

А.В. Дресвянніков, А.В. Жолос, М.Ф. Шуба

Поодинокі неселективні катіонні канали, активовані мускариновими агоністами гладеньком'язових клітин тонкого кишечника морської свинки

В гладкомышечных клетках тонкого кишечника морской свинки карбохолинактивированный трансмембранный катионный ток является суммой токов трех типов катионных каналов – с малой ($10 \text{ пСм} \pm 2 \text{ пСм}$), средней ($56 \text{ пСм} \pm 8 \text{ пСм}$) и большой ($135 \text{ пСм} \pm 14 \text{ пСм}$) проводимостью. Установлено, что основную роль в формировании карбохолинактивированного тока играют каналы средней проводимости. При помощи метода фиксации потенциала в конфигурации “outside-out” были исследованы потенциалзависимые свойства канала средней проводимости, активированного как наружной аппликацией карбохолина, так и внутриклеточной аппликацией GTP γ S. Установлено, что потенциалзависимое изменение вероятности открытого состояния (P_o) и амплитуды одиночного катионного канала средней проводимости определяют U-образную форму вольт-амперной зависимости катионного тока целой клетки.

ВСТУП

Активация мускаринових холінорецепторів вісцеральних гладеньком'язових клітин (ГМК) ацетилхоліном призводить до скорочення, яке є наслідком двох спряжених процесів – деполяризації мембрани міоцитів, що активує входження позаклітинного Ca^{2+} до ГМК і вивільнення Ca^{2+} з інозитолтрифосфатчутливого компоненту внутрішньоклітинного депо. У свою чергу деполяризація міоцитів зумовлена активацією вхідного натрієвого струму через неселективні катіонні канали плазматичної мембрани [1–3]. Неселективний катіонний струм, активований мускариновими агоністами (mIcat), досить детально досліджений. Припускається, що в передачі сигналу від холінорецепторів до катіонних каналів бере участь α -субодиниця G_i/G_o G-білків [5]. Таким чином, mIcat у міоцитах можна активувати як зовнішньоклітинною аплікацією карбохоліну, так і внутрішньоклітинною

аплікацією гуанозиттрифосфату- γ S (GTP γ S). Вольт-амперна залежність катіонного струму, активованого карбохоліном або GTP γ S, має U-подібну форму та потенціал реверсії, близький до 0 мВ [6]. Тому цікаво було дослідити за цих умов амплітудно-кінетичні властивості струму поодиноких неселективних катіонних каналів. Описано властивості поодиноких катіонних каналів лише в конфігурації “ціла клітина” за умов використання низьких концентрацій агоніста [4]. В цих дослідженнях було показано, що катіонний канал має провідність 25–35 пСм. Однак такий підхід не дає можливості забезпечити задовільні значення співвідношення сигнал – шум.

Тому в наших дослідах поодинокі катіонні канали, активовані мускариновими агоністами, досліджувались у конфігурації “outside-out” з використанням еквімолярних цезієвих розчинів і фіксованого рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_i \sim 100 \text{ нмоль/л}$).

© А.В. Дресвянніков, А.В. Жолос, М.Ф. Шуба

МЕТОДИКА

Поодинокі ГМК поздовжнього шару середньої частини тонкого кишечника морської свинки (350–450 г) виділяли методом ферментативно-механічної обробки. Отримані гладеньком'язові смужки поміщали у розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 6, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,2, D-глюкоза – 12, HEPES – 10; pH 7,4 (NaOH). Смужки розрізали на фрагменти довжиною 2–3 мм, а потім переносилися в безкальцієвий розчин наступного складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 6, D-глюкоза – 12, HEPES – 10; pH 7,4 (NaOH). Ферментативну обробку гладеньком'язових смужок протягом 22–26 хв здійснювали при 36 °C у безкальцієвому розчині Кребса при наявності колагенази типу 1A (1 мг/мл), бичачого сироваткового альбуміну (1 мг/мл), інгібітора трипсину (1 мг/мл). Після обробки поодинокі ГМК виділяли піпетуванням фрагментів тканини у безкальцієвому розчині. Ізольовані ГМК зберігали в розчині Кребса при 4 °C впродовж усього експерименту.

