

Выявление потенциалозависимых калиевых каналов плазматической мембраны секреторных клеток

Результаты пропускания через плазматическую мембрану клеток слюнной железы виноградной улитки толчков деполяризующего тока указывают на то, что мембрана этих клеток не способна генерировать потенциалы действия, однако ей свойственно задержанное выпрямление [1]. Это свидетельствует о наличии в мембране секреторных клеток потенциалозависимой калиевой проводимости. Цель нашей работы — выявление в плазматической мембране секреторных клеток потенциалозависимого выходящего калиевого тока.

Методика

Опыты проведены на изолированных клетках слюнной железы личинки хирономуса. Препарирование желез и изолирование клеток осуществляли в физиологическом растворе, состав которого описан ранее [3]. Клетки изолировали, используя миниатюрный режущий инструмент, а не протеолитические ферменты, поскольку последние вызывают изменение электрофизиологических свойств клеточной мембраны [2, 4]. Калиевый ток регистрировали при наличии лишь калиевого трансмембранного градиента. Остальные проникающие через мембрану ионы заменяли во вне- и внутриклеточном растворах непроницающими ионами. При этом внутриклеточную перфузию осуществляли изотоническим (97,43 ммоль/л) раствором K_2HPO_4 . Во внеклеточном растворе NaCl заменяли эквимоллярным количеством $tris-PO_4$. Вне- и внутриклеточный растворы содержали 5,55 ммоль/л глюкозы; pH внеклеточного раствора поддерживали на уровне 7,2, внутриклеточного — 7,0. Для регистрации калиевого тока использовали метод фиксации потенциала в условиях внутриклеточной перфузии [7]. Мембранный потенциал (МП) фиксировали на нулевом уровне и контролировали универсальным вольтметром В7-16. За присасыванием клеток следили с помощью осциллографа С1-18. Для смещения МП использовали положительные импульсы длительностью 2,5 с. Возникающие в ответ на смещение МП токи измеряли электрокардиометром ЭКМ-01, который предназначен для визуального наблюдения, запоминания и цифрового измерения амплитуд и интервалов времени электрофизиологических сигналов.

Результаты и их обсуждение

Измерения показали, что при поддерживаемом потенциале -50 мВ деполяризация мембраны до нуля не приводила к появлению выходящего тока. Поэтому МП фиксировали на нулевом уровне и смещали его в сторону положительных значений. Ток не возникал и при смещении МП до $+5$ мВ (рис. 1). Смещение МП до $+10$ мВ вызвало появление в 7 из 9 клетках выходящего тока амплитудой от 0,05 до 0,1 нА. Дальнейшее смещение МП в область положительных значений сопровождалось увеличением тока (см. рис. 1, а, б), которое следует связывать с повышением потенциалозависимой калиевой проводимости и увеличением движущей силы диффузии ионов калия — разности между МП и калиевым равновесным потенциалом ($E_K = -88$ мВ). Расчеты показали, что потенциалозависимая калиевая проводимость мембраны клеток составляет лишь $0,6 \cdot 10^{-9}$ См при потенциале $+10$ мВ, а при потенциале $+80$ мВ она достигает $0,23 \cdot 10^{-7}$ См. Таким образом, порог активации тока находится в области $+10$ мВ, а повышение калиевой проводимости мембраны при смещении МП в область положительных значений свидетельствует об увеличении доли находящихся в проводящем состоянии калиевых каналов.

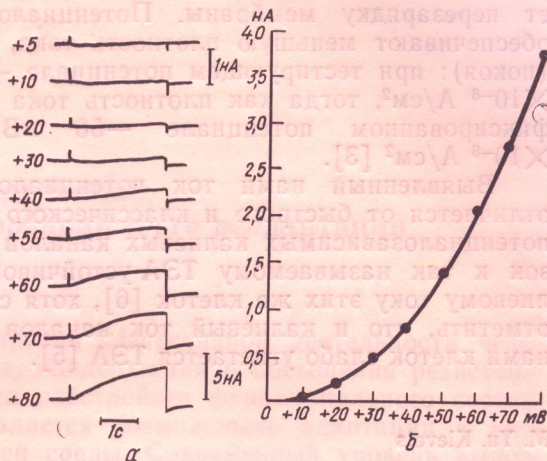
В результате анализа осциллограмм (см. рис. 1, а) установлено, что ток характеризуется медленным нарастанием по экспоненте. За-

метной инактивации не наблюдается. Измерения на 20 клетках показали, что при тестирующем потенциале $+50$ мВ ток нарастает до максимума в течение (1409 ± 75) мс, а постоянная времени активации составляет (652 ± 57) мс.

Направление тока в условиях лишь калиевого трансмембранного градиента уже указывает на его калиевую природу. Для более убедительного подтверждения природы тока мы изучали зависимость его амплитуды от калиевого градиента. В 9 опытах измеряли вначале ток при тестирующем потенциале $+40$ мВ и естественном калиевом градиенте: $[K^+]_в = 194,86$ и $[K^+]_н =$

Рис. 1. Калиевые выходящие токи на диализируемых секреторных клетках слюнной железы личинки хирономуса:

а — осциллограммы токов для указанных слева значений мембранного потенциала (поддерживаемый потенциал — 0; $[K^+]_в = 194,86$; $[K^+]_н = 5,36$ ммоль/л); б — вольт-амперная характеристика (средние значения максимумов) тока.



