

УДК 612.014.42:612.31

М.Ю.Клевець, В.В.Манько

Модифікація потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин у безкальцієвому середовищі

Обнаружен эффект модификации потенциалзависимых кальциевых каналов клеток нижней доли слюнной железы личинки хирономуса в бескальциевой среде с добавлением хелатирующих веществ (ЭДТА, ЭГТА). Показана зависимость входящего тока от натриевого градиента. Амплитуда входящего натриевого тока уменьшается под действием верапамила (10^{-4} моль/л), а также при увеличении внеклеточной концентрации Ca^{2+} . Наряду с фармакологической чувствительностью сохраняется и метаболическая зависимость модифицированных кальциевых каналов t_h натриевого тока через модифицированные кальциевые каналы незначительно увеличивается по сравнению с t_h кальциевого тока. Максимум вольт-амперной зависимости натриевого тока через модифицированные кальциевые каналы по сравнению с максимумом кальциевого тока через интактные каналы сдвинут в сторону гиперполяризации примерно на 10–15 мВ.

Вступ

У мембрані секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* нами [3] виявлено потенціалозалежні кальцієві канали, які відрізняються від кальцієвих каналів мембрани збудливих клітин. Залишається нез'ясованим питання про наявність у цих каналах центрів зв'язування іонів кальцію, які мають важливе значення в провідності кальцієвих каналів і збереженні їх селективності. При вилученні Ca^{2+} з центрів зв'язування за допомогою хелаторів потенціалозалежні кальцієві канали збудливих тканин модифікуються і стають проникними для моновалентних катіонів [1, 2, 5, 7].

Метою нашої роботи було дослідження модифікації виявлених нами кальцієвих каналів у безкальцієвому середовищі з додаванням хелатуючих речовин.

Методика

Досліди проведено на ізольованих клітинах нижньої долі слинної залози личинки *Chironomus plumosus*. Внутрішньоклітинну перфузію здійснювали розчином який складався з (ммоль/л): *mpic*-Cl — 146,14; аденозинтрифосфорна кислота (АТФ) — 1,0; MgCl_2 — 2,0; ЕГТА — 0,1; глюкоза — 5,55; рН 7,0. При реєстрації кальцієвого струму використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl — 136,9; CaCl_2 — 1,76; *mpic*-Cl — 0,16; глюкоза — 5,55; рН 7,2. Для отримання натрієвого струму через модифіковані кальцієві канали зі складу зовнішньоклітинного розчину вилучали Ca^{2+} , додавали необхідну кількість хелатора (5 або 10 ммоль/л ЕДТА). В окремих серіях дослідів NaCl у зовнішньоклітинному розчині замінювали на еквімолярну кількість холін-Cl або *mpic*-Cl.

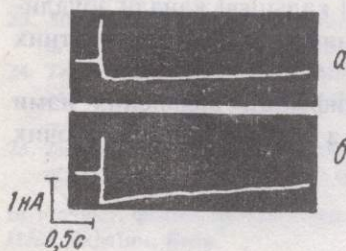
© М.Ю.КЛЕВЕЦЬ, В.В.МАНЬКО, 1995

Методика реєстрації струму через потенціалозалежні кальцієві канали секреторних клітин слинної залози описана в нашій попередній праці [3].

