

**В. Л. Резніков, М. Ф. Шуба**

## **Спонтанні вихідні струми гладеньком'язових клітин хвостової артерії щура**

*Спонтанні виходячі іонні токи (СВТ) гладком'язових кліток хвостової артерії щура досліджували за допомогою стандартного методу «patch-clamp» в конфігурації «відведення від цілої клітки». СВТ, викликані деполяризуючим зміщенням підтримуваного потенціала від  $-30$  мВ до  $+20$  мВ, мали амплітуду від  $50$  до  $1000$  пА. При деполяризації амплітуда цих токів збільшувалась. Вони згасали в  $1$  ммоль/л тетраэтиламонієм. Як частота, так і кількість перенесеного заряду ( $Q$ ) зменшувались в відсутності  $Ca^{2+}$  зовні клітки і в присутності ніфедитина, блокатора потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу. При додаванні  $1$  ммоль/л кофеїна збільшувалась як  $Q$ , так і частота СВТ. Отримані результати демонструють, що СВТ переносились через кальційзалежні кальцієві канали більшої провідності і зависели від входу зовнішнього кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали.*

### **Вступ**

Внутрішньоклітинні іони кальцію здатні активувати низку внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, локальне підвищення примембранної концентрації цих іонів призводить до активації кальційзалежних потенціалкерованих калієвих каналів. Одночасне відкриття групи цих каналів у гладеньком'язових клітинах (ГМК) виявляється у вигляді спонтанних вихідних струмів (СВС) [1, 2, 5, 12, 13, 17, 20]. Активація останніх гіперполяризує мембрану і, як результат, пригнічує збудливість міоцитів [15, 16]. Тому дія блокаторів цих струмів часто викликає збудження та скорочення ГМК [3, 14]. Кальційзалежні калієві канали є однією з мішеней дії біологічно активних речовин. Відомо [11, 18], що активація даних каналів є одним із механізмів розслаблюючої дії гіперполяризуючого фактора та NO, що виділяються з ендотелію. Нині немає синтетичних індикаторів, які б давали змогу реєструвати зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію в примембранній ділянці. Відомо, що струм, який проходить через кальційзалежні калієві канали залежить від концентрації  $Ca^{2+}$  біля входу в канал. Отже, за його допомогою можна оцінити зміну внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  у примембранній ділянці. Немає даних дослідження СВС у ГМК хвостової артерії щура. Тому метою нашої роботи було вивчення СВС у міоцитах цієї судини і їх залежність від концентрації зовнішньо- та внутрішньоклітинного кальцію.

### **Методика**

*Ізолювання ГМК.* У дослідженні використовували щурів лінії Вістар віком 5 тиж, масою 250–300 г. Клітини отримували в безкальцієвому розчині (фізіологічний розчин з усуненими іонами Ca). Тварин декапітували під

© В. Л. Резніков та ін.

ефірним наркозом. ГМК виділяли з початкової та середньої частини хвостової артерії. Для цього вирізану хвостову артерію переносили до безкальцієвого розчину, очищали її від сполучної тканини, після чого розрізали вздовж і знімали ендотелій за допомогою фільтрувального паперу. Деендотелізовану смужку артерії переносили до безкальцієвого розчину, що містив ферменти в таких концентраціях: папаїн — 0,15 %, колагеназа (тип XI) — 0,15 %, бичачий сироватковий альбумін (БСА) — 0,1 %. Інкубували смужку протягом 17 хв при 34 °С. Після цього її переносили до безкальцієвого розчину, що містив лише БСА в концентрації 0,1 %. Для отримання поодиноких клітин цей розчин з тканиною багато разів пропускали через кінчик пастерівської піпетки. Свіжовиділені клітини зберігали при 4 °С в фізіологічному розчині з концентрацією кальцію 0,1 ммоль/л і використовували протягом 5 год.

