

7. Golding M. R., Mendoza M., Aiello R. Effect of vagotomy and pyloroplasty on intestinal absorption // Amer. J. Surg.—1965.—109.—P. 21—30.
8. Griffith C. A., Hazkins H. N. Partial gastric vagotomy. An experimental study // Gastroenterology.—1957.—32.—P. 96—107.
9. Holle F., Hart W. Neue Wege der chirurgie des Gastroduodenalulcus // Med. Klin.—1967.—63.—P. 441—450.
10. Miolan J. P. Commande extrinsèque de la motricité gastrique // Gastroenterol. and Clin. Biol.—1985.—9.—P. 590—601.
11. Roman C., Gonella J. Extrinsic control of digestive tract motility // Physiology of Gastrointestinal Tract. Sec.—New York: Raven press, 1987.—P. 507—553.
12. Weisbrodt N. W. Motility of the small intestine // Physiology of Gastrointestinal Tract.—New York: Raven press, 1987.—P. 631—653.

Ин-т физиологии Киев. ун-та им. Т. Г. Шевченко
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 11.05.90

УДК 612.014.42:612.31

М. Ю. Клевев

Идентификация и свойства хлорных потенциалозависимых каналов мембраны секреторных клеток

В нашей предыдущей работе [1] сообщалось, что в плазматической мембране клеток слюнной железы личинки хирономуса обнаружен выходящий ток потенциалозависимых калиевых каналов. Ток полностью исчезал при устранении калиевого градиента между внутриклеточным и внеклеточным содержимым в условиях отсутствия натриевого и хлорного градиентов. При сохранении хлорного градиента устранение калиевого градиента сопровождалось лишь уменьшением выходящего тока, что может быть связано с участием анионов хлора в перенесении выходящего тока. Цель этой работы — идентификация и изучение свойств хлорных потенциалозависимых каналов мембраны клеток слюнной железы личинки хирономуса.

Методика

Опыты проведены на клетках, которые выделяли из слюнных желез личинки хирономуса миниатюрным режущим инструментом. Препарирование желез и изолирование клеток осуществляли в растворе, состав которого описан ранее [2]. Хлорный ток регистрировали при наличии лишь хлорного ионного градиента. Для этого внутриклеточную перфузию осуществляли раствором следующего состава (ммоль/л): трис- PO_4 — 106,14; трис-Cl — 40; глюкоза — 5,55; pH 7,0. Во внеклеточном растворе NaCl заменяли эквивалентным количеством трис-Cl, pH поддерживали на уровне 7,2. Регистрацию хлорного тока проводили методом фиксации потенциала в условиях внутриклеточной перфузии [3]. Мембранный потенциал (МП) фиксировали на нулевом уровне и контролировали с помощью универсального вольтметра В7-16. Для смещения МП использовали положительные импульсы напряжения длительностью 1,5 с. Возникающие в ответ на смещения МП токи измеряли с помощью электрокардиометра ЭКМ-01.

Результаты и их обсуждение

Измерения показали, что при поддерживаемом потенциале —50 мВ деполяризация мембраны даже до нуля не приводила к появлению выходящего тока. Поэтому, как и при идентификации калиевого выхо-

© М. Ю. КЛЕВЕВ, 1991

дящего тока [1], МП фиксировали на нулевом уровне и смещали его в сторону положительных значений. Ток не возникал и при смещении МП до +10 мВ (рис. 1). Смещение МП до +20 мВ вызывало появление тока в нескольких клетках. Дальнейшее смещение МП в область положительных значений сопровождалось увеличением тока (см. рис. 1, а, б). Такое увеличение тока необходимо связывать с повышением потенциалозависимой хлорной проводимости и увеличением электродвижущей силы для диффузии ионов хлора — разности между МП и