Дослідження іонних струмів поодиноких катіонних каналів проводили в конфігурації “outside-out”, яку отримували з конфігурації “ціла клітина” за допомогою поступового відведення кінчика мікропіпетки від клітини. Всі досліди проводили в еквімолярних цезієвих розчинах, двовалентні катіони Ca і Mg були відсутні у зовнішньому розчині для запобігання їх модулюючого впливу на іонний струм [7].

Для активації трансмембранного катіонного струму цілої клітини використовували агоніст мускаринових рецепторів карбохолін у концентрації 50 мкмоль/л і внутрішньоклітинний активатор G-білків GTFγS у концентрації 200 мкмоль/л. Реєстрацію струмів поодиноких катіонних каналів здійснювали за допомогою підсилювача List EPC-5. Для генерації імпульсів напруги, а також для реєстрації струму іонних каналів було використано аналого-цифровий

перетворювач Digidata 1200 та програму pClamp 6 (“Axon Instruments, Inc.”, США). Отримані результати фільтрували з частотою зріза 1 кГц і відцифровували з частотою 5 кГц. Амплітуду катіонних каналів розраховували з точкових гістограм як відстань між піками гаусовських розподілів. Результати аналізували за допомогою програм pClamp 6 і MicroCal Origin 5.0 (“MicroCal Software”, США).

У дослідах використовували цезієві розчини такого складу (ммоль/л) зовнішній розчин: CsCl – 120, D-глюкоза – 12, HEPES – 10; pH 7,4 (CsOH), внутрішньопіпетковий розчин: CsCl – 80, MgATФ – 1, GTP – 1, ВАРТА – 10, CaCl₂ – 4,6, D-глюкоза – 12, HEPES – 10, креатин – 5; pH 7,4 (CsOH). Використані активатори катіонного струму були від фірми “Sigma” (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ГМК тонкого кишечника морської свинки карбохолінактивованій трансмембранний катіонний струм є сумою струмів трьох типів катіонних неселективних каналів плазматичної мембрани. Після утворення конфігурації “outside-out” в ізольованому мембранному фрагменті під впливом карбохоліну можна було виявити три типи катіонних каналів з малою (10 пСм ± 2 пСм; n=20), середньою (56 пСм ± 8 пСм; n=27) та великою (135 пСм ± 14 пСм; n=3) провідностями (рис. 1,а). На рис. 1, в представлено фрагмент реєстрації на якому одночасно є всі три підтипи катіонних каналів. Відсутність кратності рівнів провідності та суттєві розбіжності в динаміко-кінетичних характеристиках струмів кожного з типів каналів (див. рис. 1,а) виключає наявність одного типу каналів з різними підрівнями провідності. Вірогідність наявності активних катіонних каналів у дослідженому фрагменті мембрани при активації mIcat карбохоліном та утворення конфігурації “outside-out” була 51%. У більшості

фрагментів плазматичної мембрани, в яких спостерігалася канална активність, було 2–6 каналів малої та середньої провідностей. Так, канал з провідністю 135 пСм спостерігався лише в 6% випадків і був вкрай нестабільним. Кінетика його роботи характеризувалася короткими відкриванням та закриванням з високою частотою із наступним раптовим зниканням активності в перші ж хвилини після утворення конфігурації “outside-out”. Така нестабільна активність каналу може бути наслідком участі в процесах активації-деактивації каналу внутрішньоклітинних компонент, які швидко вимиваються після утворення зазначеної конфігурації.

Активні канал малої провідності були в

40% досліджених фрагментах плазматичної мембрани, які мали каналну активність. Але беручи до уваги їх низку провідність та малі значення вірогідності знаходження каналу у відкритому стані (P_0 0,01–0,12, інтегральний трансмембранний струм, що переноситься через цей тип каналу становить лише 5% від загального трансмембранного струму.