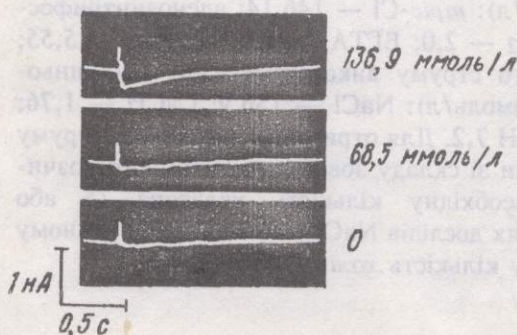
Результати та їх обговорення

При дослідженні залежності амплітуди потенціалозалежного кальцієвого струму клітин нижньої долі залози від зовнішньої концентрації іонів Ca^{2+} проведено однофакторний дисперсійний аналіз [4]. Виявилось, що амплітуда вхідного кальцієвого струму статистично достовірно ($P < 0,05$ при $n = 6$) залежить від $[\text{Ca}^{2+}]_3$ у межах від 0,1 до 1,76 ммоль/л. При більших концентраціях Ca^{2+} (до 5 ммоль/л) спостерігається істотне зростання амплітуди струму. Якщо до зовнішньоклітинного розчину не додавали кальцій і не використовували хелатори для його зв'язування, то тільки у 3 клітинах із 7 був відсутній вхідний струм. Збереження останнього у решти клітин можна пояснити, або за рахунок неповного видалення Ca^{2+} із зовнішньоклітинного розчину, або внаслідок появи при малих значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_3$ струму іншої природи.

Для перевірки останнього припущення до зовнішньоклітинного натрієвого розчину, що не містив двовалентних катіонів, додавали 5 ммоль/л ЕДТА. При наявності лише натрієвого градієнту реєструвався вхідний струм (мал. 1), який за кінетикою близький до кальцієвого, а за амплітудою статистично достовірно ($P < 0,05$ при $n = 6$) перевищував його у $(2,27 \pm 0,36)$ разів. Амплітуда цього струму залежала від натрієвого градієнта (мал. 2): при заміні у зовнішньоклітинному розчині половини Na^+ на непроникаючі катіони трис^+ амплітуда струму зменшувалася від $0,61 \pm 0,07$ до $0,29 \pm 0,04$ нА ($n = 13$), тобто на $57,41\% \pm 6,12\%$. В абсолютній більшості випадків струм був відсутній, коли позаклітинний розчин не містив Na^+ . Таким чином, вхідний струм при видаленні двовалентних катіонів з додаванням хелатуючих речовин переноситься через мембрану натрієм.



Мал. 1. Кальцієвий струм (а) через інтактні та натрієвий струм (б) через ЕДТА-модифіковані кальцієві канали мембрани секреторних клітин нижньої долі слинної залози. Тут і на мал. 2 фіксований і тестуючий потенціали — -65 і -25 мВ відповідно, концентрація ЕДТА—5 ммоль/л.



Мал. 2. Залежність вхідного натрієвого струму через ЕДТА-модифіковані кальцієві канали мембрани секреторних клітин нижньої долі слинної залози личинки хірономуса від трансмембранного градієнта Na^+ . Праворуч вказано зовнішньоклітинну концентрацію Na^+ .

кальцієві канали
едній праці [3].

ного кальцієвого
нтрації іонів Ca
[4]. Виявилось,
стовірно ($P < 0,05$
5 ммоль/л. При
ся істотне зро-
озчину не дода-
вання, то тільки
аннього у решти
алення Ca^{2+} із
алих значеннях

шньоклітинного
ів, додавали 5
у рееструвався
альцієвого, а за
вищував його у
від натрієвого
і половини Na^+
лася від $0,61 \pm$
12 %. В абсо-
тинний розчин
і двовалентних
через мембрану

струм (а) через
рум (б) через ЕД-
івієві канали мемб-
ин нижньої долі
і на мал. 2
ий потенціали —
концентрація ЕД-

ідного натрієвого
ТА-модифіковані
рани секреторних
инної залози ли-
рансмембранного
воруч вказано
центрацію Na^+ .

З метою ідентифікації каналів, через які переноситься вхідний натрієвий струм при відсутності у зовнішньоклітинному розчині двовалентних катіонів, нами проведено дослідження зміни амплітуди струму під дією специфічного блокатора потенціалозалежних кальцієвих каналів — верапамілу. Кальцієвий струм через мембрану секреторних клітин нижньої долі слинної залози статистично достовірно ($P < 0,05$ при $n = 9$) зменшувався під впливом верапамілу (10^{-4} моль/л) на $53,80 \% \pm 6,14 \%$. Амплітуда натрієвого струму при такій же концентрації верапамілу зменшувалася на $41,39 \% \pm 0,35 \%$ ($P < 0,05$ при $n = 11$). Практично однакове зменшення амплітуди натрієвого та кальцієвого струму при дії верапамілу свідчить про те, що натрієвий струм у безкальцієвому середовищі переноситься через ЕДТА-модифіковані кальцієві канали.

