

УДК 591.175:577.352.3146

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ КАЛЬЦИЕВОГО ТОКА
НА ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ ТОКИ РАЗВИВАЮЩИХСЯ
В КУЛЬТУРЕ СКЕЛЕТНО-МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЯГУШКИ

© 1994 г. В. И. Лукьяненко, И. Е. Катина, Г. А. Наследов

Представлено академиком В.Л. Свидерским 29.03.94 г.

Поступило 29.03.94 г.

Ранее нами описаны кинетические характеристики 9 компонентов выходящего потенциалзависимого калиевого тока, регистрируемого у миоцитов лягушки от 1-го до 8-го дня развития в культуре [1]. Показано, что число компонентов, различающихся по своим кинетическим параметрам, уменьшается в процессе миогенеза до 2 - 3 к 8-му дню культивирования. Все компоненты были разделены на две группы: быстрые - более чувствительные к тетраэтиламмонию (ТЭА, 30 - 110 мМ), медленные - более чувствительные к 4-аминопиридину (4-АП, 0.2 - 0.5 мМ) [1]. У зрелых мышечных волокон лягушки, как известно, регистрируются только быстрые и медленные калиевые токи задержанного выпрямления [2, 3], которые имеют различные фармакологические характеристики [3]. Задачей данного исследования был фармакологический анализ компонентов калиевого тока миоцитов с целью их разделения в пределах групп и идентификации с известными типами калиевых токов. Проведенный анализ показал, что группы быстрых и медленных калиевых каналов различны по молекулярно-структурной организации, тогда как внутри каждой из групп наблюдается качественное сходство в характере взаимодействия с фармакологическими агентами.

Для приготовления культуры скелетных миоцитов использовали диссоциированные клетки мезодермы эмбриона лягушки *Rana temporaria* [1]. Исследованные миобласты не имели визуально выявляемых контактов с другими клетками. Эксперименты проводили в течение первых семи суток культивирования. Токи регистрировались от целой клетки в условиях плотного контакта (whole-cell) [4]. Наружный раствор включал, мМ: NaCl 120; KCl 1.5; CaCl₂ 2; HEPES-NaOH 8; pH 7.4.

Раствор внутри пипетки имел состав, мМ: KCl 110; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1; K₂EGTA 10; HEPES-KOH 8; pH 7.2. Тестирующие агенты - дигидропиридиновый (ДГП) антагонист кальциевых каналов L-типа нифедипин ("Sigma") и блокаторы кальциевых каналов верапамил ("Sigma") и хинидин ("Sigma") - добавлялись в наружный раствор. Концентрации этих веществ, использованные в эксперименте, полностью блокируют медленный кальциевый ток миоцитов [1, 5]. Поддерживаемый потенциал составлял -80 мВ.

Влияние нифедипина в концентрации 40 - 80 мкМ на калиевые токи миоцитов изучалось с целью выявления кальций-чувствительных [6] и дигидропиридин-чувствительных [7] типов калиевых каналов. Исследование показало, что нифедипин в указанных концентрациях не оказывает влияния на амплитуду суммарного выходящего калиевого тока, так же, как и ДГП агонист кальциевых каналов Bay K 8644 в концентрациях 30 - 80 мкМ. В то же время нифедипин вызывает сдвиг кривой хордовой проводимости на 5 - 10 мВ в сторону более отрицательных потенциалов ($n = 16$) как для суммарного калиевого тока, так и для отдельных его компонентов, что, вероятно, определяется влиянием нифедипина на

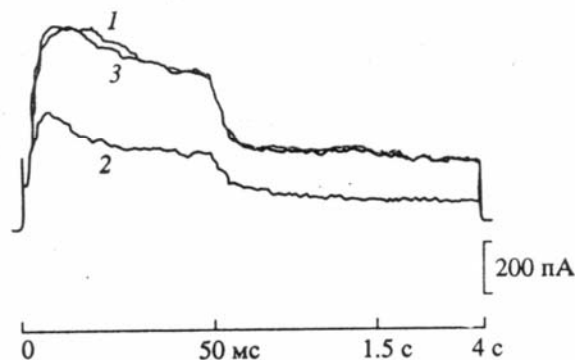


Рис. 1. Суммарный калиевый ток до (1) и после (2) воздействия 50 мкМ хинидина и после отмывания нормальным раствором (3). Тестирующий потенциал +10 мВ. Шкала времени линейна от 0 до 50 мс, от 50 мс до 1.5 с и от 1.5 с до 4 с. 3-и сутки развития.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской Академии наук,
Санкт-Петербург

