

7. Johansson B., Somlyo A. V. Electrophysiology and excitation-contraction coupling // Handbook of physiology. The cardiovascular system II. Vascular smooth muscle.—Bethesda: Amer. Physiol. Soc., 1980.—P. 301—324.
8. Karaki H., Nakagawa H., Urakawa N. Comparative effects of verapamil and sodium nitroprusside on contraction and ^{45}Ca uptake in the smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta and guinea pig taenia coli // Brit. J. Pharmacol.—1984.—81, N 3.—P. 393—400.
9. Karaki H., Murakami K., Urakawa N. Mechanism of inhibitory action of sodium nitroprusside in vascular smooth muscle of rabbit aorta // Arch. Int. pharmacodyn. et ther.—1986.—280, N 2.—P. 230—241.
10. Katsuki S., Arnold W. P., Murad F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues // J. Cyclic Nucleotide Res.—1977.—3, N 2.—P. 239—247.
11. Loutzenhiser R., Leyten P., Saida K., van Breemen C. Calcium compartments and mobilization during contraction of smooth muscle // Calcium and contractility: smooth muscle.—Clifton; New Jersey: Humana press, 1984.—P. 61—92.
12. Peroutka S. J. Vascular serotonin receptors. Correlation with 5-HT₁ and 5-HT₂ binding sites // Biochem. Pharmacol.—1984.—33, N 15.—P. 2349—2353.
13. Rasmussen H., Barrett P. Q. Calcium messenger system: an integrated view // Physiol. Rev.—1984.—64, N 3.—P. 938—984.
14. Robinson B. F. Functional differences in blood vessels determined from studies with calcium-channels blockers // Amer. J. Cardiol.—1985.—55, N 3.—P. 24B—29B.
15. Sekar M. C., Hokin L. E. The role of phosphoinositides in signal transduction // J. Membrane Biol.—1986.—89, N 3.—P. 193—210.
16. Somlyo A. V., Bond M., Somlyo A. P., Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 8.—P. 5231—5235.
17. Towart R. The selective inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium-antagonistic dihydropyridines // Circulat. Res.—1981.—48, N 5.—P. 650—657.
18. Yamamoto H., van Breemen C. Inositol 1,4,5-trisphosphate release calcium from skinned cultured smooth muscle cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1985.—130, N 1.—P. 270—274.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 19.05.87

УДК 577.352.42

Са-активируемая калиевая проводимость мембраны пептониндуцированных перитонеальных макрофагов мыши

А. А. Маляев, А. А. Галкин

Калиевая проводимость обнаружена в мембранах практически всех изученных клеток и обусловлена, как правило, работой ионных каналов. Калиевые каналы участвуют не только в генерации мембранного потенциала, но, видимо, и в регуляции некоторых процессов, происходящих внутри клетки или на мембране. Например, показано, что блокирование калиевой проводимости в мембранах человеческих Т-лимфоцитов ингибирует синтез ДНК, секрецию интерлейкина-2, а стимуляторы митогенеза вызывают увеличение калиевой проводимости [2, 3].

Опубликованы работы, в которых показано, что хемоаттрактанты (индукторы хемотаксиса) [5] и фагоцитирование частиц латекса [11] вызывают гиперполяризацию мембран макрофагов. Логично поэтому предположить, что ионная проводимость мембран макрофагов участвует в регуляции таких функций, как активация, фагоцитоз, секреция и хемотаксис.

До сих пор калиевая проводимость обнаружена в мембранах только культивированных макрофагов [6, 7, 13], на оторванных участках мембран некультивированных макрофагов таковая не обнаружена [1, 10, 12].

В настоящей работе представлены результаты исследований ионной проводимости мембран некультивированных пептониндуцированных мышинных макрофагов.

Методика

Исследования выполнены на мембранах целых клеток. Использовали нелинейных мышей, которым вводили внутрибрюшинно 2 мл 3 %-ного раствора пептона. На 10—20-е сутки после введения пептона брюшную полость декапитированной мыши заполняли 5 мл рабочего раствора и массировали ее в течение 0,5—1 мин. Полученную внутрибрюшинную смесь сливали через отверстие в брюшине диаметром 4—5 мм. Две—четыре капли клеточной суспензии помещали в рабочую проточную камеру, имеющую стеклянное дно и полезный объем 0,3 мл. В течение 8—10 мин клетки оседали и прикреплялись к стеклу (в условиях выключенного протока в камере), после чего включали проток и смывали неприкрепившиеся клетки. Время от прикрепления клетки к стеклу до измерений составляло не более 3 ч.

