

Характеристика натриевых токов через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов крыс

Одним из ключевых положений современных теорий работы кальциевых каналов является постулат о необходимости оккупации по крайней мере одного участка в канале ионом Ca^{2+} — при устранении иона кальция из центра связывания Ca^{2+} -канал теряет селективность к двухвалентным катионам [1, 17, 24]. Этот постулат возник на основании данных, продемонстрировавших возникновение токов, переносимых одновалентными катионами через кальциевый канал при уменьшении $[\text{Ca}^{2+}]_0$ ниже значений 0,1–1 мкмоль/л [4–6, 8, 16].

Резкое удлинение потенциала действия клеток сердечной мышцы при введении во внеклеточные растворы Ca^{2+} -хелатирующих агентов было показано в ряде экспериментов на многоклеточных препаратах миокарда [9, 12, 22, 23]. Это удлинение связывали с разнообразными причинами: например, с индукцией дополнительного натриевого тока, обладающего затянутой инактивацией, или Ca^{2+} -зависимыми изменениями калиевой проводимости. Эксперименты последних десяти лет позволили убедительно опровергнуть эти предположения и показать, что в основе ЭГТА-индуцированных изменений мембранной проводимости кардиомиоцитов (эксперименты проведены на клетках, изолированных из желудочка морских свинок и эмбрионов цыпленка) лежит именно утеря кальциевыми каналами селективности по отношению к двухвалентным катионам и, как следствие, генерация мощных входящих натриевых токов через модифицированные кальциевые каналы [11, 13, 19–21]. В то же время существует ряд данных, говорящих о различиях параметров кальциевого тока желудочковых миоцитов сердца у крысы по сравнению с другими животными [14]. Цель наших исследований — охарактеризовать натриевые токи через модифицированные кальциевые каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов крысы.

Методика

Методы выделения, культивирования и исследования ионных токов желудочковых миоцитов сердца новорожденных крыс описаны в ранее опубликованных статьях [1, 2]. Исходный внеклеточный раствор содержал (ммоль/л): NaCl — 120; KCl — 5,4; CaCl_2 — 5,0; MgCl_2 — 1,1; HEPES — 10 (рН 7,4). Бескальциевый наружный раствор имел следующий состав (ммоль/л): NaCl — 60; TEA — Cl — 85; HEPES — 10; ЭГТА — 5. При регистрации токов через кальциевые каналы во все внеклеточные растворы добавляли 10 мкмоль/л тетродотоксина (TTX). Внутриклеточный раствор содержал (ммоль/л): NaCl — 30; CsCl — 90; MgCl_2 — 4; Na_2ATP — 3; HEPES — 20; ЭГТА — 10 (рН 7,2).

В эксперименте использовали следующие препараты: TTX и BAУ К 8644 (фирма «Calbiochem», США), верапамил (фирма «Sigma», США), галлопамил (препарат Д-600 фирмы «Knoll AC», ФРГ), любезно предоставленный д-ром Г. Трубе (Hoffmann-La Roche, Швейцария).

Результаты и их обсуждение

Кальциевый ток в мембране культивируемых желудочковых кардиомиоцитов регистрировали, как описано в ранее опубликованной работе [2]. На рис. 1 представлено семейство кривых натриевых токов через Ca^{2+} -каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов после умень-

шения концентрации ионов кальция во внеклеточном растворе (ниже 50 нмоль/л). Предположение о том, что наблюдаемый входящий ионный ток действительно создается входом ионов натрия через потен-

