

УДК 577.352: 612.73

## КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ В МЕМБРАНЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК TAENIA SOLI МОРСКОЙ СВИНКИ

А.В.Зима, А.В.Повстан, М.Ф.Шуба

Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, 252601 ГСП, Киев-24, ул. Богомольца, 4  
e-mail: onmf@serv.biph.kiev.ua

Поступила в редакцию 7 октября 1999 г.

Методом фиксации потенциала с помощью присасывающейся микропипетки исследовали кальцийзависимые калиевые (K(Ca)) каналы большой проводимости в изолированных фрагментах мембраны гладкомышечных клеток (ГМК) taenia coli морской свинки, а также токи, переносимые этими каналами в условиях внутриклеточного диализа одиночных клеток. Показано наличие высокой плотности харибдотоксинчувствительных K(Ca) каналов большой проводимости ( $125 \pm 24$  пС при  $[K^+]_i/[K^+]_o = 23$ ). Кроме  $Ca^{2+}$ -зависимости эти каналы проявляли также и потенциалзависимые свойства, однако не имели потенциалзависимой инактивации, а инактивировались только при уменьшении примембранной внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Установлено, что скорость спада тока, переносимого этими каналами отражает кинетику инактивации  $Ca^{2+}$  тока. Высказано предположение, что основным источником  $Ca^{2+}$ , необходимым для активации K(Ca) каналов большой проводимости является вход  $Ca^{2+}$  в клетку через потенциалзависимые  $Ca^{2+}$  каналы L-типа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гладкомышечные клетки, мембрана, K(Ca) каналы, проводимость,  $[Ca^{2+}]_i$ , харибдотоксин, потенциалзависимость, инактивация

В ГМК идентифицировано несколько типов  $K^+$  каналов: K(Ca) каналы, каналы задержанного выпрямления, быстроинактивирующиеся каналы переносящие "А-ток", АТФ-чувствительные каналы, каналы аномального выпрямления [1-5]. Активность этих каналов имеет важное значение в контроле мембранного потенциала покоя и модуляции возбудимости ГМК. В частности, активация выходящего калиевого тока отвечает за фазу реполяризации потенциала действия и генерацию тормозного постсинаптического потенциала (ТПСП) [6, 7]. В свою очередь, почти каждый из этих типов  $K^+$  каналов включают в себя несколько подтипов. Так, к типу K(Ca) каналов принадлежит два подтипа - каналы большой (100 - 250 пС) и каналы малой (до 18 пС) проводимости, первые чувствительны к блокирующему действию харибдотоксина [5, 8-10], а вторые - апамина [5, 11-13]. K(Ca) каналы большой проводимости обнаружены во многих возбудимых клетках и практически во всех типах гладких мышц. Они активируются при увеличении  $[Ca^{2+}]_i$  и дельта-реполяризации мембраны, блокируются наружным ТЭА и харибдотоксином. Этот подтип каналов является "отрицательной обратной связью", реагирующей на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ . Гиперполяризуя мембрану, он предотвращает возникновение потенциала действия, а следовательно и входа  $Ca^{2+}$  в ГМК при действии многих возбуждающих агентов.

Хотя K(Ca) каналы большой проводимости были описаны довольно давно и к настоящему моменту накопилось множество работ, характеризующих токи, переносимые этими каналами в различных отделах желудочно-кишечного тракта [1, 14-18], многие вопросы их функционирования и регуляции остаются открытыми. Например, вопрос об источнике  $Ca^{2+}$ , который их активирует, так окончательно и не решён. Также следует отметить имеющиеся в литературе разногласия относительно свойств K(Ca) каналов большой проводимости.

Ранее нами были проведены фармако-биофизические исследования K(Ca) токов мембраны ГМК taenia coli морской свинки в режиме внутриклеточного диализа [19, 20]. В настоящей работе представлены результаты экспериментов, проведенных на уровне регистрации одиночных K(Ca) каналов большой проводимости, а также предпринята попытка проанализировать работу этих каналов при изменении  $[Ca^{2+}]_i$  различными способами (входом  $Ca^{2+}$  в клетку извне через потенциалзависимые  $Ca^{2+}$  каналы и освобождением  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума (СР)). Необходимость проведения исследований на уровне одиночных каналов объясняется следующими обстоятельствами. Во-первых, на уровне макротокков очень сложно в изолированном виде исследовать K(Ca) ток, так как его кинетика и амплитуда модулируются количеством  $Ca^{2+}$  поступающего в клетку. Во-вторых, только исследования одиночных каналов позволяют выяснить, какие биофизические параметры каналов изменяются под действием того или иного фактора.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на одиночных свежеизолированных ГМК *taenia coli* морских свинок обоих полов весом 250 - 350 г. Процедура получения функционально полноценных изолированных ГМК детально описана в нашей предыдущей работе [19]. В течение эксперимента суспензию клеток хранили при 4°С.

