

УДК 591.175:577.352.3146

## ДЕЙСТВИЕ АДРЕНАЛИНА НА ИОННЫЕ ТОКИ ЧЕРЕЗ ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ МИОБЛАСТОВ ЛЯГУШКИ

© 1995 г. В. И. Лукьяненко, И. Е. Катина, Г. А. Наследов, Д. А. Терентьев

Представлено академиком В.Л. Свицерским 13.04.95 г.

Поступило 13.04.95 г.

Из литературы известно, что катехоламины оказывают активирующее влияние на медленные дигидропиридин(ДГП)-чувствительные и быстрые ДГП-нечувствительные потенциал-управляемые кальциевые каналы зрелых скелетно-мышечных волокон (СМВ) лягушки через бета-адренорецепторы [1, 2]. Однако до сих пор эти эффекты не были исследованы в ходе миогенеза СМВ. В то же время известно, что бета-адренергическая регуляция осуществляется с участием аденилатциклазного комплекса, который хотя и развивается как единая функциональная система, но его молекулярные блоки формируются гетерохронно, что сказывается на особенностях функционирования этого комплекса на различных этапах миогенеза [3 - 6]. В то же время известно, что в процессе развития в условиях культивирования миобласт проходит стадии активного белкового синтеза, приводящего к появлению ионных каналов с новыми кинетическими характеристиками [7 - 9]. В данной статье показаны адренергические эффекты на ионные токи через быстрые и медленные потенциал-управляемые кальциевые каналы (ICa) культивируемых миобластов лягушки, кинетические и фармакологические характеристики которых были описаны нами ранее [10 - 12].

Для приготовления культуры скелетных миобластов использовали диссоциированные в бескальциевом растворе клетки мезодермы эмбриона лягушки *Rana temporaria* (стадия ранней нейрулы) [10]. Состав культурального раствора: 60% среда 199М (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва), 2% сыворотка эмбрионов коров (ИЧП "Биолот", Санкт-Петербург), 50 Ед/мл бензилпенициллина (натриевая соль) и 50 мкг/мл

стрептомицина (сульфат). Исследованные миобласты не имели визуально выявляемых контактов с другими клетками. Эксперименты проводили со вторых по десятым суткам культивирования.

Токи регистрировали от целой клетки в условиях плотного контакта (whole-cell) по стандартной методике [13]. Наружный раствор включал (ммоль/л): NaCl 120, KCl 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES-NaOH 8; pH 7.4. Раствор внутри пипетки имел состав (ммоль/л): CsCl 60, TEACl 50, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, K<sub>2</sub>EGTA 10, HEPES-KOH 8; pH 7.2. Тестирующие агенты: дигидропиридиновый (ДГП) антагонист медленных кальциевых каналов нифедипин ("Sigma"), адреналин ("Sigma"), активатор бета-адренорецепторов изопротеренол ("Sigma") и бета-адреноблокатор обзидан ("Germed") добавлялись в наружный раствор. Поддерживаемый потенциал составлял -80 мВ.

Со вторых по шестым суткам после распластывания миобластов на покровном стекле адреналин и изопротеренол в концентрациях 0.1 - 10 мкмоль/л на 15 - 20% увеличивали амплитуду медленного и быстрого ICa. Это увеличение амплитуды было плохо выражено из-за известного феномена постоянного снижения амплитуды тока (run-down) в результате смешивания внутрипипеточного и внутриклеточного растворов. При этом амплитуда и быстрого, и медленного ICa не превышала амплитуды тока во время контрольного стимула. Для определения эффекта воздействия на фоне падения амплитуды мы считали его линейным.