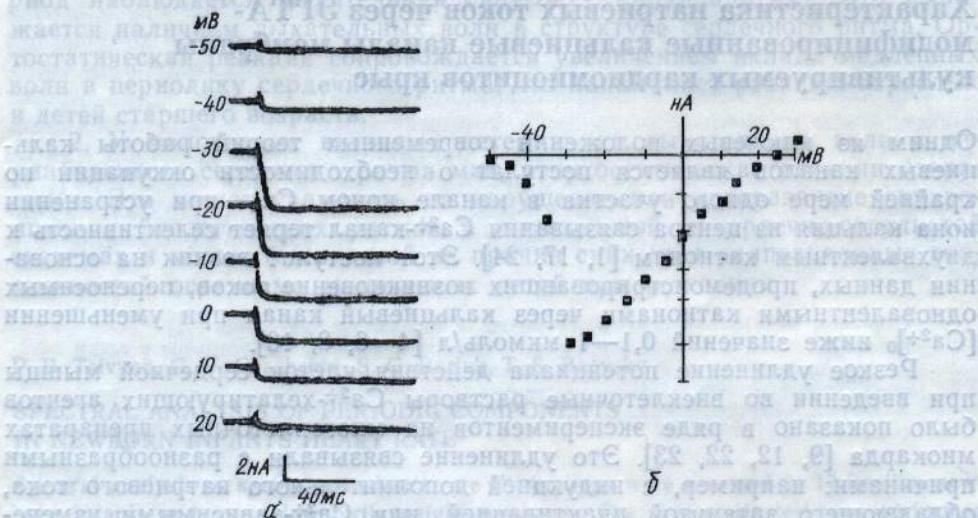


Рис. 1. Натриевые токи, проходящие через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов новорожденных крыс:

а — регистрация токов (рядом с кривыми токов даны значения тестирующих деполаризаций); б — вольт-амперная характеристика натриевого тока (поддерживаемый потенциал — 80 мВ).

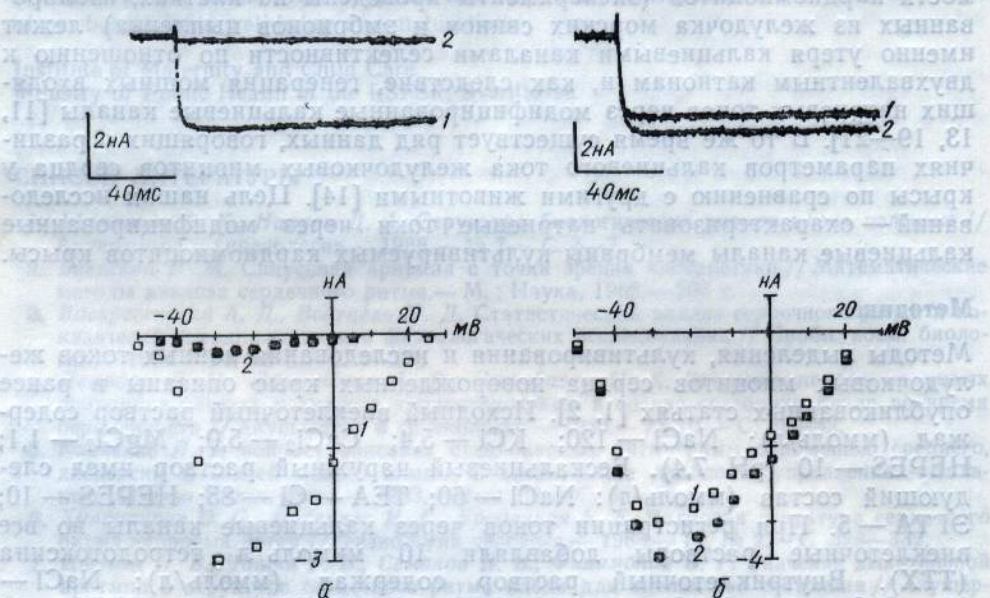


Рис. 2. Влияние модуляторов кальциевых каналов на натриевый ток, проходящий через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов новорожденных крыс (в нижней части рисунка даны соответствующие вольт-амперные характеристики):

а — подавление натриевого тока галлопамиллом (препарат D-600; 1 — исходный раствор; 2 — раствор, содержащий 1 мкмоль/л галлопамилла); б — увеличение натриевого тока под влиянием кальциевого агониста ВАУ К 8644 (1 — исходный раствор; 2 — раствор, содержащий 1 мкмоль/л ВАУ К 8644). Поддерживаемый потенциал — 80 мВ; приведены регистрации токов для тестирующей деполаризации — 30 мВ.

циалуправляемые кальциевые каналы мембраны одиночных кардиомиоцитов доказываются следующими результатами.

1. Внеклеточное приложение тетродотоксина (вплоть до 50 мкмоль/л) не влияет на параметры регистрируемых токов, т. е. можно полагать, что перенос ионов Na^+ через натриевые каналы не влияет на регистрируемые ионные токи.

2. Кальциевые антагонисты верапамил и галлопамил (1—5 мкмоль/л) подавляют регистрируемый входящий ионный ток так же, как и токи, переносимые ионами кальция (рис. 2, а).

3. Кальциевый агонист ВАУ К 8644 (1 мкмоль/л) вызывает увеличение амплитуды регистрируемого тока (рис. 2, б).