Институт физиологии им. А.А. Ухтомского
Санкт-Петербургского государственного
университета, Санкт-Петербург

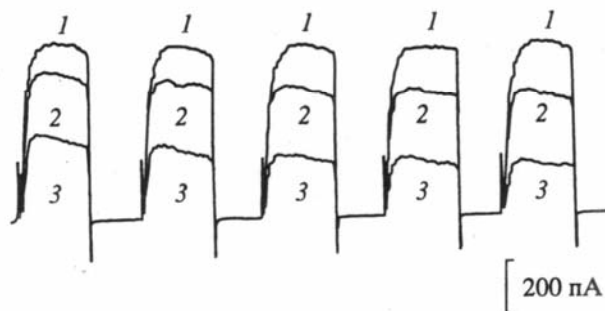


Рис. 2. Влияние хинидина на суммарный калиевый ток. Приведены записи калиевого тока в ответ на приложение серии коротких (50 мс) деполяризующих импульсов (от -80 мВ к 0 мВ) с интервалом 1 с до (1) и после воздействия хинидина в концентрации 50 мкМ (2) и 150 мкМ (3). 5-е сутки развития.

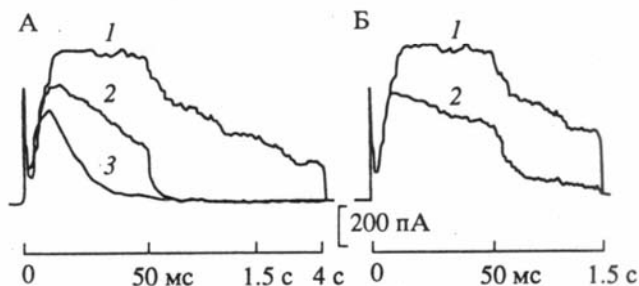


Рис. 3. Калиевые токи до (А1 и Б1) и после воздействия верапамила в концентрациях 50 мкМ (А2) и 140 мкМ (А3), а также после отмытия (Б2). Тестирующий потенциал $+10$ мВ. Шкала времени, как на рис. 1. 1-е сутки развития.

величину отрицательного поверхностного заряда в результате замещения части ионов кальция в экранирующем слое. Величина смещения кривой количественно эквивалентна эффекту уменьшения наружной концентрации ионов кальция примерно в e раз [8 - 10], что свидетельствует о более высоком сродстве нифедипина к отрицательно заряженным группам на поверхности мембраны миоцита по сравнению с ионами кальция, но более слабом экранирующем эффекте. Полученные данные свидетельствуют о том, что К-каналы скелетного миоцита лягушки не относятся к известным из литературы ДГП-чувствительным, а также о том, что описанные ниже эффекты верапамила и хинидина не опосредованы изменением внутриклеточной концентрации свободного кальция как результата активации медленных кальциевых каналов, а вызваны взаимодействием этих агентов со структурой калиевого канала и/или его окружения. Быстрый кальциевый ток скелетных миоцитов лягушки [5] в данном случае во внимание не принимался, поскольку его вклад в изменение внутриклеточной концентрации свободного кальция незначителен по сравнению с медленным ДГП-зависимым кальциевым током [1].

Хинидин в концентрации от 30 до 200 мкМ ($C_{0.5} = 75$ мкМ) оказывает обратимое блокирующее действие на все типы калиевого тока миоцита (рис. 1) ($n = 6$) и вызывает ускорение спада тока (в 2 - 3 раза при концентрации 150 мкМ). При приложении серии коротких стимулов наблюдается существенное усиление блокирующего эффекта (рис. 2). При этом в промежутках между деполяризующими стимулами дополнительного блокирования не происходит. Совокупность данных позволяет предположить, что хинидин взаимодействует со всеми типами К-каналов миоцита по механизму блокирования, причем связывание происходит преимущественно, если не исключительно, при открытом состоянии канала. Аналогичные предположения были сделаны в работах [11, 12] по результатам исследования влияния хинидина и хинина на калиевые токи пирамидальных нейронов гиппокампа крысы и бета-клеток поджелудочной железы мыши.