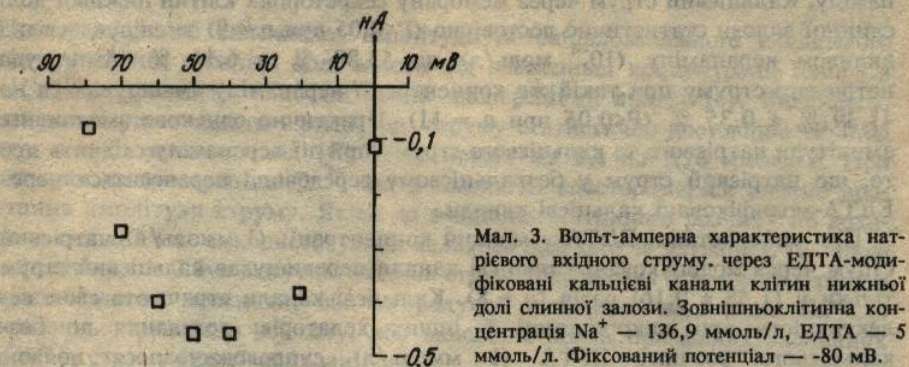
При використанні ЕДТА у меншій концентрації (1 ммоль/л) натрієвий струм через модифіковані кальцієві канали перевищував кальцієвий струм тільки у $(1,58 \pm 0,16)$ разів ($n = 8$). Кальцієві канали втрачають свою селективність при використанні й інших хелаторів: додавання до безкальцієвого розчину ЕГТА (1 ммоль/л) супроводжувалося появою натрієвого струму, амплітуда якого у $(1,44 \pm 0,11)$ разів більша ($n = 9$), ніж амплітуда кальцієвого. Залежність ефекту модифікації від концентрації хелатора, з одного боку, і наявності модифікації при використанні різних хелаторів кальцію, з другого, свідчать, що модифікація зумовлена виключно зменшенням концентрації кальцію в середовищі.

Прямим підтвердженням цього є зменшення амплітуди натрієвого струму через модифіковані кальцієві канали при збільшенні концентрації іонізованого кальцію за допомогою Ca -ЕГТА-буферу. При підвищенні $[Ca^{2+}]_z$ від 10^{-9} моль/л до $1,2 \cdot 10^{-8}$ моль/л амплітуда натрієвого струму зменшувалася на $11,34 \% \pm 1,9 \%$ ($n = 6$), а при підвищенні до $1,05 \cdot 10^{-6}$ моль/л — на $20,59 \% \pm 3,35 \%$ ($n = 6$). Оскільки концентрація хелатора як у контрольному, так і у дослідних розчинах однакова, то зміну амплітуди натрієвого струму слід пов'язувати тільки з підвищенням $[Ca^{2+}]_z$.

Потенціалозалежні кальцієві канали клітин нижньої долі слинної залози личинки хірономуса залежать від клітинного метаболізму: при додаванні до розчину для внутрішньоклітинної перфузії суміші цАМФ (10^{-4} моль/л), АТФ (2 ммоль/л) та Mg^{2+} (3 ммоль/л) амплітуда кальцієвого струму збільшувалася на $84,28 \% \pm 24,89 \%$ [3]. Амплітуда ж натрієвого струму через модифіковані кальцієві канали під дією цієї суміші статистично достовірно ($P < 0,001$ при $n = 7$) підвищувалася на $56,13 \% \pm 10,20 \%$. Відмінності між цими змінами за критерієм t Стюдента не було. Статистично достовірною ($P < 0,05$) була лише різниця в мінливості за критерієм Фішера, що може бути зумовлено як і зміною властивостей каналів при модифікації, так і артефактами дослідження.