Основну роль в формуванні трансмембранного струму, активованого мускариновими агоністами, відіграють канали середньої провідності (56 пСм \pm 8 пСм). Їх активність реєструвалася у 27 з 55 досліджених фрагментів плазматичної мембрани. Наявність декількох однотипних активних каналів з провідністю 50 пСм у дослід-

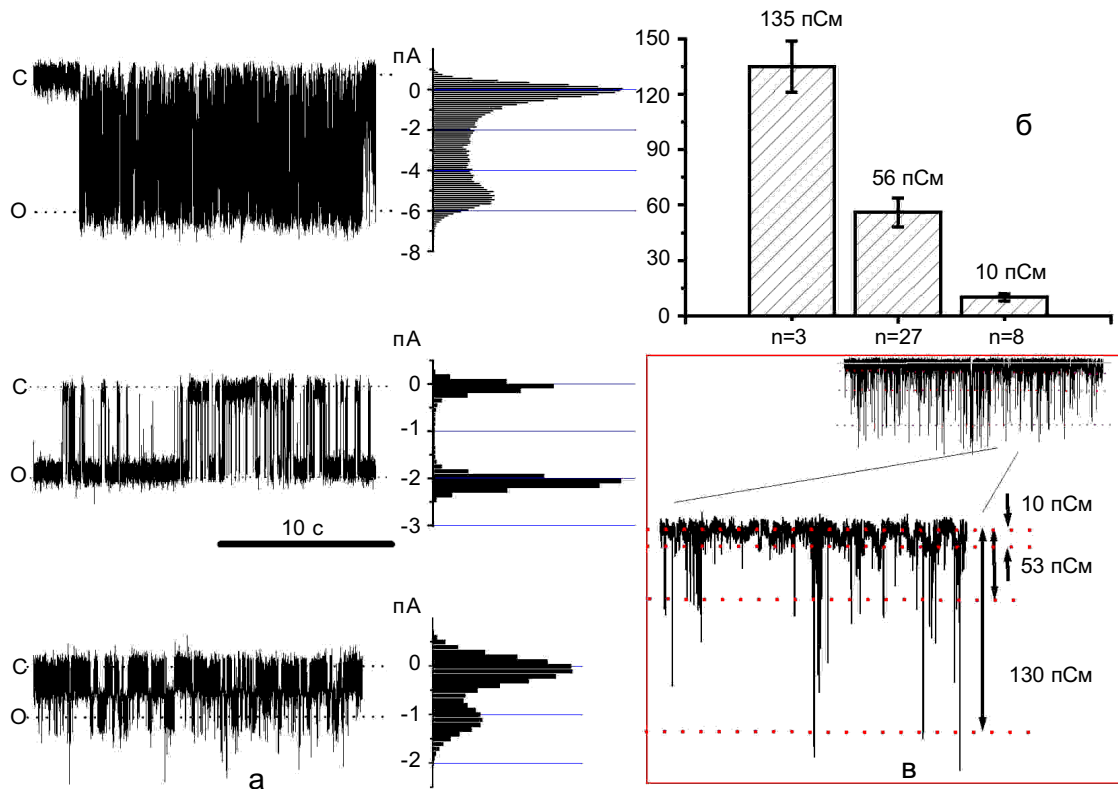


Рис. 1. Три типи неселективних катіонних каналів плазматичної мембрани міоцита, активованих мускариновим агоністом карбохоліном: а – зверху вниз розташовані фрагменти реєстрації та амплітудні гістограми каналів великої провідності (амплітуда 5,8 пА при –40 мВ), середньої провідності (амплітуда 2,15 пА при –40 мВ) та малої провідності (амплітуда 1 пА при –100 мВ), літерою с – позначено закритий стан катіонного каналу, літерою о – відкритий стан катіонного каналу; б – співвідношення провідностей каналів різного типу; в – фрагмент оригінального запису, в якому одночасно є всі три типи катіонних каналів, внизу – збільшена ділянка фрагмента оригінального запису каналів з провідністю 130, 53 і 10 пСм

жуваному фрагменті мембрани (від 2 до 5 каналів) було звичайним явищем (рис. 2,а). З часом спостерігалася тенденція до зменшення вірогідності відкритого стану n активних каналів (nP_o), що відповідає зменшенню їх числа і відносній стабільності P_o для поодинокого каналу. Зменшення кількості активних каналів середньої провідності з часом, мабуть, зумовлює процес десенситизації карбохолінактивованого струму в конфігурації “ціла клітина”.