Верапамил в концентрации от 100 до 700 мкМ дозозависимо ингибирует суммарный калиевый ток миоцита ($C_{0.5} = 200$ мкМ) и существенно изменяет его кинетику (рис. 3) ($n = 9$). Медленные калиевые токи необратимо устраняются верапамилем в концентрации 0.1 мМ. Что касается быстрых калиевых токов, то под воздействием верапамила происходит зависимое от концентрации обратимое увеличение скорости инактивации (в 8 - 10 раз при концентрации 300 мкМ). Деполяризующая стимуляция ускоряла развитие этого эффекта, что, вероятно, указывает на преимущественное взаимодействие верапамила с быстрыми К-каналами в открытом состоянии. Анализ кинетики инактивации быстрых калиевых токов при различных концентрациях верапамила позволяет предположить, что в основе механизма его воздействия лежит модифицирующее влияние на инактивационный механизм быстрых К-каналов.

Приведенные данные говорят о том, что К-каналы миоцитов лягушки: 1) нечувствительны к ДГП; 2) подвержены действию недигидропиридиновых кальциевых блокаторов; 3) по фармакологическим характеристикам делятся на две группы: первая - К-каналы, которые необратимо блокируются верапамилем и 4-АП (ток имеет медленную кинетику); вторая - каналы, которые обратимо ингибируются верапамилем и 4-АП (ток имеет быструю кинетику).

Литературные данные [13 - 15] позволяют предположить, что подобное разделение 9 кинетических типов калиевого тока, которые функционируют на различных стадиях миогенеза [1], на две группы, различающиеся по реакции на фармакологические агенты, можно объяснить различиями в мультимерной структуре канала. При этом в процессе миогенеза в результате постепенной экспрессии генов из одного набора мономеров могут образовываться различные по своим кинетическим характеристикам К-каналы-мультимеры со

сходной реакцией на воздействие фармакологических агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 93-04-21536).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lukyanenko V.I., Katina I.E., Nasledov G.A., Lonsky A.V.* // Gen. Physiol. Biochem. 1993. V. 12. № 3. P. 231 - 247.
2. *Adrian R.H., Chandler W.K., Hodgkin A.L.* // J. Physiol. 1970. V. 208. № 3. P. 607 - 669.
3. *Lynch C.* // Ibid. 1985. V. 368. P. 359 - 392.
4. *Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al.* // Pflügers Arch. 1981. B. 391. № 1. S. 85 - 100.
5. *Lukyanenko V.I., Katina I.E., Nasledov G.A.* // Нейрофизиология. 1994. Т. 2. № 1. С. 53 - 58.
6. *Lattore A.O., Labarca P., Alvarez O.* // Ann. Rev. Physiol. 1989. V. 51. P. 385 - 401.
7. *Valmier J., Richard S., Devic E. et al.* // Pflügers Arch. 1991. B. 419. S. 281 - 287.
8. *Gilbert D.L., Ehrenstein G.* // Biophys. J. 1969. V. 9. № 3. P. 447 - 469.
9. *Mozhayeva G.N., Naumov A.P.* // Nature. 1970. V. 228. P. 164 - 165.
10. *Ehrenstein G., Gilbert D.L.* // Biophys. J. 1973. V. 13. № 5. P. 495 - 497.
11. *Oyama Y., Harata N., Akaike N.* // Jap. J. Pharmacol. 1992. V. 58. № 2. P. 185 - 189.
12. *Bokvist K., Rorsman P., Smith P.* // J. Physiol. 1990. V. 423. P. 311 - 325.
13. *McCormack K., Lin J.W., Iverson L.E., Rudy B.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 171. № 3. P. 1361 - 1371.
14. *Pongs O.* // Physiol. Rev. 1992. V. 72. P. S69 - S88.
15. *Pongs O.* // J. Membrane Biol. 1993. V. 136. P. 1 - 8.