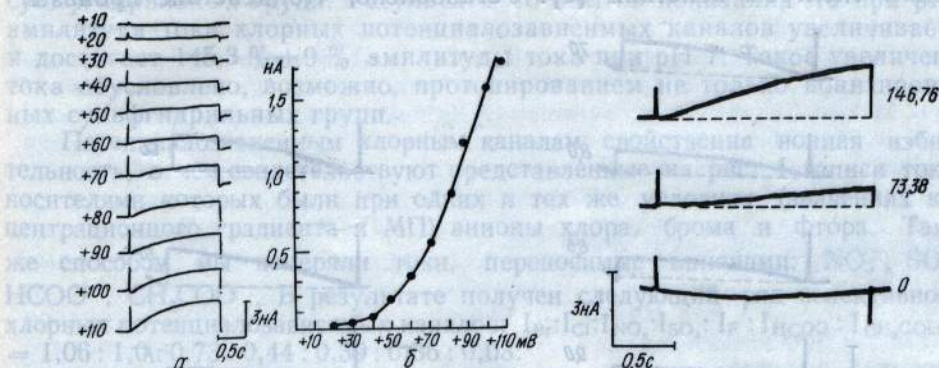


Рис. 1. Осциллограммы (а) хлорных выходящих токов в диализируемых секреторных клетках слюнной железы личинки хирономуса для указанных слева значений мембранного потенциала (поддерживаемый потенциал — 0 мВ; $[Cl^-]_в = 40$, $[Cl^-]_н = 146,76$ ммоль/л) и вольт-амперная характеристика (средние значения максимумов) тока (б).

Рис. 2. Зависимость выходящего хлорного тока от трансмембранного градиента ионов хлора. Справа указана внеклеточная концентрация Cl^- , ммоль/л. Поддерживаемый и тестирующий потенциалы — 0 и +80 мВ соответственно.

хлорным равновесным потенциалом ($E_{Cl} = -33$ мВ). Расчеты показали, что потенциалозависимая хлорная проводимость мембраны клеток составляет лишь $0,9 \cdot 10^{-10}$ См при потенциале +20 мВ, а при потенциале +110 мВ она достигает $0,12 \cdot 10^{-7}$ См. Таким образом, порог активации тока находится в области +20 мВ, а повышение хлорной проводимости мембраны при смещении МП в область положительных значений свидетельствует об увеличении доли находящихся в проводящем состоянии хлорных каналов.

Осциллограммы показывают, что ток характеризуется медленным нарастанием амплитуды и отсутствием инактивации. Измерения на 20 клетках показали, что при тестирующем потенциале +80 мВ ток нарастает до максимума в течение $1205 \text{ мс} \pm 46,9 \text{ мс}$, а постоянная времени активации составляет $573 \text{ мс} \pm 34,4 \text{ мс}$.

Таким образом, ток потенциалозависимых хлорных каналов близок по временным характеристикам к току потенциалозависимых калиевых каналов этих же клеток [1]. Однако его амплитуда примерно в 4,4 раза ниже, а порог активации несколько выше.

Для подтверждения хлорной природы тока мы изучали зависимость его амплитуды от значения хлорного градиента. В девяти опытах измеряли вначале ток при тестирующем потенциале +80 мВ и естественном хлорном градиенте: $[Cl^-]_в = 40$ и $[Cl^-]_н = 146,76$ ммоль/л (рис. 2). Амплитуда тока составила в среднем $0,58 \text{ нА} \pm 0,08 \text{ нА}$. Затем регистрировали ток при том же тестирующем потенциале в условиях наружной перфузии клеток раствором, содержащим 73,38 ммоль/л Cl^- и нашли, что он составляет $0,24 \text{ нА} \pm 0,04 \text{ нА}$. Таким образом, снижение на 50 % по отношению к исходному содержанию внеклеточного Cl^- сопровождается уменьшением тока до $40,5 \% \pm 3 \%$. Ток практически не было, когда внеклеточную перфузию осуществляли бесхлорным раствором ($трис-SO_4$). Зависимость амплитуды тока от значения хлорного градиента убедительно подтверждает его хлорную природу.

Мы изучали также изменения тока хлорных потенциалозависимых каналов под влиянием танниновой кислоты, которая резко изменяет анионную проницаемость мембраны эритроцитов [7]. Оказалось, что действие танниновой кислоты (1 мг/мл) на наружную поверхность мембраны вызывает уменьшение тока в среднем на $19,43 \pm 3,05 \%$. С целью выявления белковой природы хлорных потенциалозависимых каналов мы изучали изменения тока этих каналов под влиянием протеолитического фермента проназы, который характеризуется весьма широким спектром действия [5]. Установлено, что действие проназы