Ідентичними є кінетико-амплітудні властивості струму катіонних неселективних каналів середньої провідності,

активованих зовнішньою аплікацією карбохоліну ($n=7$), (див. рис. 2,б,в) або внутрішньоклітинною аплікацією GTP γ S ($n=20$), (рис. 3,а,б).

Характерною рисою катіонного каналу середньої провідності є потенціалзалежне зменшення часу відкритого стану каналу. Як видно з рис. 2,б, і 3,б гіперполяризація мембрани до -120 мВ призводить до істотного зменшення P_o . Цей процес є зворотним і свідчить про наявність у каналі сенсора напруги. Ідентичність залежності P_o від мембранного потенціалу у випадку як карбохолін-, так і GTP γ S-активованих

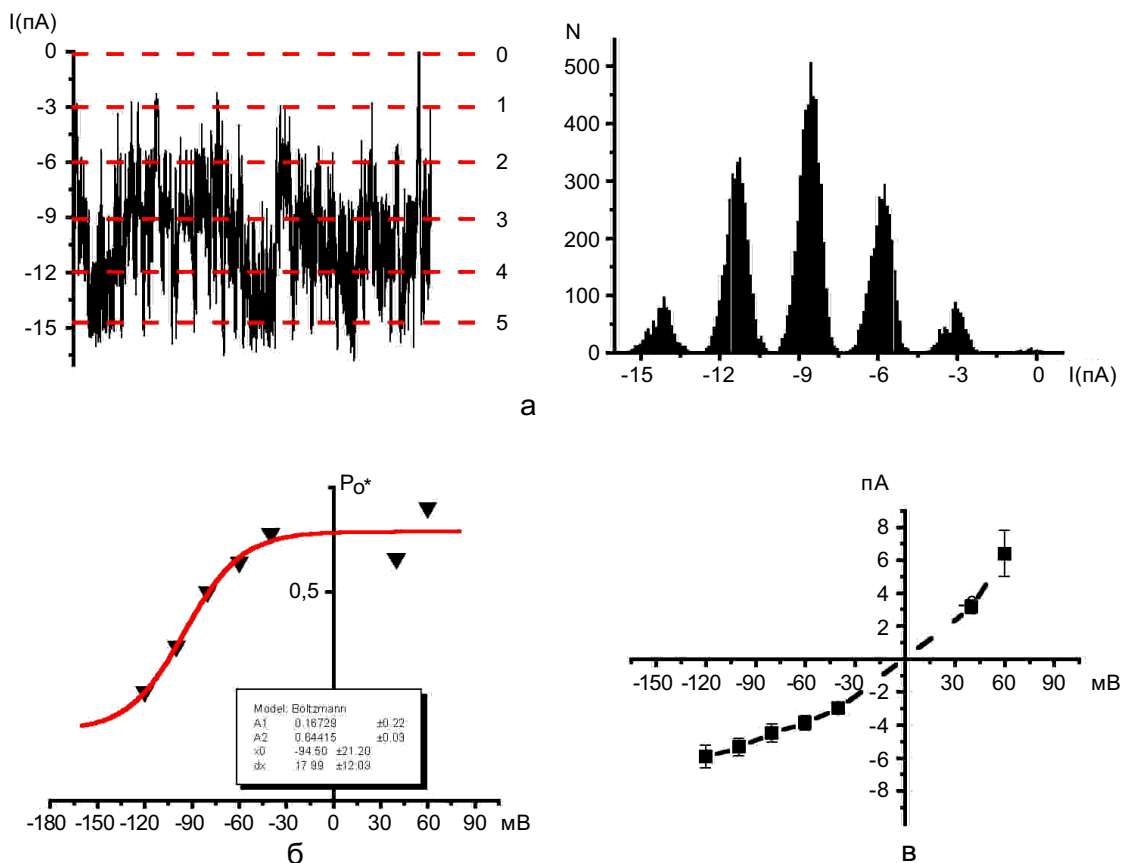


Рис. 2. Характеристики струму поодиноких катіонних каналів середньої провідності в конфігурації “outside-out”, активованих 50 мкмоль/л карбохоліном: а – типовий фрагмент реєстрації струму через ділянку мембрани та відповідна амплітудна гістограма з п’ятьма катіонними каналами середньої провідності; б – залежність P_o для поодинокого неселективного каналу середньої провідності від мембранного потенціалу. Експериментальні точки для P_o^* поодинокого каналу (отримані як P_o загальне для всіх активних катіонних каналів поділене на n – кількість каналів у даному фрагменті мембрани) добре описувались функцією Больцмана; в – вольт-амперна залежність амплітуди струму поодинокого катіонного каналу середньої провідності. потенціал реверсії струму дорівнює 0 мВ (це відповідає потенціалу реверсії еквімолярних цезієвих розчинів)