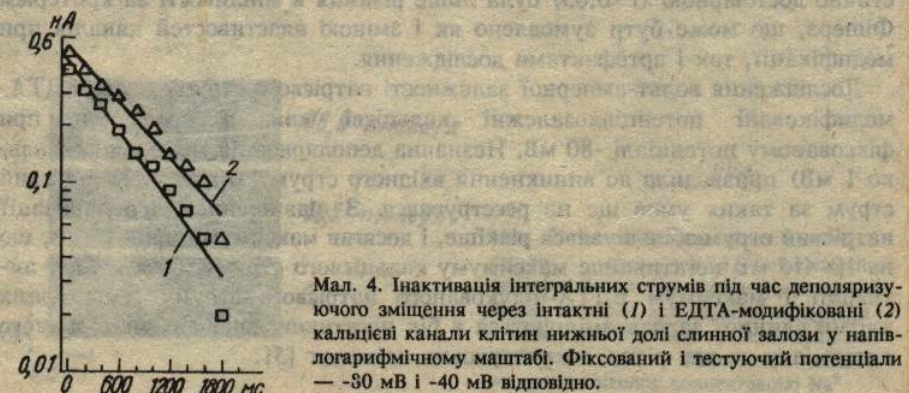
Дослідження вольт-амперної залежності натрієвого струму через ЕДТА-модифіковані потенціалозалежні кальцієві канали провадили при фіксованому потенціалі -80 мВ. Незначна деполяризація мембрани (близько 1 мВ) призводила до виникнення вхідного струму (мал. 3). Кальцієвий струм за таких умов ще не рееструвався. З підвищенням деполяризації натрієвий струм збільшувався різкіше, і досягав максимуму при -45 мВ, що на 10—15 мВ негативніше максимуму кальцієвого струму. Отже, поріг активації і максимум ЕДТА-індукованого натрієвого струму секреторних клітин слинної залози зміщуються в бік негативних значень мембранного потенціалу не так різко, як у нервових клітинах [5].

Нез'ясованим до кінця залишається механізм інактивації натрієвого струму через модифіковані кальцієві канали. Інактивація ЕДТА-індукованого натрієвого струму через мембрану кардіоміоцитів сповільнюється [1], а через мембрану нервових клітин повністю зникає [5], що пов'язують з



усуненням кальційзалежного механізму інактивації при модифікації каналів. У той же час інактивація ЕДТА-індукованого натрієвого струму мембрани гладком'язових клітин коронарної артерії є більш швидшою, ніж інактивація кальцієвого струму [6]. Хоч остання для мембрани секреторних клітин слинної залози личинки хірономуса описується однією експонентою, але в певній мірі вона є кальційзалежною [3]. ЕДТА-індукований натрієвий струм інактивувався статистично достовірно ($P < 0,001$ при $n = 8$) повільніше, ніж кальцієвий струм: при тестуючому потенціалі -40 мВ стали часу інактивації (τ_h) становлять 848 і 712 мс відповідно (мал. 4). Наведені факти свідчать на користь наявності кальційзалежного механізму під час інактивації кальцієвого струму.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що кальцієві канали секреторних клітин слинної залози личинки хірономуса, так само, як і кальцієві канали збудливих клітин, при зниженні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ втрачають свою селективність і стають проникними для одновалентних катіонів. При цьому зберігається метаболічна залежність каналів, їх здатність до інактивації та чутливість до фармакологічних речовин. Поряд із втратою селективності зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ призводить до незначного зсуву потенціалозалежних характеристик ЕДТА-модифікованого струму, що, як і для нервових клітин, можна пояснити зміною поверхневого потенціалу мембрани і локальним збільшенням негативного заряду біля устя каналу [5].