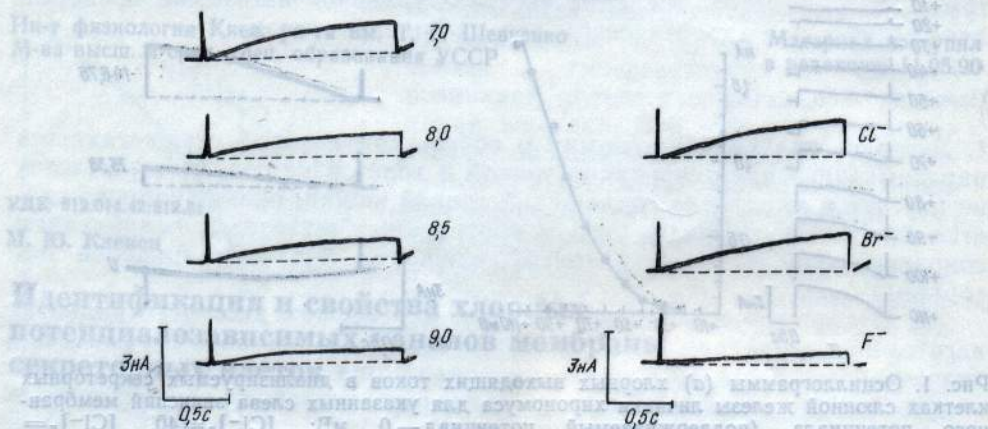


Рис. 3. Уменьшение выходящего хлорного тока в условиях щелочной среды. Справа указано значение pH наружного раствора. Поддерживаемый и тестирующий потенциалы — 0 и +80 мВ соответственно.

Рис. 4. Сравнение амплитуды выходящих токов, переносимых через хлорные потенциалозависимые каналы анионами галогенов. Справа указан анион — носитель тока. Поддерживаемый и тестирующий потенциалы — 0 и +80 мВ соответственно.

(0,5 мг/мл) на наружную и внутреннюю поверхности мембраны не сопровождается выраженными изменениями тока хлорных потенциалозависимых каналов. Это свидетельствует о том, что белковые компоненты таких каналов в нативном состоянии не подвергаются протеолиту.

Трудности получения доказательств белковой природы хлорных потенциалозависимых каналов, связанные с применением протеолиза, побудили нас к изучению изменений тока под влиянием блокаторов сульфгидрильных групп. Оказалось, что катионы Hg (1 ммоль/л) вызывают незначительное (на $10,7 \pm 4 \%$) увеличение амплитуды хлорного тока. Это указывает на то, что в состав белковых компонентов хлорных потенциалозависимых каналов входят остатки цистеина, и что сульфгидрильные группы определяют проводимость каналов.

Ток потенциалозависимых хлорных каналов зависит от pH наружного раствора: смещение pH в щелочную сторону вызывает уменьшение тока (рис. 3). Графически определенное значение pH, соответствующее 50 %-ному уменьшению тока, составляет 8,75. Несомненно, что уменьшение тока хлорных потенциалозависимых каналов необходимо связывать с депротонированием каких-то ионогенных групп. Такое уменьшение тока можно было бы связать с депротонированием основных групп радикалов лизина или аргинина, однако pK_R для них составляет 10,53 и 12,48 соответственно [4]. Это значит, что они отдают свои протоны при очень высоких значениях pH. При таких же pH должен был бы уменьшаться и хлорный ток за счет ликвидации в каналах фиксированных положительных зарядов, если бы только они определяли проводимость. Ближе всего к значению pH, при котором хлорный ток уменьшается на 50 %, находится кажущаяся константа диссоциации ($pK_R=8,33$) сульфгидрильной группы цистеина [4].

Таким образом, результаты и этой серии опытов указывают на наличие в хлорных потенциалозависимых каналах сульфгидрильных

групп. Поскольку сульфгидрильные группы являются слабокислотными и в нейтральных условиях ионизированы лишь на 8 % [4], их вклад в определение проводимости хлорных каналов в нормальных условиях незначительный. При повышении pH депротонирование сульфгидрильных групп ведет к появлению в каналах фиксированных отрицательных зарядов, что мешает проникновению через них анионов и снижает проводимость. В таком случае закисление среды должно сопровождаться повышением проводимости в связи с протонированием ионизированных сульфгидрильных групп. Результаты 10 опытов показали, что при pH 5 амплитуда тока хлорных потенциалозависимых каналов увеличивается и достигает $145,3 \pm 9\%$ амплитуды тока при pH 7. Такое увеличение тока обусловлено, возможно, протонированием не только ионизированных сульфгидрильных групп.

Потенциалозависимым хлорным каналам свойственна ионная избирательность, о чем свидетельствуют представленные на рис. 4 записи токов, носителями которых были при одних и тех же условиях (значениях концентрационного градиента и МП) анионы хлора, брома и фтора. Таким же способом мы измеряли токи, переносимые анионами: NO_3^- , SO_4^{2-} , HCOO^- , CH_3COO^- . В результате получен следующий ряд селективности хлорных потенциалозависимых каналов: $\text{I}_{\text{Br}}:\text{I}_{\text{Cl}}:\text{I}_{\text{NO}_3}:\text{I}_{\text{SO}_4}:\text{I}_{\text{F}}:\text{I}_{\text{HCOO}}:\text{I}_{\text{CH}_3\text{COO}} = 1,06:1,0:0,73:0,44:0,39:0,36:0,03$.