Основной клеточной средой служил модифицированный раствор Хенкса (рабочий раствор) следующего состава (ммоль/л): NaCl — 133; KCl — 4,6; MgCl₂ — 0,3; CaCl₂ — 1,6; 10 HEPES («Serva», ФРГ) — 10; глюкоза — 11 (pH 7,3). Состав пипеточного раствора (ммоль/л): KCl — 140; NaCl — 10; MgCl₂ — 2; HEPES — 10 (pH 7,2).

Для получения необходимых концентраций свободного кальция использовали Ca-ЭГТА-буфер (ЭГТА, фирма «Sigma», США) в следующих пропорциях:

$$1,1 \text{ ммоль/л ЭГТА, } 1,1 \text{ ммоль/л CaCl}_2 - [\text{Ca}^{2+}] = 1,4 \cdot 10^{-5} \text{ ммоль/л;}$$

$$1,1 \text{ ммоль/л ЭГТА, } 0,9 \text{ ммоль/л CaCl}_2 - [\text{Ca}^{2+}] = 7,6 \cdot 10^{-7} \text{ ммоль/л,}$$

$$1,1 \text{ ммоль/л ЭГТА, } 0,6 \text{ ммоль/л CaCl}_2 - [\text{Ca}^{2+}] = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ ммоль/л;}$$

$$1,1 \text{ ммоль/л ЭГТА, } 1 \text{ ммоль/л CaCl}_2 - [\text{Ca}^{2+}] = 1,7 \cdot 10^{-8} \text{ ммоль/л.}$$

Приведенные концентрации свободного кальция рассчитывали с использованием формул и констант равновесия, приведенных в работе A. Fabiato и F. Fabiato [4].

Для определения селективности мембраны к одновалентным ионам использовали следующие внешние растворы (ммоль/л):

KCl — 150, HEPES — 10 (pH 7,3);

KCl — 75, HEPES — 5 (pH 7,3);

KCl — 75, NaCl — 75, HEPES — 10 (pH 7,3);

KCl — 75, NaCl — 15, TEA — 60, HEPES — 10 (pH 7,3).

Измерения проводили при температуре 8—10 °C. Ионные токи через мембрану макрофагов регистрировали, применяя «патч-метод» [9], в конфигурации «whole-cell». Для изготовления пипеток использовали капилляры из боросиликатного стекла. Пипетки заполняли одним из указанных пипеточных растворов. Сопротивление готовой пипетки составляло 5—10 МОм. Для получения необходимой конфигурации вначале получали высокоомный контакт (более 50 ГОм) между пипеткой и поверхностью мембраны клетки, а затем мембрану под пипеткой прорывали резким изменением давления внутри пипетки (отрицательное давление до 100 см вод. ст.). О прорыве мембраны судили по увеличению емкостной составляющей в выходном сигнале в ответ на ступенчатое изменение потенциала (1 мВ).

Измерительная головка представляла собой измеритель тока, собранный по схеме «виртуальная земля», сопротивление в обратной связи составляло 15 ГОм. Измерительная схема через систему интерфейсов, собранных в стандарте КАМАК и управляемых автономным контролером, соединена с персональным компьютером ДВК-2М, к системе были также подключены «монитор с цифровой памятью» и графопостроитель. Управление экспериментом, за исключением смены растворов, осуществлялось с клавиатуры компьютера. Практически вся выходная информация обрабатывалась в ходе эксперимента.