каналів говорить про вплив зміни мембранного потенціалу саме на неселективний катіонний канал. Отримані результати однак не виключають можливості впливу мембранного потенціалу на зв'язування агоніста (карбохоліну) з мускариновим рецептором. В обох випадках залежність P_o від мембранного потенціалу описується рівнянням Больцмана з $V_{1/2} = -75 \text{ мВ} \pm 7 \text{ мВ}$ та фактором крутизни $k = 14,4 \text{ мВ} \pm 6 \text{ мВ}$ для GTRγS-активованого струму та $V_{1/2} = -94 \text{ мВ} \pm 21 \text{ мВ}$ $k = 17,9 \text{ мВ} \pm 12 \text{ мВ}$ в для карбохолінактивованого струму. Потенціал-залежне зменшення вірогідності відкритого стану катіонного каналу середньої провідності пояснює природу U-подібної форми вольт-амперної характеристики для трансмембранного струму цілої клітини з її характерною інактивацією при від'ємних потенціалах і спричинює зменшення провід-

ності для струму в ділянці близький до 0 мВ. У цілому слід відмітити повну ідентичність властивостей катіонного каналу середньої провідності, не залежно від шляху його активації.

Провідність поодинокого катіонного каналу, отримана з амплітудних гістограм при різних стаціонарних рівнях мембранного потенціалу, не є однаковою і підвищується в діапазоні від -120 до -20 мВ та від 0 до $+80 \text{ мВ}$ (рис. 4,б). При визначенні стаціонарної провідності ми використовували значення струму через поодинокий неселективний катіонний канал при -40 мВ , що відповідає потенціалу ГМК у стані спокою. Зменшення провідності цього каналу може бути наслідком як потенціалзалежних властивостей, так і зростаючого шуму або збільшення кількості коротких відкривань із підвищенням гіперполяризації, що може