*Дослідження іонних струмів.* Для дослідження трансмембранних іонних струмів використовували стандартний метод «patch-clamp» у конфігурації «відведення від цілої клітини» [9]. Суспензію ізольованих клітин заливали в камеру (об'єм 0,4 мл) столика інвертованого мікроскопа. Через 5–10 хв, коли клітини осідали на дно камери, розчин, в якому вони знаходилися (фізіологічний розчин з концентрацією кальцію 0,5–1 ммоль/л) замінювали на фізіологічний розчин з концентрацією кальцію 2,5 ммоль/л. Відведення струмів здійснювали за допомогою скляної мікропіпетки, заповненої розчином такого складу (ммоль/л): KCl — 131, MgSO<sub>4</sub> — 1, EGTA — 0,5, Na<sub>2</sub>ATP — 3, NEPES — 10, рН 7,4 (KOH). Опір заповнених цим розчином мікропіпеток становив 2–4 МОм, а опір контакту піпетки з клітиною — 3–10 ГОм. Послідовний опір, оцінений за амплітудою ємнісного струму після прориву мембрани, становив 7–15 МОм. Цей опір під час експерименту не компенсували. Мембранні струми підсилювали за допомогою пристрою «РОК-3М». Отримані струми пропускали через фільтр з частотою зрізу 3 кГц і відцифровували через 0,8 і 8 мс, а потім записували на ІВМ-сумісний комп'ютер та обробляли за допомогою програми «Screen» (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця) і «pClamp» (фірми «Axon Instruments», США). Кількість перенесеного заряду (Q) через мембрану при активації СВС визначали як інтеграл від осцилограми струму.

*Розчини.* Фізіологічний позаклітинний розчин був такого складу (ммоль/л): NaCl — 120,4, KCl — 5,9, MgCl<sub>2</sub> — 1,2, глюкоза — 11,5, CaCl<sub>2</sub> — 2,5, NEPES — 5, рН до 7,4 доводили NaOH. Для експериментів використали безкальцієвий розчин, який отримували еквімолярною заміною в фізіологічному розчині Ca<sup>2+</sup> на Co<sup>2+</sup>. Розрахована концентрація іонізованого кальцію всередині клітини становила 10<sup>-7</sup> моль/л. Внутрішньопіпетковий розчин в якому концентрація кальцію була знижена, отримували включенням до нього 10 ммоль/л EGTA. Статистичну обробку результатів представлено як M ± m.

## Результати

Усі дослідженні ГМК демонстрували СВС у відповідь на тривалу деполяризацію мембрани (7–180 с) до рівня підтримуваного мембранного потенціалу від -30 до +20 мВ. Фоновий шум, вище якого вихідні струми вважали за

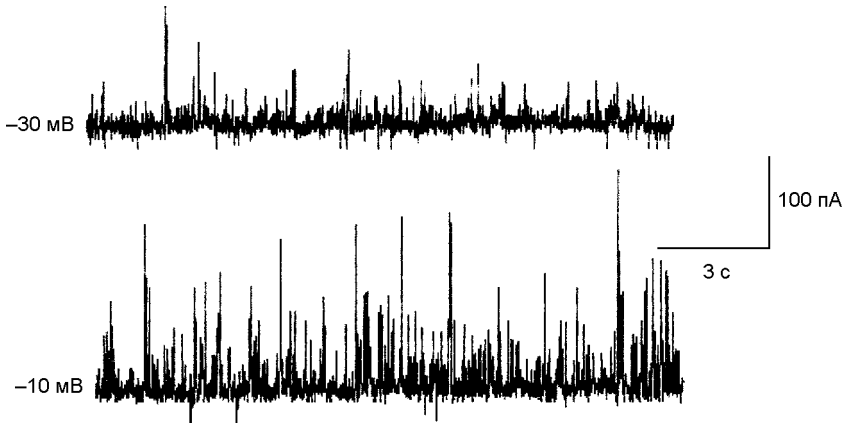


Рис. 1. Спонтанні вихідні струми при різних рівнях фіксованої деполяризації мембрани гладеньком'язових клітин. Струми отримано за умов рівня підтримуваного мембранного потенціалу, вказаного зліва від кожної реєстрації.

СВС, був 10–55 пА. Амплітуда СВС коливалася від 50 пА до 1000 пА, частота — від 0,5 до 9,9 Гц (на різних клітинах). Вони блокувалися 1 ммоль/л ТЕА. Зміна підтримуваного рівня мембранного потенціалу від  $-30$  до  $-10$  мВ збільшувала амплітуду СВС і, можливо, їх частоту (рис. 1).