Результаты

Для получения вольт-амперных характеристик (ВАХ) мембран потенциал на мембране линейно изменяли ($E = a \cdot t + b$ — «пила» с максимальным диапазоном ± 80 мВ и максимальной скоростью 40 мВ/с, где E — потенциал на мембране, t — время). Пример записи ионного тока

в условиях, когда снаружи мембраны находится рабочий раствор, а концентрация Ca^{2+} в пипетке составляет $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, показан на рис. 1, а. ВАХ, построенная по результатам этой записи (рис. 1, б), имеет явно нелинейный характер с четко выраженным отрицательным наклоном в области положительных напряжений. При использовании пипеточных растворов ($[\text{Ca}^{2+}] > 2,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л) у 20 % клеток измеренная проводимость после прорыва мембраны практически не отличалась от проводимости утечки до прорыва и составляла ~ 15 пС. Характеристики клеточных мембран в таких случаях мы не измеряли. Во всех экспериментах ($[\text{Ca}^{2+}] > 2,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л) ветвь ВАХ, соответствующая увеличению напряжения на мембране, проходит выше ветви, соответствующей уменьшению напряжения. Ни отрицательный наклон, ни гистерезисное поведение не наблюдались в экспериментах, когда концентрация Ca^{2+} в пипетке была меньше $2,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

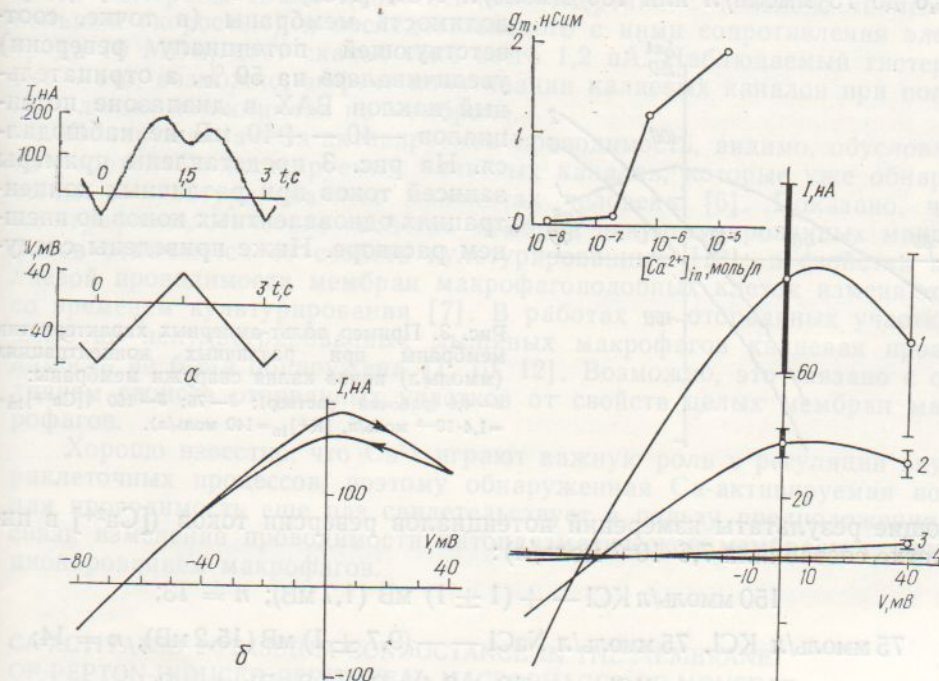


Рис. 1. Пример записи токов через цитоплазматическую мембрану макрофагов в конфигурации whole-cell (а) и вольт-амперная характеристика мембраны, построенная по данной записи (б).

Объяснение в тексте.

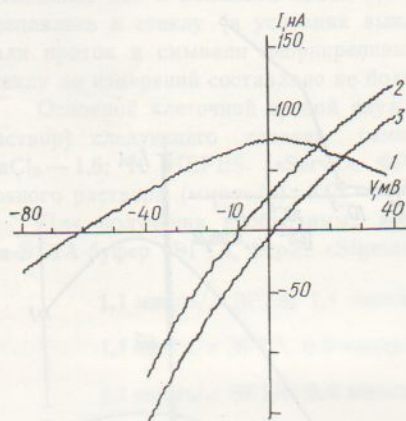
Рис. 2. Вольт-амперные характеристики мембран макрофагов при различных концентрациях Ca^{2+} (моль/л) внутри пипетки:

1 — $1,4 \cdot 10^{-5}$; 2 — $7,6 \cdot 10^{-7}$; 3 — $2 \cdot 10^{-7}$; 4 — $1,7 \cdot 10^{-8}$. Показаны средние квадратичные отклонения от средних значений токов при потенциалах 0 и 40 мВ. Вверху: зависимость проводимости мембраны от концентрации Ca^{2+} внутри пипетки. Проводимость рассчитывали как тангенс угла наклона кривых, изображенных на рисунке, в точке пересечения линии нулевого тока (в точке, соответствующей потенциалу реверсии). Снаружи мембраны — рабочий раствор.