Интересно, что самые мелкие анионы фтора хуже проникают через хлорные потенциалозависимые каналы, чем анионы хлора и брома. Этот факт свидетельствует о том, что ионная избирательность хлорных потенциалозависимых каналов определяется и электростатическим взаимодействием проникающих анионов с положительно заряженными группами каналов. Низкая проницаемость хлорных потенциалозависимых каналов для многоатомных неорганических и органических анионов обусловлена их размерами и пространственным расположением их атомов. Ток хлорных потенциалозависимых каналов характеризуется невысокой зависимостью от температуры: среднее значение Q_{10} в интервале от $+20$ до $+10^\circ\text{C}$ для амплитуды тока составляет $1,36 \pm 0,09$. Рассчитанная на основании Q_{10} энергия активации составляет $21 \text{ кДж} \times \text{X моль}^{-1}$. Эти факты свидетельствуют о низком энергетическом барьере в хлорных потенциалозависимых каналах.

Приведенные результаты позволяют сделать заключение о функционировании в плазматической мембране секреторных клеток слюнной железы личинки хирономуса селективных потенциалозависимых хлорных каналов, которые активируются в области положительных значений МП. Вместе с калиевыми потенциалозависимыми каналами [1] они играют роль, по-видимому, в реполяризации мембраны после деполяризующего воздействия химическим стимулятором секреции при условии, что последний вызывает перезарядку мембраны. Потенциалозависимые хлорные каналы обеспечивают меньшую плотность тока, чем калиевые: при тестирующем потенциале $+80 \text{ мВ}$ она составляет $0,85 \cdot 10^{-6} \text{ А/см}^2$, тогда как плотность тока калиевых потенциалозависимых каналов при том же потенциале составляет $3,75 \cdot 10^{-6} \text{ А/см}^2$ [1]. Потенциалозависимые хлорные каналы обеспечивают и меньшую плотность тока, чем хлорные каналы утечки этих же клеток [2].

Следует полагать, что подобные каналы могут функционировать в плазматической мембране секреторных клеток и других животных. Недавно получены не прямые доказательства наличия неспецифических анионных каналов в мембране ацинарных клеток подчелюстной железы кролика [6].

IDENTIFICATION AND PROPERTIES OF CHLORIDE CHANNELS 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 the chloride transmembrane gradient. Activation threshold of the current is about +20 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 (573 ± 34.4) ms. The current decreases with the reduction of extracellular chloride concentration, under the influence of tannin acid and temperature lowering, under conditions of alkaline medium. The current increases due to Hg^{2+} ions and lowering of the outward solution pH. Thus, the membrane of secretory cells contain high-threshold potential-dependent chloride channels which are characterized by the following selectivity series: $Br^- > Cl^- > NO_3^- > SO_4^{2-} > F^- > HCOO^- > CH_3COO^-$.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клевев М. Ю. Выявление потенциалозависимых калиевых каналов плазматической мембраны секреторных клеток // Физиол. журн.— 1990.— 36, № 4.— С. 102—104.
2. Клевев М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Там же.— 1986.— 32, № 2.— С. 224—227.
3. Крысталь О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.— 7, № 3.— С. 327—329.
4. Ленинджер Б. Биохимия.— М.: Мир, 1974.— 956 с.
5. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.— М.: Наука, 1971.— 413 с.
6. Brown P. D., Elliot A. C., Lau K. R. Indirect evidence for the presence of nonspecific anion channels in rabbit mandibular salivary gland acinar cells // J. Physiol.— 1989.— 414.— P. 415—431.
7. Edelberg R. The action of tanning acid on the erythrocyte membrane // J. Cell. and Comp. Physiol.— 1952.— 40.— P. 529—548.

Львов. ун-т им. И. Франко
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 11.08.90

УДК 616—056.43

В. Е. Мелешко, М. Ф. Тимочко, А. Г. Мысаковец, В. И. Вовк

Неспецифические показатели аллергии при оральной сенсibilизации белком куриного яйца

В силу неблагоприятной экологической обстановки участились случаи пищевой аллергии (ПА), что может быть обусловлено нарушением иммунных барьеров, а также гепатобилиарной системы [10]. Иммунологический статус организма играет важную роль в патогенезе ПА. Поскольку этот вопрос изучен недостаточно [2], мы поставили перед собой задачу изучить некоторые показатели иммунологической реактивности при экспериментальной ПА и дать оценку их значимости для разработки диагностических тестов и способов коррекции ПА.

© В. Е. МЕЛЕШКО, М. Ф. ТИМОЧКО, А. Г. МЫСАКОВЕЦ, В. И. ВОВК, 1991