—150.

Ин-т эволюц. физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Санкт-Петербург;  
Науч.-исслед. ин-т физиологии им. А. А. Ухтомского  
при Санкт-Петербург. гос. ун-те

Поступила 18.06.91