4. В течение внутриклеточной перфузии развивается падение амплитуды регистрируемого тока; динамика падения сходна с таковой при развитии «вымывания» кальциевого тока.

5. Замена ионов натрия во внеклеточном растворе на непроницающие катионы Трис⁺ приводит к полному исчезновению регистрируемого входящего тока.

6. Потенциал реверсии регистрируемого верапамил- и галлопамил-чувствительного тока составлял $+20 \div +30$ мВ, что близко к значению

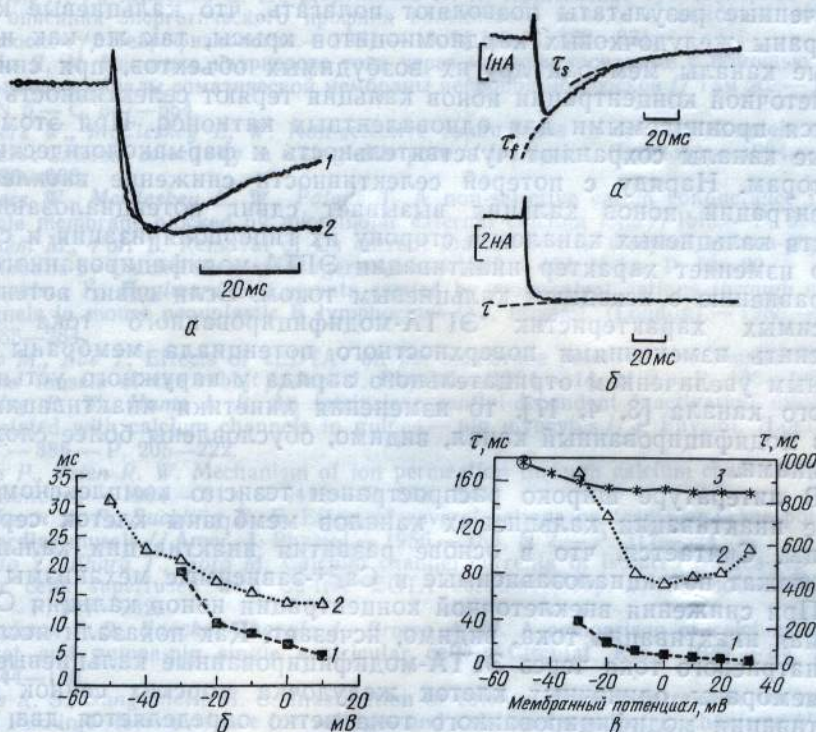


Рис. 3. Параметры активации кальциевого и натриевого токов, проходящих через кальциевые каналы мембраны культивируемых желудочковых миоцитов сердца новорожденных крыс:

а — наложенные регистрации кальциевого (1) и нормированного натриевого (2) токов (регистрации токов даны для максимумов вольт-амперных характеристик); б — зависимость времени (мс) достижения максимума кальциевого (1) и натриевого (2) токов от мембранного потенциала (мВ).

Рис. 4. Параметры инактивации кальциевого и натриевого токов, проходящих через кальциевые каналы мембраны культивируемых желудочковых миоцитов сердца новорожденных крыс:

а — регистрация кальциевого тока (тестирующий потенциал —10 мВ, поддерживаемый потенциал —80 мВ), инактивационный спад тока аппроксимируется суммой двух экспонент (пунктирные линии); б — регистрация натриевого тока, проходящего через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы (тестирующий потенциал —30 мВ, поддерживаемый потенциал —80 мВ), инактивационный спад тока аппроксимируется одной экспонентой (пунктирная линия); в — зависимость постоянных времени инактивации кальциевого (1, 2) и натриевого (3) токов от мембранного потенциала.

равновесного потенциала для ионов натрия в данных экспериментальных условиях (при $[Na^+]_0$, составляющей 60 ммоль/л, и $[Na^+]_i$ — 30 ммоль/л; E_{Na} — +29 мВ).

Время достижения максимума натриевого тока через кальциевые каналы несколько больше, чем тока ионов Са. Кроме этого активация натриевого тока сдвинута примерно на 20 мВ в сторону гиперполяризации по сравнению с активацией тока Са (рис. 3). Такой же сдвиг наблюдается и при сравнении вольт-амперных характеристик токов, переносимых ионами натрия и кальция.