Для отведения ионных токов в работе использовался стандартный метод фиксации потенциала при помощи присасывающейся микропипетки ("patch-clamp") [21]. Регистрация активности одиночных каналов осуществлялась в конфигурациях "inside-out" и "outside-out" этого метода, а общий трансмембранный ионный ток исследовался в режиме внутриклеточного диализа клетки ("whole-cell" конфигурация метода "patch-clamp") [21]. Стеклопипетки изготавливались из мягкого молибденового стекла и оплавливались до сопротивления 2 - 4 МОм (для исследования одиночных каналов микропипетки оплавливались до сопротивления 5 - 7 МОм и покрывались силгардом). Усиление ионных токов осуществлялось при помощи усилителя "РОК-3М". Данные регистрировались, обрабатывались и сохранялись в компьютере IBM PC/AT.

**Растворы.** Для исследования одиночных каналов использовался раствор А, содержащий (мМ): KCl 5.9, NaCl 120.4, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, D-глюкоза 11.5, HEPES 5; (pH 7.4, NaOH) и раствор Б, содержащий (мМ): KCl 135, CaCl<sub>2</sub> 0.2, ЭГТА 0.6, HEPES 10; (pH 7.3, KOH), [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в этом растворе была близка к физиологической - около 100 нМ. Для опытов, проведенных в режиме внутриклеточного диализа исходным наружным раствором являлся раствор А, раствор в пипетке содержал (мМ): KCl 135, MgSO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>АТФ 3, ЭГТА 0.3, HEPES 10; (pH 7.3, KOH) (раствор В). Подача тестирующих растворов производилась при помощи системы, обеспечивающей полную замену раствора в экспериментальной камере за время, не превышающее 2 - 3 с. Исследуемые вещества добавлялись к омывающему раствору в концентрациях, указанных в тексте.

В работе использовали коллагеназу (тип IA), бычий сывороточный альбумин, динатриевую соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (Na<sub>2</sub>АТФ), этиленгликоль (β-аминоэтиловый эфир) - N,N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), 4-аминопиридин, апамин и харибдотоксин фирмы "Sigma" (США); соевый ингибитор трипсина фирмы "Reanal" (Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства.

Все эксперименты проводились при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

K(Ca) каналы впервые были описаны в 1981 году в мембране хромафинных клеток [22] и до настоящего времени обнаружены в мембране большинства, если не всех исследованных объектов, в том числе и в ГМК *taenia coli* морской свинки [1, 3, 17-20]. Ранее на этом объекте нами было показано [19, 20], что в нормальных условиях при ступенчатой деполяризации в переносе выходящего тока принимает участие по крайней мере два типа K(Ca) каналов, а именно: Ca<sup>2+</sup>-зависимые K<sup>+</sup> каналы большой проводимости, чувствительные к блокирующему действию харибдотоксина и Ca<sup>2+</sup>-зависимые K<sup>+</sup> каналы малой проводимости, чувствительные к блокирующему действию апамина. Причём вклад первых в общий трансмембранный ионный ток существенно больше. Проводимость этих каналов по литературным данным [4, 5] варьирует от 100 до 250 пС. Также было показано наличие потенциалзависимых K<sup>+</sup> каналов задержанного выпрямления, не зависящих от Ca<sup>2+</sup>.

В первой части работы было произведено исследование одиночных K(Ca) каналов изолированных фрагментов мембраны ГМК *taenia coli* морской свинки.