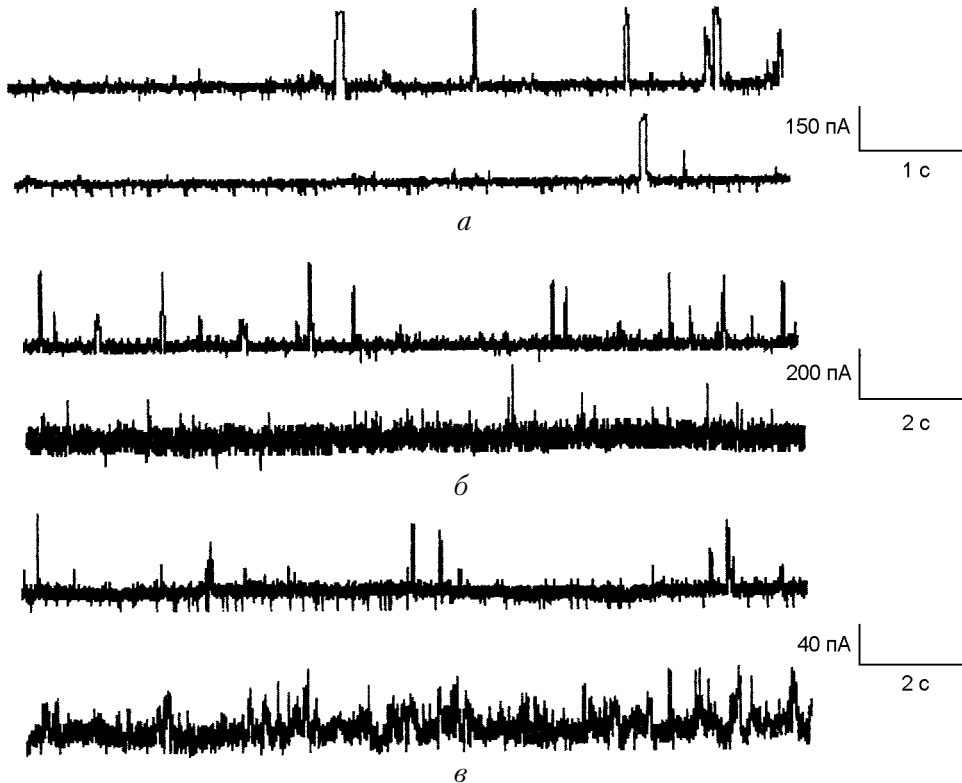


Рис. 2. Залежність спонтанних вихідних струмів від концентрації зовнішньо- та внутрішньоклітинного кальцію. Струми отримано при тривалій деполяризації мембрани до  $-10$  мВ. У кожній групі з двох осцилограм верхня — контроль, нижня — дія речовини: *а* — дія безкальцієвого розчину, *б* — дія 10 мкмоль/л ніфедипіну, *в* — дія кофеїну в концентрації 1 ммоль/л.

З наведених результатів можна зробити висновок, що СВС зумовлені активацією кальційзалежних калієвих каналів великої провідності.

У наступній серії досліджень ми визначили залежність активації СВС від концентрації зовнішньоклітинного кальцію. В цих і наступних експериментах СВС досліджували при підтримуваному мембранному потенціалі – 10 мВ. При заміні фізіологічного розчину на безкальцієвий спостерігалось пригнічення цих струмів (рис. 2, а), зменшувалась їх частота на  $46\% \pm 7\%$  і кількість перенесеного заряду (Q) – на  $45\% \pm 11\%$  ( $n = 5$ ). Дія безкальцієвого розчину була зворотною. Ніфедипін, блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, що додавали до зовнішнього розчину проявляв подібний вплив на ці струми. За його наявності спостерігали зменшення частоти СВС на  $50\% \pm 12\%$  і кількості перенесеного заряду – на  $54\% \pm 16\%$  ( $n = 3$ ) (див. рис. 2, б). Дія безкальцієвого розчину та ніфедипіну свідчить про залежність активації СВС від іонів кальцію, що входять до ГМК через L-тип кальцієвих каналів.

Для визначення залежності цих струмів від кальцію, що вивільнився з внутрішньоклітинних депо, ми використали кофеїн, речовину яка спустошує ріанодиновий компонент саркоплазматичного ретикулума (СР). Кофеїн у малих концентраціях призводив до часткового спустошення цих депо [8], внаслідок чого підвищувалась концентрація вільного внутрішньоклітинного кальцію. У концентрації 1 ммоль/л кофеїн спричинював у зовнішньому розчині збільшення частоти СВС на  $76\% \pm 14\%$  і кількості перенесеного заряду на  $26\% \pm 9\%$  ( $n = 3$ ) (див. рис. 2). Таким чином, активація СВС залежить також від іонів кальцію, що вивільняється з ріанодинчутливих внутрішньоклітинних депо.