Начиная с седьмых суток культивирования адреналин и изопротеренол в тех же концентрациях увеличивали амплитуду быстрого и медленного ICa на 40 - 60%. При этом амплитуда тока после воздействия адреналина или изопротеренолом всегда превышала амплитуду тока во время контрольного стимула. На рис. 1 показано увеличение амплитуды медленного ICa после воздействия 2 мкмоль/л адреналина. Смещение вольт-амперной характеристики на 5 - 10 мВ в сторону более отрицательных потенциалов (рис. 1б) свойствен

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

*Институт физиологии им. А.А. Ухтомского  
Санкт-Петербургского государственного  
университета*

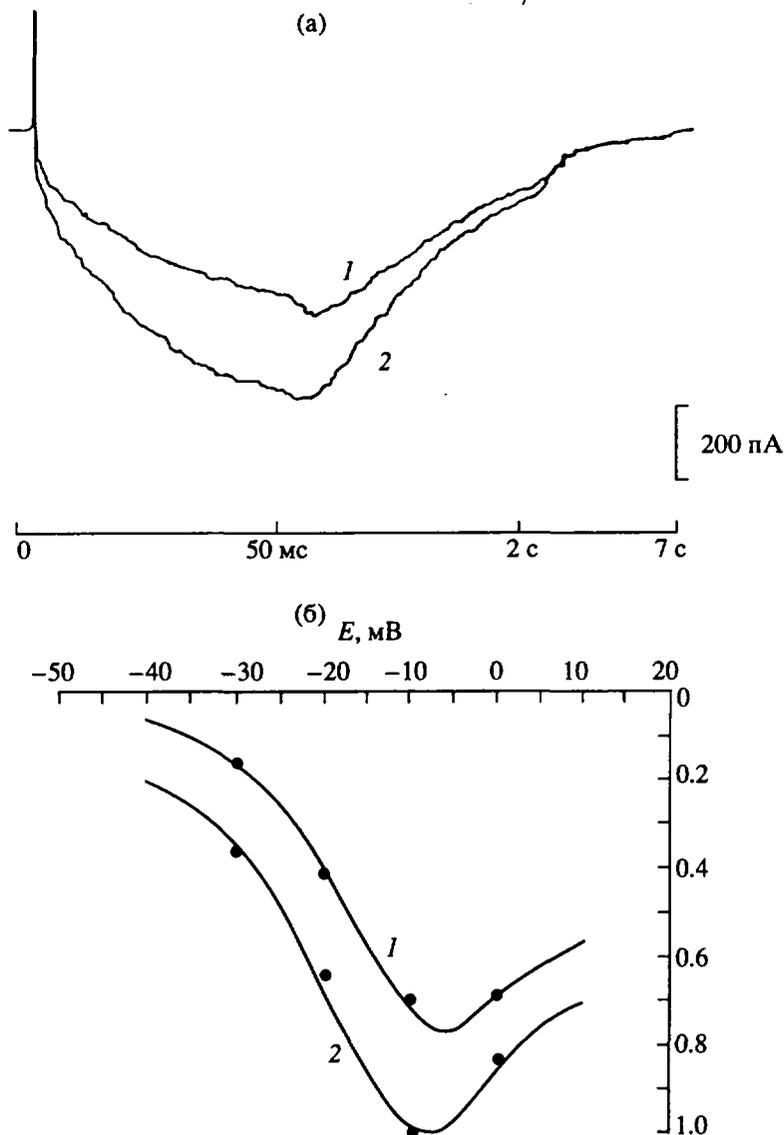


Рис. 1. Воздействие адреналина на медленный кальциевый ток миоблеста лягушки. а – записи медленного кальциевого тока (после вычитания утечки) до (1) (контроль) и после (2) замены стандартного наружного раствора на стандартный раствор с адреналином в концентрации 2 мкмоль/л. Тестирующий потенциал  $-10$  мВ. Шкала времени линейна от 0 до 50 мс, от 50 мс до 2 с и от 2 с до 7 с. 7-е сутки развития. б – вольт-амперные характеристики медленного кальциевого тока до (1) (контроль) и после (2) воздействия адреналина в концентрации 1 мкмоль/л; абсцисса – значения тестирующего потенциала, ордината – амплитуда кальциевого тока, отн. ед.