На рис. 1 представлены регистрации активности K(Ca) каналов при различных мембранных потенциалах, полученные в конфигурации "outside-out" и их вольт-амперная характеристика (ВАХ). В этих опытах в качестве внутривнутриклеточного раствора использовался раствор Б, наружного - раствор А. При использовании этих растворов соотношение [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> ≈ 23. В такой конфигурации K(Ca) каналы большой проводимости наблюдались во всех исследованных клетках. Обычно на участке мембраны под пипеткой находилось от 3 до 8 каналов. Вероятность открытого состояния каналов (pP<sub>o</sub>) экспоненциально зависела от уровня деполяризации мембраны, увеличиваясь в е раз при увеличении уровня деполяризации на 12.5 мВ. Проводимость этих каналов, рассчитанная в пределах мембранного потенциала от -40 до +60 мВ (см. ВАХ, рис. 1, Б) составляла 125 ± 24 пС (n = 8). Ранее на этом же объекте с использованием "inside-out" конфигурации метода "patch-clamp" было получено немного большее значение проводимости - 147 пС [17, 18]. Это отличие обусловлено тем, что в данных работах был несколько увеличен концентрационный градиент для K<sup>+</sup> по сравнению с нашими экспериментами: [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> = 25. Нами была также рассчитана проводимость этих же каналов в конфигурации "cell-attached" с использованием растворов симметричных по [K<sup>+</sup>] (140 мМ) [23]. В таких условиях проводимость составляла 240 пС. Известно, что проводимость K(Ca) каналов возрастает с увеличением [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> и наши данные совпадают с

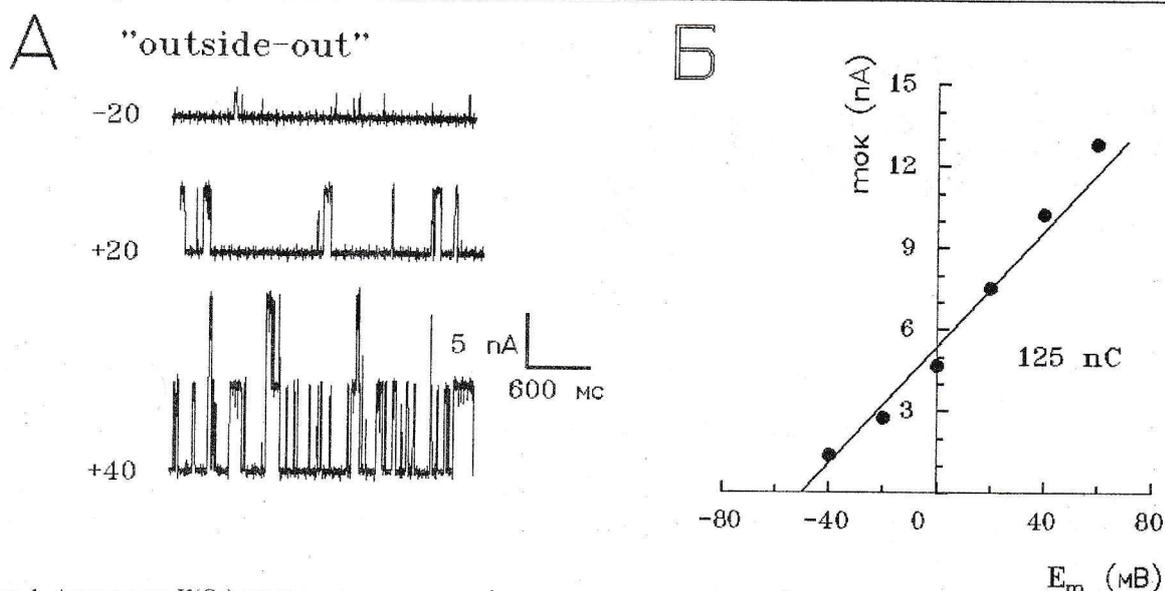


Рис. 1. Активность K(Ca) каналов при различных фиксированных уровнях мембранного потенциала, указанных возле каждого трека (в мВ), зарегистрированная в конфигурации "outside-out" (А) и их ВАХ (Б).

полученными ранее результатами [24, 25], показавшими аналогичное уменьшение проводимости при уменьшении  $[K^+]_o$  со 140 мМ до физиологических значений.

Для идентификации исследуемых каналов был использован хариботоксин, селективно блокирующий K(Ca) каналы большой проводимости. Хариботоксин (50 нМ), добавленный к наружному раствору, приводил к блокированию K(Ca) каналов, при этом  $nP_0$  уменьшалась в 4 раза без изменения амплитуды тока одиночного канала. На рис. 2, представлено действие хариботоксина (50 нМ) на активность каналов в конфигурации "outside-out" при потенциале фиксации +20 мВ. Увеличение концентрации хариботоксина до 100 нМ приводило практически к полному блокированию активности канала. В противоположность хариботоксину, ТЕА (1 мМ) блокировал K(Ca) каналы с наружной