Для определения зависимости проводимости мембран от концентрации внутриклеточного свободного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) использовали пипеточные растворы с различными $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, лежащими в физиологических пределах (от 10^{-8} до 10^{-5} моль/л). На рис. 2 представлены результаты измерений ВАХ при различных концентрациях Ca^{2+} в пипеточном растворе (представлена только ветвь ВАХ, соответствующая увеличению потенциала на мембране). Показана также зависимость проводимости мембраны в точке, соответствующей потенциалу реверсии тока, от $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Потенциалы реверсии токов составляли $-(62 \pm 3)$ мВ (среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение, $n=10$) при $[\text{Ca}^{2+}]$ в пипетке $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $-(56 \pm 6)$ мВ ($n=18$) при $[\text{Ca}^{2+}]$ $7,6 \times$

$\times 10^{-7}$ моль/л, $-(49 \pm 8)$ мВ ($n=5$) при $[Ca^{2+}]$ $2,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Разница между потенциалами реверсии, измеренными при различных $[Ca^{2+}]_{in}$, лежит в пределах средних квадратичных отклонений, поэтому никаких выводов по этому поводу мы пока не делаем.

Для определения ионной селективности мембраны измеряли ВАХ при различных концентрациях одновалентных ионов во внешнем растворе. При увеличении концентрации K^+ во внешнем растворе (от 4,6 до 75 ммоль/л или 150 ммоль/л KCl, $[KCl]_{in}=140$ ммоль/л) проводимость мембраны (в точке, соответствующей потенциалу реверсии)



увеличивалась на 50 %, а отрицательный наклон ВАХ в диапазоне потенциалов -40 — $+40$ мВ не наблюдался. На рис. 3 представлены примеры записей токов при различных концентрациях одновалентных ионов во внешнем растворе. Ниже приведены следующие

Рис. 3. Пример вольт-амперных характеристик мембраны при различных концентрациях (ммоль/л) ионов калия снаружи мембраны: 1— 4,6 (рабочий раствор); 2— 75; 3— 150 ($[Ca^{2+}]_{in} = 1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $[K^+]_{in} = 140$ ммоль/л).

ующие результаты измерений потенциалов реверсии токов ($[Ca^{2+}]$ в пипетке составляла $7,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л):

150 ммоль/л KCl — $+(1 \pm 1)$ мВ (1,7 мВ); $n = 13$;

75 ммоль/л KCl, 75 ммоль/л NaCl — $-(9,7 \pm 1)$ мВ (15,2 мВ), $n = 14$;

75 ммоль/л KCl — $-(10 \pm 0,4)$ мВ (15,2 мВ); $n = 9$;

75 ммоль/л KCl, 60 ммоль/л TEA, 15 ммоль/л NaCl — -10 мВ (15,2 мВ); $n = 2$

Для сравнения в скобках указаны значения потенциалов, рассчитанных по уравнению Нернста при условии, что мембрана проницаема только для ионов калия.

Зависимость потенциалов реверсии от концентрации кальция внутри пипетки не обнаружена. Добавление во внешний раствор тетраэтиламмония хлорида (ТЕА, до 60 ммоль/л) не вызывает блокирования токов. Добавление 20 ммоль/л $BaCl_2$ во внешний K^+ -содержащий раствор ($[K^+] = 75$ ммоль/л) уменьшает проводимость мембраны только на (25 ± 7) % ($n=7$), не изменяя форму ВАХ.

Обсуждение

Нечувствительность потенциала реверсии токов к добавлению во внешний раствор NaCl и замене NaCl на ТЕА-хлорид позволяет сделать вывод, что мембрана проницаема для K^+ и непроницаема для Na^+ и Cl^- . То, что потенциал реверсии токов при концентрации K^+ , составляющей 4,6 и 75 ммоль/л, не совпадал со значениями равновесного K^+ -потенциала, можно объяснить шунтированием проводимости собственно мембраны сопротивлением утечки между мембраной и стеклом.