но и зрелым СМВ лягушки [2]. На рис. 2 показан эффект воздействия 1 мкмоль/л изопротеренола на амплитуду быстрого ИСа. График изменения амплитуды ИСа во время эксперимента (рис. 2б) хорошо демонстрирует феномен падения амплитуды быстрого ИСа и позволяет более точно оценить эффект изопротеренола при допущении линейности характера падения амплитуды. Значительное увеличение эффекта воздействия адреналина и изопротеренола, начиная с седьмых суток культивирования, может быть связано с созреванием комплекса бета-адренорецептор-аденилатциклизная система. В литературе отмечается, что на

6 - 7-е сутки культивирования приходится пик белкового синтеза, заканчивается формирование и накопление ионных каналов и рецепторов [7 - 9, 14]. При этом наблюдаемый до 6 суток культивирования незначительный эффект адреналина и изопротеренола мог быть опосредован не бета-адренорецептор-аденилатциклизным комплексом в целом, а прямо G-белками [14]. Это предположение подтверждается и другими данными, полученными в ходе данного эксперимента. Нами отмечен необычный эффект известного бета-адреноблокатора обзидана (он же пропранолол, анаприлин, индерал) на амплитуду и быстрого и

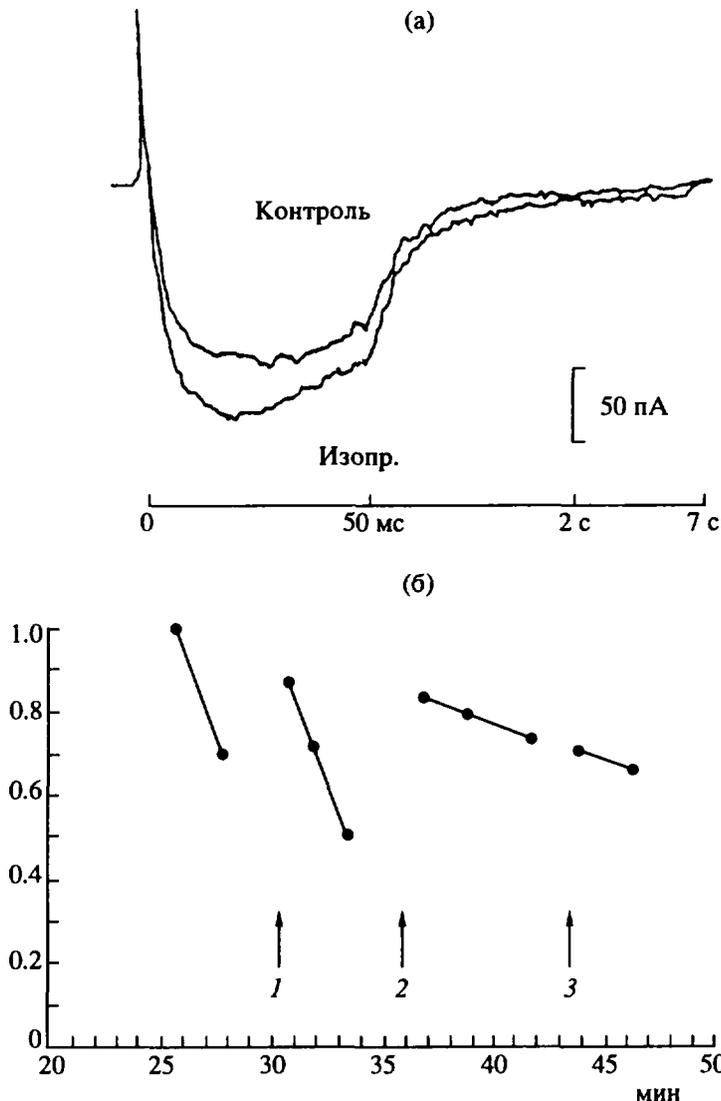


Рис. 2. Воздействие изопротеренола на быстрый кальциевый ток миоблеста лягушки. а – записи быстрого кальциевого тока (после вычитания утечки) до (1) (контроль) и после (2) замены стандартного наружного раствора на стандартный раствор с изопротеренолом в концентрации 1 мкмоль/л. Тестирующий потенциал  $-20$  мВ. Шкала времени как на рис. 1. 10-е сутки развития. б – динамика изменения максимальной амплитуды быстрого кальциевого тока в течение эксперимента; абсцисса – время от начала эксперимента, ордината – амплитуда тока, отн. ед.; стрелками указаны моменты замены стандартного наружного раствора на стандартный наружный раствор с добавлением 1 мкмоль/л изопротеренола (1) или 1 мкмоль/л изопротеренола и 1 мкмоль/л обзидана (2); отмыв миоблеста от изопротеренола и обзидана (3) производился стандартным наружным раствором.

медленного  $ICa$  (рис. 2б): обзидан в концентрациях 0.1 - 10 мкмоль/л вместо снятия активирующего воздействия адреналина или изопротеренола оказывал сопоставимый с ними положительный эффект на быстрые и медленные кальциевые каналы на всех стадиях культивирования. Подобный эффект мог быть результатом незрелости регуляторного комплекса именно на уровне субъединиц G-белков. В литературе имеются только отрывочные сообщения о необычных эффектах, связанных с адренорецепторами, на ранних этапах миогенеза [15]. Как правило,