$= 5,8$ ммоль/л (рис. 2). Сила тока составила в среднем $(0,7 \pm 0,1)$ нА. Затем регистрировали ток при том же тестирующем потенциале в условиях внутренней перфузии клеток раствором, содержащим $97,43$ ммоль/л K^+ , и нашли, что его сила составляет $(0,37 \pm 0,07)$ нА. Таким образом, снижение на 50 % внутриклеточного содержания K^+

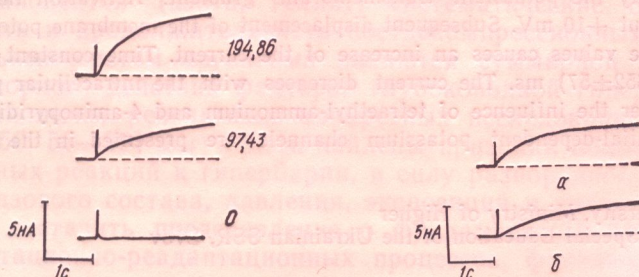


Рис. 2. Зависимость выходящего калиевого тока от трансмембранного градиента ионов калия. Справа указана внутриклеточная концентрация K^+ , ммоль/л. Поддерживаемый потенциал — 0, тестирующий — $+40$ мВ.

Рис. 3. Уменьшение выходящего калиевого тока при действии тетраэтиламмония (ТЭА) на наружную поверхность мембраны:

а — ток при тестирующем потенциале $+40$ мВ; б — уменьшение тока при действии ТЭА.

сопровождается уменьшением силы тока на 48 %. Ток не регистрировался (см. рис. 2), когда внутриклеточную перфузию осуществляли бескалийным раствором (трис- PO_4). Зависимость амплитуды тока от калиевого градиента убедительно свидетельствует о том, что ток переносится K^+ .

Ток характеризуется слабой чувствительностью к блокаторам потенциалозависимых калиевых каналов. Действие тетраэтиламмония (ТЭА, 10 ммоль/л) на наружную поверхность мембраны (рис. 3) вызывало уменьшение силы тока в среднем лишь на $(18,11 \pm 4,99)$, а на внутреннюю — на $(17,57 \pm 2,79)$ %. Внеклеточное действие 4-аминопиридина (10 ммоль/л) сопровождалось уменьшением силы тока не более чем на 18 %.

Приведенные результаты позволяют сделать заключение о функционировании в плазматической мембране секреторных клеток слюн-

ной железы личинки хирономуса высокопороговых потенциалозависимых калиевых каналов, которые активируются в области положительных значений МП. Наряду с калиевыми каналами утечки, которые не управляются МП и служат путями для диффузии K^+ из клеток в состоянии покоя, они обеспечивают, по-видимому, выход из клеток K^+ в ходе реполяризации мембраны после деполяризующего воздействия химическим стимулятором секреции при условии, что последний вызывает перезарядку мембраны. Потенциалозависимые калиевые каналы обеспечивают меньшую плотность тока, чем калиевые каналы утечки (покоя): при тестирующем потенциале $+80$ мВ она составляет $3,75 \times 10^{-6}$ А/см², тогда как плотность тока калиевых каналов утечки при фиксированном потенциале -50 мВ составляет $(19,29 \pm 3,43) \times 10^{-6}$ А/см² [3].

Выявленный нами ток потенциалозависимых калиевых каналов отличается от быстрого и классического задержанного калиевого тока потенциалозависимых калиевых каналов нейронов моллюсков, но близок к так называемому ТЭА-устойчивому неинактивирующемуся калиевому току этих же клеток [6], хотя слабо угнетается ТЭА. Следует отметить, что и калиевый ток каналов утечки мембраны изучаемых нами клеток слабо угнетается ТЭА [5].

М. Yu. Klevets

DELECTION OF THE POTENTIAL-DEPENDENT POTASSIUM CHENNELS OF THE PLASMA MEMBRANE IN THE SECRETORY CELLS

Outward current of the salivary gland cells membrane of chironomus larva activated by the displacement of the membrane potential to the region of positive values has been registered by the voltage-clamp method under conditions of intracellular dialysis in the presence of only the potassium transmembrane gradient. Activation threshold of the current is about $+10$ mV. Subsequent displacement of the membrane potential to the region of positive values causes an increase of the current. Time constant of the current activation is (652 ± 57) ms. The current decreases with the intracellular potassium concentration, under the influence of tetraethyl-ammonium and 4-aminopyridine. Thus, high threshold potential-dependent potassium channels are presented in the secretory cells membrane.

I. Franko University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Lvov

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клевещ М. Ю., Шуба М. Ф. Электричні характеристики плазматичної мембрани клітин слинної залози виноградної слимаки // Фізіол. журн.— 1974.— 20, № 6.— С. 540—542.
2. Клевещ М. Ю., Долиба Н. М. Влияние некоторых ферментов на потенциал покоя клеток слюнной железы личинки хирономуса // Актуальные проблемы современной физиологии.— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 8—9.
3. Клевещ М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Физиол. журн.— 1986.— 32, № 2.— С. 224—227.
4. Клевещ М. Ю. Влияние факторов, действующих на белки, на натриевый и калиевый токи утечки мембраны секреторных клеток // Там же.— 1989.— 35, № 2.— С. 3—6.
5. Клевещ М. Ю. Блокирующие влияния на трансмембранный калиевый ток в состоянии покоя секреторных клеток // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса: Вестн. Львов. ун-та. Сер. биол., вып. 19.— Львов: Виш. шк., Изд-во Львов. ун-та, 1989.— С. 31—35.
6. Костюк П. Г., Крышталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки.— М.: Наука, 1981.— 203 с.
7. Крышталь О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.— 7, № 3.— С. 327—329.

Львов. ун-т им. И. Франко

М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 31.10.89