MODIFICATION OF POTENTIAL IN THE SECRETORY CELL

Effect of modification of potential in the secretory cell of salivary gland in *Chironomus* by binding substances (EGTA or verapamil) as well as with the dependence of modified calcium current on the sodium current through the modified calcium channels is studied. The maximum current through native channel

I.Franko University, Lviv, Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Верхратский А.Н., Пронин В.А. ЭДТА-модифицированные кальциевые каналы в мембране морской свинки // Физиол. журн. — 1990. — Т. 36, № 1. — С. 137—141.
2. Ганиткевич В.Я., Смирнов В.И. Кальциевые каналы в мембране секреторных клеток личинки хирономуса // Биол. журн. — 1990. — Т. 36, № 1. — С. 137—141.
3. Клевец М.Ю., Манько В.В. Инактивация кальциевых каналов секреторных клеток личинки хирономуса // Биол. журн. — 1990. — Т. 36, № 1. — С. 137—141.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 384 с.
5. Шуба Я.М. Исследование инактивации кальциевых каналов нервной клетки: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. — М.: Изд-во АН УССР, 1988. — 10 с.
6. Ganitkevich V. Ja., Shuba Y. M. and visceral smooth muscle. — 1990. — Т. 36, № 12. — С. 137—161.
7. Lux H.D., Carbone E., Zuckerman D.S. Chick sensory neurones: block of calcium current by EGTA. — 1988. — Т. 159, № 1. — С. 159—188.

Львів. ун-т ім. І.Франка
М-ва освіти України

M.Yu.Klevets, V.V.Manko

MODIFICATION OF POTENTIAL-DEPENDENT CALCIUM CHANNELS
IN THE SECRETORY CELL MEMBRANE IN THE CA-FREE MEDIUM

Effect of modification of potential-dependent calcium channels in cells of the upper lobe of the salivary gland in *Chironomus* larva has been ascertained in the Ca-free medium containing Ca-binding substances (EGTA or EDTA). It is shown that the inward current depends on the sodium transmembrane gradient. The amplitude of the inward sodium current decreases under the influence of verapamil as well as with an increase of external concentration of Ca^{2+} ions. The metabolic dependence of modified calcium channels as well as the pharmacological sensitivity are unchanged. τ of the sodium current through modified calcium channels increases insignificantly comparing with that of the calcium current. Maximum of the current-voltage relationship of the sodium current through modified calcium channels is shifted to a negative side by 10–15 mV as compared with the calcium current through native channels.

I.Franko University, Lviv,
Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Верхратский А.Н., Прончук Н.Ф., Савченко А.Н. Характеристика натриевых токов через ЭДТА-модифицированные кальциевые каналы мембраны культивируемых кардиомиоцитов крыс // Физиол. журн. — 1991. — 37, № 6. — С. 49–53.
2. Ганиткевич В.Я., Смирнов С.В., Шуба М.Ф. Модификация потенциалозависимых кальциевых каналов в мембране изолированной гладкомышечной клетки коронарной артерии морской свинки // Биол. мембраны. — 1989. — 6, № 2. — С. 177–181.
3. Клевец М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенциалозависимого кальциевого струму мембрани секреторних клітин // Физиол. журн. — 1992. — 38, № 3. — С. 70–75.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Шуба Я.М. Исследование модифицированных с помощью ЭДТА кальциевых каналов мембраны нервной клетки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1983. — 24 с.
6. Ganitkevich V. Ja., Shuba M.F., Smirnov S.V. Inactivation of calcium channels in single vascular and visceral smooth muscle cells of the guinea-pig // Gen. Physiol. and Biophys. — 1991. — 10, № 12. — С. 137–161.
7. Lux H.D., Carbone E., Zucker H. Na^+ currents through low-voltage-activated Ca channels of chick sensory neurones: block by external Ca^{2+} and Mg^{2+} // J.Physiol. — 1990. — 490. — P. 159–188.

Львів. ун-т ім. І.Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 29.12.93