Обнаруженный отрицательный наклон ВАХ в области положительных напряжений подтверждает результаты предшествующих работ на культивируемых мышинных перитонеальных макрофагах с использованием микроэлектродной техники [8]. То, что отрицательный наклон и гистерезисное поведение ВАХ не обнаружены при концентрациях Ca^{2+} в пипетке, меньших $2,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л, возможно, связано со сравнимостью по порядку значений проводимости утечки (50 ГОм соответ-

ствует 20 пСим) и регистрируемой проводимости (меньше 72 пСим).

Гистерезисное поведение вольт-амперной характеристики нельзя объяснить скачком тока в ответ на смену знака скорости изменения напряжения на мембране, так как «пила» со скоростью 40 мВ/с на импедансе, составленном из проводимости мембраны 1 нС (что примерно соответствует измеренной проводимости мембраны, когда концентрация кальция внутри пипетки составляла $7,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л), емкости мембраны 15 пФ (собственные измерения с помощью «пилы» с большой скоростью) и последовательного с ними сопротивления электрода 10 МОм, дает скачок тока всего 1,2 пА. Наблюдаемый гистерезис — это, возможно, эффект инактивации калиевых каналов при положительных потенциалах на мембране.

Обнаруженная Са-активируемая проводимость, видимо, обусловлена работой Са-активируемых калиевых каналов, которые уже обнаружены в культивированных моноцитах человека [6]. Показано, что электрофизиологические свойства мембран некультивированных макрофагов отличаются от свойств культивированных [13], а свойства калиевой проводимости мембран макрофагоподобных клеток изменяются со временем культивирования [7]. В работах на оторванных участках мембран некультивированных мышинных макрофагов калиевая проводимость не была обнаружена [1, 10, 12]. Возможно, это связано с отличием свойств оторванных участков от свойств целых мембран макрофагов.

Хорошо известно, что Ca^{2+} играют важную роль в регуляции внутриклеточных процессов, поэтому обнаруженная Са-активируемая ионная проводимость еще раз свидетельствует в пользу предположения о связи изменений проводимости цитоплазматической мембраны с функционированием макрофагов.

CA-ACTIVATED POTASSIUM CONDUCTANCE IN THE MEMBRANE OF PEPTON-INDUCED PERITONEAL MACROPHAGES OF MOUSE

A. A. Malyaev, A. A. Galkin

Ionic permeability of the cell membrane of pepton-induced mouse peritoneal macrophages was studied using patch-clamp technique in the «whole-cell» configuration. Current-voltage (I-V) relations were obtained from measurements of ionic currents during ramp voltage clamp pulses. It was shown that membrane conductance in the region of reversal potential (E_{rev}) increases with elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ within the range from $1,7 \cdot 10^{-8}$ mol/l to $1,4 \cdot 10^{-5}$ mol/l. In the region of positive potentials I-V relations at $[\text{Ca}^{2+}] > 2 \cdot 10^{-7}$ mol/l had a negative slope. Changes in the E_{rev} value at different ionic concentrations indicated that the ion transport system under study was permeable for K^+ but not permeable for Na^+ and Cl^- . The results obtained suggest that the membrane of pepton-induced mouse peritoneal macrophages has a system of Ca^{2+} -activated K^+ -permeability.

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

1. Галкин А. А., Маляев А. А. Одиночные хлорные каналы высокой проводимости в мембране перитонеальных макрофагов мыши. Биол. мембраны. — 1985. — № 12. — С. 1242—1245.
2. Chandy K. G., DeCoursey T. E., Cahalan M. D. et al. Voltage-gated K channels are required for T-lymphocyte activation // J. Exp. Med. — 1984. — 160, N 2. — P. 369—385.
3. DeCoursey T. E., Chandy K. G., Gupta S., Cahalan M. D. Voltage-gated K channels in human T-lymphocytes: a role in mitogenesis? // Nature. — 1984. — 307, N 5950. — P. 465—468.
4. Fabiato A., Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells // J. Physiol. (Paris). — 1979. — 75, N 5. — P. 463—503.
5. Gallin E. K., Gallin J. I. Interaction of chemotactic factors with human macrophages: induction of transmembrane potentials // J. Cell. Biol. — 1977. — 75, N 1. — P. 277—288.