## Обговорення

У даній роботі ми досліджували фармако-біофізичні властивості спонтанних вихідних струмів плазматичної мембрани ГМК хвостової артерії щура. Відомо, що ці струми протікають через кальційзалежні калієві канали великої провідності [1, 2, 4]. Останні активуються як потенціалом на мембрані, так і підвищенням внутрішньоклітинної примембранної концентрації іонів кальцію. Зміна потенціалу від –10 до –30 мВ підвищувала амплітуду цих струмів. Можливо збільшення частоти стоксів за даних умов могло відбуватися через підвищення частоти СВС внаслідок збільшення ймовірності відкриття каналу при деполяризації, або як результат збільшення амплітуди стоксів, що не помітні через шум мембрани при –30 мВ. Для визначення цього потрібні подальші дослідження.

Концентрація внутрішньоклітинного кальцію може змінюватися при вході до ГМК зовнішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  і вивільнення його з внутрішньоклітинних депо. Відомо, що СВС у ГМК різних судин не однаково залежать від зовнішньоклітинного кальцію. Так, наприклад, у ГМК легеневої артерії кроля і коронарної артерії людини та морської свинки СВС зникали через декілька хвилин в номінально безкальцієвому розчині та безкальцієвому розчині з додаванням ЕГТА [2, 6, 19], тоді як у ГМК мозкової артерії вони зберігалися навіть на 40-й хвилині дії фізіологічного розчину з 250 мкмоль/л  $\text{Cd}^{2+}$  [6]. Ці струми залишалися при дії безкальцієвого розчину на ГМК коро-

нарної артерії морської свинки [2]. За наших умов істотно змінювалася частота СВС і  $Q$ . СВС зберігалися навіть на 8-й хвилині дії безкальцієвого розчину. Одним з шляхів входу зовнішньоклітинного кальцію до ГМК є потенціалзалежні кальцієві канали L-типу. В наших експериментах дія ніфедипіну призводила до зменшення частоти і  $Q$  майже на 50%. Однак цей блокатор кальцієвих каналів у ГМК інших судин суттєво не впливав на СВС [10]. З аналізу результатів дії безкальцієвого розчину і ніфедипіну можна зробити висновок, що потенціалзалежні кальцієві канали L-типу є головним шляхом входу до ГМК позаклітинного кальцію, який бере участь в активації СВС в ГМК хвостової артерії щура.

На фоні пригніченого входу позаклітинного кальцію до міоцитів СВС все ще генерувалися. Цей факт можна пояснити активацією кальційзалежних калієвих каналів кальцієм, що вивільняється з внутрішньоклітинних депо. Дійсно, в наших експериментах дія 1 ммоль/л кофеїну призводила до збільшення частоти СВС. Вхід кальцію до ГМК за таких умов міг бути частково пригніченим, оскільки кофеїн зменшує амплітуду струму через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу [8, 21].

Ми дослідили СВС при тривалій деполяризації мембрани ГМК хвостової артерії щура. Продемонстрували їх залежність від входу кальцію ззовні і його вивільнення з внутрішньоклітинних депо. Показали, що активація цих струмів залежить від входу кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу.

**V. L. Reznikov, M. F. Shuba**

### **SPONTANEOUS TRANSIENT OUTWARD CURRENTS IN SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE RAT TAIL ARTERY**

Spontaneous transient outward currents (STOCs) were studied in the rat tail artery smooth muscle cells using standard patch-clamp recording techniques in the whole-cell configuration. STOCs evoked by membrane depolarization from  $-30$  to  $20$  mV varied in size from  $50$  to  $1000$  pA, their amplitude increased with membrane depolarization. These currents were inhibited by  $1$  mM TEA<sup>+</sup>. Both the frequency and the transferred charge ( $Q$ ) were decreased in the absence of the extracellular Ca<sup>2+</sup> or in the presence of the selective blocker of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels nifedipine. Application of caffeine at  $1$  mM increased both  $Q$  and the frequency of STOCs generation. These results indicate that STOCs are carried by large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> influx plays an important role in their activation.