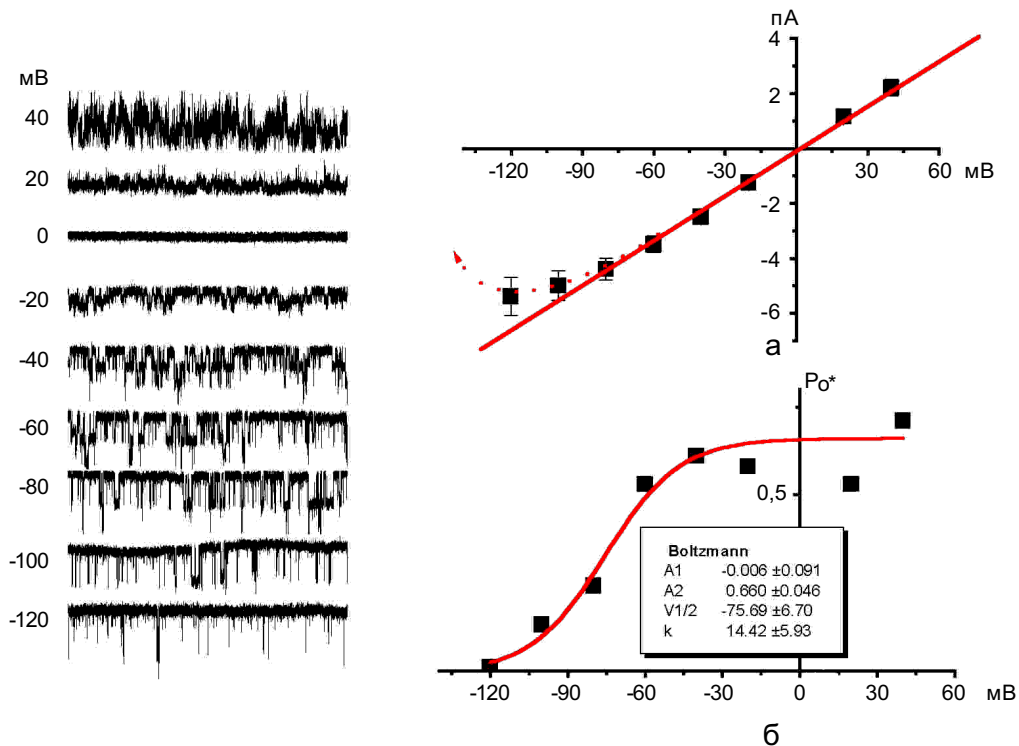


Рис. 3. Характеристики струму поодиноких катіонних каналів середньої провідності в конфігурації “outside-out”, активованих внутрішньоклітинною аплікацією 200 мкмоль/л GTRγS: а – вольт-амперна залежність амплітуди GTRγS-активованого катіонного каналу середньої амплітуди ($60 \text{ пСм} \pm 6 \text{ пСм}$ при -40 мВ). Пунктирною лінією позначено апроксимацію відхилення від лінійних значень у ділянці від'ємних потенціалів; б – залежність P_o для GTRγS-активованого катіонного каналу середньої провідності від мембранного потенціалу

зменшувати значення амплітуди струму через катіонний канал. Для з'ясування цієї можливості нами було проведено порівняння провідностей поодинокого неселективного катіонного каналу, отриманого за допомогою різних методик: стаціонарного вольт-амперного протоколу та за допомогою пілкоподібного зсуву мембранного потенціалу. На рис. 4,а представлено накладання вольт-амперних залежностей (не нормовані результати), отриманих за допомогою пілкоподібного зсуву мембранного потенціалу ($n=5$) через відкритий катіонний канал і звичайного ступінчатого зсуву мембранного потенціалу. Спостерігається майже повне збігання значень у діапазоні від'ємних потенціалів, отриманих за допомогою різних методик. Так, зменшення провідності є додатковим чинником, що зумовлює U-подібну форму вольт-амперної залежності катіонного карбохолінактивованого струму цілої клітини. Максимум провідності (50 пСм) каналу

припадає на ділянку від -50 до 0 мВ, що також свідчить про активну участь саме цього підтипу катіонних каналів у процесах деполяризації мембрани міоцитів тонкого кишечника морської свинки.

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити такі основні висновки. Катіонний струм, активований мускариновими агоністами в ГМК тонкого кишечника морської свинки формується трьома підтипами неселективних катіонних каналів плазматичної мембрани з малою (10 пСм), середньою (56 пСм) і великою (135 пСм) провідністю. Домінуючу роль у формуванні трансмембранного карбохолін- і GTP γ S-активованого струму відіграють канали середньої провідності. Потенціалзалежна модуляція P_o -каналу середньої провідності зумовлює форму вольт-амперної залежності карбохолінактивованого струму цілої ГМК.

Дослідження було виконано частково за підтримки The Wellcome Trust (номер гранту 062926).