Инактивационный спад кальциевого тока в мембране культивируемых кардиомиоцитов крыс, указано ранее [2], носит двухэкспоненциальный характер. Инактивационный спад натриевого тока через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы существенно отличается от такового для исходного кальциевого тока (рис. 4). Это отличие состоит в следующем: во-первых, инактивация натриевого тока развивается гораздо медленнее, чем инактивация кальциевого; во-вторых, инактивационный спад тока, переносимого ионами натрия, описывается одной экспонентой; в-третьих, постоянная времени инактивации натриевого тока через ЭГТА-модифицированные натриевые каналы практически не зависит от мембранного потенциала.

Обсуждение

Полученные результаты позволяют полагать, что кальциевые каналы мембраны желудочковых кардиомиоцитов крысы, так же как и кальциевые каналы мембран других возбудимых объектов, при снижении внеклеточной концентрации ионов кальция теряют селективность и становятся проницаемыми для одновалентных катионов. При этом кальциевые каналы сохраняют чувствительность к фармакологическим модуляторам. Наряду с потерей селективности снижение внеклеточной концентрации ионов кальция вызывает сдвиг потенциалозависимых свойств кальциевых каналов в сторону их гиперполяризации и существенно изменяет характер инактивации ЭГТА-модифицированного тока по сравнению с исходным кальциевым током. Если сдвиг потенциалозависимых характеристик ЭГТА-модифицированного тока можно объяснить изменениями поверхностного потенциала мембраны и локальным увеличением отрицательного заряда у наружного устья кальциевого канала [3, 4, 17], то изменения кинетики инактивации тока через модифицированный канал, видимо, обусловлены более сложными причинами.

В литературе широко распространен тезис о комплексном механизме инактивации кальциевых каналов мембраны клеток сердечной мышцы. Считается, что в основе развития инактивации кальциевого тока лежат потенциалозависимые и Ca^{2+} -зависимые механизмы [7, 15, 18]. При снижении внеклеточной концентрации ионов кальция Ca^{2+} -зависимая инактивация тока, видимо, исчезает. Как показали исследования натриевого тока через ЭГТА-модифицированные кальциевые каналы мембраны одиночных клеток желудочка морских свинок [10], в инактивации модифицированного тока четко определяется два компонента: инактивирующийся (отнесенный к потенциалозависимой инактивации кальциевых каналов) и стационарный. В наших экспериментах, проведенных на кардиомиоцитах крысы, обнаружен только один, очень медленно инактивирующийся компонент ЭГТА-индуцированного натриевого тока. Возможно, в основе этого различия лежат разные механизмы контроля инактивации Ca^{2+} -каналов в клетках сердца разных животных. Кроме этого, нельзя исключить и того, что снижение внеклеточной концентрации ионов кальция затрагивает не только функционирование селективного фильтра кальциевого канала, но и влияет на работу воротных механизмов Ca^{2+} -каналов мембраны сердечной клетки.

A. N. Verkh ratsky, N. F. Pronchuk, A. N. Savchenko

CHARACTERISTIC OF SODIUM CURRENTS THROUGH EGTA-MODIFIED CALCIUM CHANNELS IN THE MEMBRANE OF SINGLE CULTURED NEONATAL RAT VENTRICULAR MYOCYTES

In isolated, cultured neonatal rat ventricular myocytes sodium currents through calcium channels induced by lowering of extracellular calcium concentration 100 nmol/l have been investigated by whole-cell patch clamp technique. Such Na^{+} -carried currents are modulated by classic Ca^{2+} agonists and antagonists. The potential-dependent characteristics of Na^{+} current are shifted at 20 mV in hyperpolarizing direction as compared to initial Ca^{2+} -car-