эти эффекты связывают именно с прямым воздействием претерпевающих структурные изменения G-белков [14, 15]. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что экспрессия генов, кодирующих структуру белков различных звеньев бета-адренергического регуляторного комплекса, в ходе миогенеза происходит гетерохронно, что проявляется в различной эффективности влияния адреналина и изопротеренола на различных этапах культивирования миобластов.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что: 1) бета-адренергический регуляторный комплекс может активировать быстрые и медленные потенциал-управляемые кальциевые каналы скелетных миоцитов лягушки; 2) существует стадия миогенеза, на которой регулирующее адренергическое влияние значительно возрастает.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научного фонда (ISF Grant № NVQ 000).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arreola J., Calvo J., Garcia M.C., Sanchez J.A.* // *J. Physiol.* 1987. V. 393. P. 307 - 330.
2. *Kokate T.G., Heiny J.A., Sperelakis N.* // *Amer. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. C47 - C53.
3. *Перцева М.Н.* Молекулярные основы развития гормонокомпетентности. Л.: Наука, 1989. 251 с.
4. *Reddy N.B., Oliver K.L., Engel W.K.* // *Federal Proc.* 1979. V. 38. P. 843.
5. *Smith P.B., Clarc G.F.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. V. 633. P. 247 - 288.
6. *Smith P.B.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 7294 - 7299.
7. *Schmid A., Renaud J.-F., Fosset M. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 11366 - 11372.
8. *Amagai Y., Kasai Sh.* // *Jap. J. Physiol.* 1989. V. 39. P. 33 - 42.
9. *Zemkova H., Vyskocil F., Tolar M. et al.* // *Biochim. biophys. acta.* 1989. V. 986. P. 146 - 150.
10. *Lukyanenko V.I., Katina I.E., Nasledov G.A., Lonsky A.V.* // *Gen. Physiol. Biochem.* 1993. V. 12. № 3. P. 231 - 247.
11. *Lukyanenko V.I., Katina I.E., Nasledov G.A.* // *Нейрофизиология.* 1994. Т. 2. № 1. С. 43 - 47.
12. *Lukyanenko V.I., Katina I.E., Nasledov G.A.* // *Gen. Physiol. Biochem.* 1994. V. 13. P. 237 - 246.
13. *Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al.* // *Pflügers Arch.* 1981. B. 391. № 1. S. 85 - 100.
14. *Northup J.K.* In: *Molecular Aspects of Cellular Regulation.* N.Y.: Elsevier, 1985. V. 4. P. 91 - 116.
15. *Somasundaram B., Tregear R.T.* // *J. Muscle Res. Cell Motility.* 1993. V. 14. P. 341 - 346.