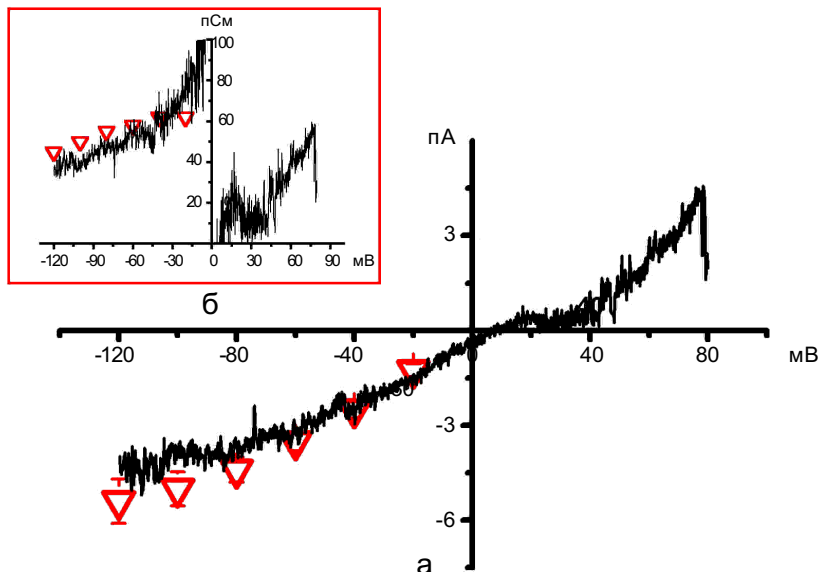


Рис. 4. Порівняльна характеристика вольт-амперних залежностей каналу середньої провідності, отриманих за допомогою різних методик: а – вольт-амперна залежність струму через відкритий катіонний канал середньої провідності. Трикутники – значення амплітуди катіонного каналу середньої провідності, отримані з амплітудних гістограм на різних стаціонарних рівнях мембранного потенціалу. Суцільною лінією представлений “миттєвий” струм через відкритий катіонний канал, отриманий за допомогою пілкоподібного зсуву мембранного потенціалу; б – залежність провідності катіонного каналу від значень мембранного потенціалу

A.V. Dresvyannikov, A.V. Zholos, M.F. Shuba

**SINGLE NONSELECTIVE CATION CHANNELS
ACTIVATED BY M-RECEPTORS IN SMOOTH
MUSCLE OF GUINEA-PIG ILEUM**

The carbachol-evoked inward cationic current in guinea-pig ileum smooth muscle cells is comprised of three types nonselective cationic channels (NSCC) with small (10 ± 2 pS), medium (56 ± 8 pS) and large (135 ± 14 pS) unitary conductance. All three types of NSCC could be activated by external application of carbachol as well as by internal application of GTP γ S. It was found that behavior of carbachol- and GTP γ S-evoked whole-cell current is mainly determined by the properties of medium conductance channels. The U-shaped I-V relationship of the whole-cell cationic current at negative potentials range arrives from voltage-dependence of its P_o of this channel.

Nerve-Muscle Physiology Department, Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шуба М.Ф. Синаптична передача в м'язах і механізми дії медіаторів // Вісник АН УРСР. – 1977. – 12. – С. 44–57.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,
Київ*

2. Benham C.D., Bolton T.B., Lang R.J. Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells // *Nature*. – 1985. – 316. – P.345–347.
3. Inoue R., Isenberg G. Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G protein // *Amer. J. Physiol.* – 1990. – 258. – P.1173–1178.
4. Vogalis F., Sanders K.M. Cholinergic stimulation activates a non-selective cation current in canine pyloric circular muscle cells // *J. Physiol.* – 1990. – 429. – P.223–236.
5. Yan H.D., Okamoto H., Unno T. et al. Effects of G-protein-specific antibodies and G beta gamma subunits on the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cell // *Brit. J. Pharmacol.* – 2003. – 139. – P.605–615.
6. Zholos A.V., Bolton T.B. G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum // *J. Physiol.* – 1994. – 478. – P.195–202.
7. Zholos A.V., Bolton T.B. Effects of divalent cations on muscarinic receptor cationic current in smooth muscle from guinea-pig small intestine // *J. Physiol.* – 1995. – 486 (Pt 1). – P.67–82.

*Матеріал надійшов до
редакції 26.03.2004*