ried current. The inactivation decay of Na^+ current through Ca^{2+} channels has the mono-exponential behaviour. The possible action of extracellular Ca^{2+} lowering on Ca^{2+} channel selective filter and gating mechanisms is suggested.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белан П. В., Верхратский А. Н., Прончук Н. Ф., Тепикин А. В. Измерение свободного Ca^{2+} в цитоплазме одиночных культивируемых кардиомиоцитов крысы с помощью методов микрофлуорометрии // Физиол. журн.— 1989.— 35, N 6.— С. 39—45.
2. Верхратский А. Н., Прончук Н. Ф., Савченко А. Н. Отсутствие низкопороговых кальциевых каналов в мембране культивируемых клеток желудочка сердца новорожденных крыс // Там же.— 1991.
3. Костюк П. Г., Миронов С. Л., Дорошенко П. А. Применение трехбарьерной модели для описания энергетического профиля кальциевого канала в мембране нейронов моллюсков // Нейрофизиология.— 1981.— 13, N 3.— С. 322—331.
4. Шуба Я. М. Кинетика натриевого тока через модифицированные с помощью ЭДТА кальциевые каналы соматической мембраны нейронов моллюсков // Там же.— 1983.— 15, N 5.— С. 547—554.
5. Almers W., McCleskey E. W. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: Calcium selectivity in a singlefile pore // J. Physiol. (London).— 1984.— 353.— P. 585—608.
6. Almers W., McCleskey E. W., Palade T. A non-selective cation conductance in frog muscle membrane blocked by micromolar external calcium ions // Ibid.— P. 565—583.
7. Bechem M., Pott L. Removal of Ca current inactivation in dialysed guinea-pig atrial cardioballs by Ca chelators // Pflugers Arch.— 1985.— 404, N 1.— P. 10—20.
8. Fukushima Y., Hagiwara S. Currents carried by monovalent cations through calcium channels in mouse neoplastic B lymphocytes // J. Physiol. (London).— 1985.— 358.— P. 255—284.
9. Goto M., Abe Y. Effects of «EDTA» on the membrane potential and tension of ventricular muscle of the rabbit // Jap. J. Physiol.— 1964.— 14, N 2.— P. 135—146.
10. Hadley P. W., Hume J. R. An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea-pig myocytes // J. Physiol. (London).— 1987.— 386.— P. 205—222.
11. Hess P., Tsien R. W. Mechanism of ion permeation through calcium channels // Nature (London).— 1984.— 311, N 5413.— P. 538—544.
12. Hoffman B. F., Suckling E. E. Effect of several cations on transmembrane potentials in cardiac muscle // Amer. J. Physiol.— 1956.— 186, N 2.— P. 317—324.
13. Imoto Y., Ehara T., Goto M. Calcium channel currents in isolated guinea-pig ventricular cells superfused with Ca-free EGTA solution // Jap. J. Physiol.— 1985.— 35, N 6.— P. 917—932.
14. Josephson I. R., Sanchez-Chapula J., Brown A. M. A comparison of calcium currents in rat and guinea-pig single ventricular cells // Circulat. Res.— 1984.— 54, N 2.— P. 144—156.
15. Kass R. S., Sanguinetti M. C. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber: evidence for voltage- and calcium-dependent mechanisms // J. Gen. Physiol.— 1984.— 84, N 6.— P. 705—726.
16. Kostyuk P. G., Krishtal O. A. Effects of calcium and calcium-chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusc neurones // J. Physiol. (London).— 1977.— 270.— P. 569—580.
17. Kostyuk P. G., Mironov S. L., Shuba Ya M. Two ion-selecting filters in the calcium channel of the somatic membrane of mollusc neurones // J. Membrane Biol.— 1983.— 76, N 1.— P. 83—93.
18. Lee K. S., Marban E., Tsien R. W. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium // J. Physiol. (London).— 1985.— 364.— P. 395—411.
19. Levi R., DeFelice L. J. Sodium conducting channels in cardiac membranes in low calcium // Biophys. J.— 1986.— 50, N 1.— P. 5—9.
20. Matsuda H. Sodium conductance in calcium channels of guinea-pig ventricular cells induced by removal of external calcium ions // Pflugers Arch.— 1986.— 407, N 4.— P. 465—475.
21. Mazzanti M., DeFelice L. J. Regulation of a Na-conducting channel in zero external Ca during the cardiac action potential // Biophys. J.— 1987.— 51, N 1.— P. 109—114.
22. Miller D. J., Morchen A. On the effect of divalent cations and ethylene glycol-bis(ami-noethylester)N,N,N,N-tetraacetate on action potential duration in frog heart // J. Gen. Physiol.— 1978.— 71, N 1.— P. 47—67.
23. Rougier O., Vassort G., Garnier D. et al. Existence and role of a slow inward current during the frog action potential // Pflugers Arch.— 1969.— 308, N 1.— P. 91—110.
24. Tsien R. W., Hess P., McCleskey E. W., Rosenberg R. L. Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation and block // Ann. Rev. Biophys. Chem.— 1987.— 16.— P. 265—290.

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

Материал поступил
в редакцию 17.05.90