*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бурый В.А., Гордиенко Д.В., Шуба М.Ф. Характеристика калиевой проводимости мембраны изолированной гладкомышечной клетки мезентериальной артерии // Биол. мембраны. — 1992. — **9**, №6. — С. 595-601.
2. Ганиткевич В.Я., Шуба М.Ф. Спонтанные выходящие токи в мембране изолированной гладкомышечной клетки коронарной артерии // Там же. — 1988. — **5**, №12. — С. 1312-1320.

3. *Anwer K., Oberti C., Perez G.J. et al.* Calcium-activated K<sup>+</sup> channels as modulators of human myometrial contractile activity // *Amer. J. Physiol.* — 1993. — **265**, (Cell Physiol. 34). — P. C976-C985.
4. *Bolton T.B., Imaizumi Y.* Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells // *Cell Calcium.* — 1996. — **20**, №2. — P. 141-152.
5. *Benham C.D. and Bolton T.B.* Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of rabbit // *J. Physiol.* — 1986. — **381**. — P. 385-406.
6. *Bychkov R, Gollasch M., Ried Ch. et al.* Regulation of spontaneous transient outward potassium currents in human coronary arteries // *Circulation.* — 1997. — **95**. — P. 503-510.
7. *Bonev A.D., Jaggar J.H., Rubart M., Nelson M.T.* Activators of protein kinase C decrease Ca<sup>2+</sup> spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — **273**. — P. C2090-C2095.
8. *Ganitkevich V.Ya., Isenberg G.* Efficacy of peak Ca<sup>2+</sup> currents (I<sub>Ca</sub>) as trigger of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in myocytes from the guinea-pig coronary artery // *J. Physiol.* — 1995. — **484**, №2. — P. 287-306.
9. *Hamil O.P., Marty A., Neher E. et al.* Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* — 1981. — **391**. — P. 85-100.
10. *Hatakeyama N., Mukhopadhyay D., Goyal R.K., Akbarali H.I.* Tyrosine kinase-dependent modulation of calcium entry in rabbit colonic muscularis mucosae // *Amer. J. Physiol.* — 1996. — **270**. — P. C1780-C1789.
11. *Hecker M.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor — fact or fiction? // *NIPS* — 2000. — **15**. — P. 1-5.
12. *Kang T.M., So. I., Kim K.W.* Caffeine- and histamine-induced oscillations K(Ca) current in single smooth muscle cells of rabbit cerebral artery // *Pflugers Arch.* — 1995. — **431**. — P. 91-100.
13. *Komori S., Bolton T.B.* Actions of guanine nucleotides and cyclic nucleotides on calcium stores in single patch-clamped smooth muscle cells from rabbit portal vein // *Brit. J. Pharmacol.* — 1989. — **97**. — P. 973-982.
14. *Milesi V., Aiello E.A., Rebolledo A. et al.* Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells // *Pflugers Arch.* — 1999. — **437**. — P. 455-461.
15. *Nelson M.T., Cheng H., Rubart M. et al.* Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks // *Science.* — 1995. — **270**. — P.633-637.
16. *Nelson M.T., Patlak J.B., Worley J.F., Standen N.B.* Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle cell tone // *Amer. J. Physiol.* — 1990. — **259**, (Cell Physiol 28). — P. C3-C18.
17. *Ohya Y., Kiramura K., Kuriyama H.* Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cell // *Ibid.* — 1987. — **252**. — P. C401-C410.
18. *Standen N.B., Quayle J.M.* K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle // *Acta. Physiol. Scand.* — 1998. — **164**. — P. 549-557.
19. *Vandier C., Delpech M., Bonnet P.* Spontaneous transient outward currents and delayed rectifier K<sup>+</sup> current: effects of hypoxia // *Amer. J. Physiol.* — 1998. — **275**, №1. — P.L145-L154.
20. *Zholos A.V., Baidan L.V., Shuba M.F.* Properties of the late transient outward current in isolated intestinal smooth muscle cells of the guinea-pig // *J. Physiol.* — 1991. — **443**. — P. 555-574.
21. *Zholos A.V., Baidan L.V., Shuba M.F.* The inhibitory action of caffeine on calcium currents in isolated intestinal smooth muscle cells // *Pflugers Arch.* — 1991. — **419**, №3-4. — P. 267-73.