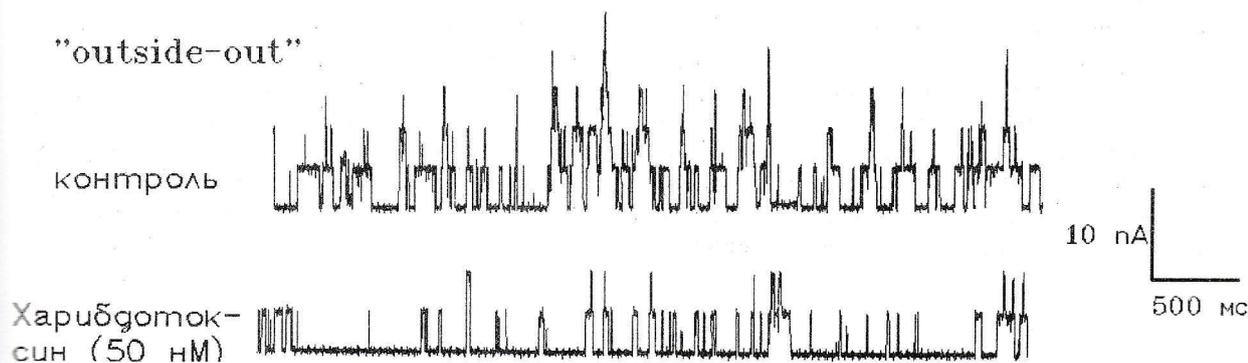


Рис. 2. Действие хариботоксина (50 нМ) на активность K(Ca) каналов в конфигурации "outside-out" при потенциале фиксации +20 мВ.

стороны за счёт уменьшения амплитуды тока одиночного канала (данные не показаны). Другие блокаторы  $K^+$  каналов - 4-аминопиридин (блокатор  $K^+$  каналов А-типа) и апамин (блокатор K(Ca) каналов малой проводимости), добавленные к наружному раствору в концентрациях 5 мМ и 500 нМ соответственно, не приводили к изменению амплитуды и  $nP_0$  K(Ca) каналов большой проводимости.

Для подтверждения того, что регистрируемые каналы являются  $Ca^{2+}$ -зависимыми, было произведено исследование влияния растворов с различной концентрацией  $Ca^{2+}$  на активность каналов, используя конфигурацию "inside-out". При такой конфигурации имеется доступ к внутренней стороне K(Ca) канала, где находится участок связывания для  $Ca^{2+}$ . В этих экспериментах использовали наружный раствор Б и пипеточный раствор А (по отношению к клеточной мембране эти растворы в данных условиях являлись соответственно внутренним и наружным). При таких условиях  $nP_0$  K(Ca) канала составляла 0,067, а среднее время открытого состояния канала ( $\tau_0$ ) - 55 мс. Действие наружного раствора с пониженной концентрацией свободного  $Ca^{2+}$  (для этой цели концентрация ЭГТА в растворе Б повышалась в 5 раз и достигала 3 мМ) приводило к уменьшению активности канала -  $nP_0$  уменьшалась до 0,01, а  $\tau_0$  - до 11 мс

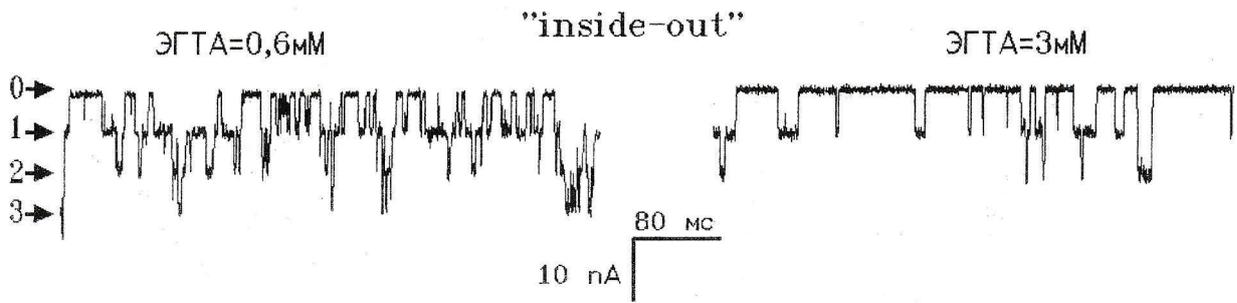


Рис. 3. Зависимость активности  $K(Ca)$  каналов от  $[Ca^{2+}]_i$  снятая в конфигурации "inside-out" при потенциале фиксации  $-30$  мВ. Приведены регистрации активности каналов в растворах с концентрацией ЭГТА  $0,6$  мМ ( $[Ca^{2+}]_i \approx 100$  нМ) и при повышении концентрации ЭГТА в омывающем растворе до  $3$  мМ.

(рис. 3). Аналогичный эффект наблюдался и для других исследованных ГМК. Таким образом, уменьшение  $[Ca^{2+}]_i$  при постоянном мембранном потенциале приводит к ингибированию активности  $K(Ca)$  каналов, за счет уменьшения  $pR_0$  и  $\tau_0$ .

В следующей части работы было произведено фармакологическое исследование тока, переносимого  $K(Ca)$  каналами в режиме внутриклеточного диализа. Во всех последующих экспериментах поддерживаемый потенциал составлял  $-60$  мВ, наружный раствор готовился на основании раствора А, а в качестве внутрипипеточного раствора использовался раствор В. На рис. 4, А показано блокирующее действие харибдотоксина ( $100$  нМ) на трансмембранный ионный ток и "чистый"  $K(Ca)$  ток большой проводимости (трек 3), полученный вычитанием тока в присутствии харибдотоксина (трек 2) из контрольного тока (трек 1). Токи вызывались деполяризующими смещениями мембранного потенциала длительностью  $300$  мс до  $+10$  мВ (потенциал максимума  $Ca^{2+}$  тока для этих клеток [19, 26, 27]). Видно, что в составе  $K(Ca)$  тока большой проводимости можно выделить две составляющие: начальную быстроинактивирующуюся и последующую, с медленной инактивацией, которые, по-видимому, отражают вход  $Ca^{2+}$  в клетку через  $Ca^{2+}$  каналы, открывающиеся при деполяризации мембраны. Как известно, входящий ток в ГМК *taenia coli* морской свинки переносится только через потенциалактивируемые  $Ca^{2+}$  каналы L-типа [19, 26, 27]. Кинетика инактивации этого тока, при деполяризации до  $+10$  мВ, хорошо описывается двухэкспоненциальной функцией [28].

Однако, полученный таким образом "чистый"  $K(Ca)$  ток большой проводимости трудно сравнить с входящим  $Ca^{2+}$  током данной клетки из-за невозможности его регистрации в данных экспериментальных условиях. Как уже отмечалось выше, на уровне макротокков очень сложно в изолированном виде исследовать  $K(Ca)$  ток и сравнить его с  $Ca^{2+}$  током той же клетки. Эту проблему частично можно решить, используя ранее описанный оригинальный прием с использованием апамина, гиперкалиевого и кобальтсодержащего растворов [2, 19, 29]. Результаты одного из таких экспериментов представлены на рис. 4, Б. Видно, что кинетика спада "чистого"  $K(Ca)$  тока большой проводимости (трек

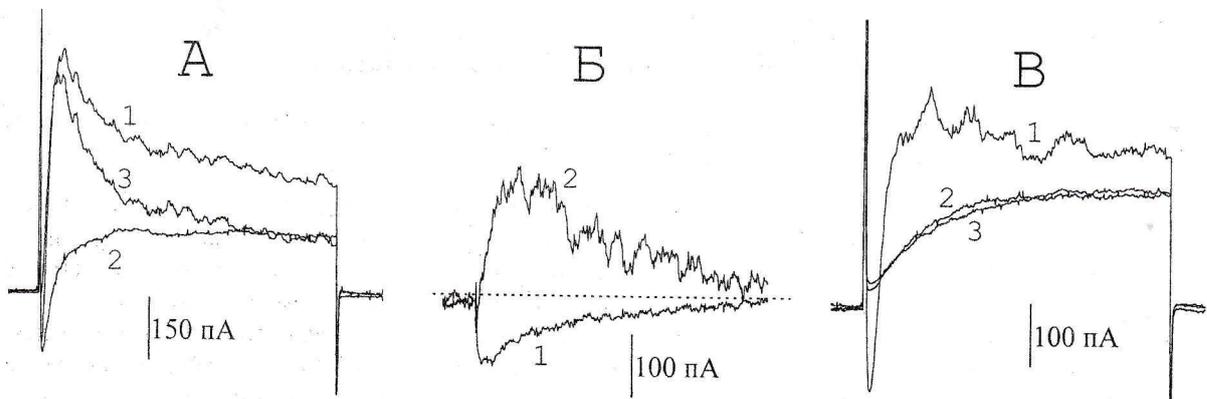


Рис. 4. Фармако-биофизические характеристики тока, переносимого  $K(Ca)$  каналами большой проводимости. А. Действие харибдотоксина ( $100$  нМ) на трансмембранный ионный ток: 1 - контроль; 2 - после добавления токсина; 3 - "чистый"  $K(Ca)$  ток. Б. Кинетические характеристики  $Ca^{2+}$  (1) и  $K(Ca)$  (2) токов; В. Отсутствие действия харибдотоксина при блокировании входящего  $Ca^{2+}$  тока ионами  $Co^{2+}$ : 1 - контроль; 2 - после эквимольной замены  $Ca^{2+}$  на  $Co^{2+}$ ; 3 - добавление харибдотоксина на фоне кобальтсодержащего раствора. Токи вызывались ступенчатым смещением мембранного потенциала от  $-60$  мВ до  $+10$  мВ (А и В) или до  $0$  мВ (Б). Длительность деполяризующего импульса во всех случаях составляла  $300$  мс.

## Кальцийзависимые калиевые каналы большой проводимости...

2) практически полностью совпадает с кинетикой инактивации входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока (трек 1).

Низкие концентрации ТЭА (до 1 мМ) вызывают блокирование тока, переносимого  $\text{K}(\text{Ca})$  каналами большой проводимости, сравнимое с действием харибдотоксина [20].

Ранее было показано [3, 16, 19], что амплитуда выходящего  $\text{K}^+$  тока сильно зависит от количества  $\text{Ca}^{2+}$ , входящего в клетку через потенциалактивируемые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы во время деполяризующего смещения мембранного потенциала. Блокирование этих каналов приводит к значительному подавлению выходящего тока. На рис. 4, В показано отсутствие блокирующего действия харибдотоксина на фоне кобальтсодержащего раствора, в котором ионы  $\text{Ca}^{2+}$  эквивалентно были заменены ионами  $\text{Co}^{2+}$ .

Исходя из полученных результатов можно сделать предположение, что для активирования харибдотоксинчувствительных  $\text{K}(\text{Ca})$  каналов большой проводимости обязательно необходим вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку извне через  $\text{Ca}^{2+}$  каналы. Однако, было обнаружено, что  $\text{Ca}^{2+}$ , спонтанно высвобождающийся из  $\text{CP}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  спарки) [30, 31], также может вызывать активацию этих  $\text{K}(\text{Ca})$  каналов, но последние в этом случае проявляют свою активность в виде спонтанных выходящих токов (СВТ) [20, 31, 32].  $\text{Ca}^{2+}$  спарки приводят к локальному повышению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , что в свою очередь приводит к активации небольшого числа (10 - 100 [29, 32])  $\text{K}(\text{Ca})$  каналов, которые и активируют генерацию СВТ. Только существенный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{CP}$  (вызванный, например, кофеином) может привести к активации большого числа  $\text{K}(\text{Ca})$  каналов большой проводимости и вызвать выходящий макроток [33]. Однако, в реальных условиях, такое массовое истощение  $\text{Ca}^{2+}$  депо представляется маловероятным.

### ВЫВОДЫ

Исходя из представленных выше данных, можно сделать заключение, что в мембране ГМК *taenia coli* морской свинки имеется высокая плотность харибдотоксинчувствительных  $\text{K}(\text{Ca})$  каналов большой проводимости ( $125 \pm 24$  пС при  $[\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_o = 23$ ). В отличие от других потенциалактивируемых каналов,  $\text{K}(\text{Ca})$  каналы большой проводимости не имеют потенциалзависимой инактивации (не инактивируются с течением времени при постоянном потенциале), а инактивируются только при уменьшении примембранной  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Основным источником  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимым для активации этих каналов является вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку через потенциалзависимые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы L-типа.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.В. Жолос, В.А. Бурый, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 3, № 8: 804-815, (1986).
2. V.A. Buryi, M.F. Shuba, A.V. Zholos // "Receptors and Ion Channels", W. Gruyter et al., Berlin (1987): 179-185
3. Y. Yamamoto, S.L. Hu, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 93, № 3, 551-564, (1989).
4. H. Kolb // Rev. Physiol. Biochem. and Pharmacol., 115: 52-91, (1990).
5. S.H.P. Alexander, J.A. Peters // "TiPS Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement", (1997): 1-84.
6. T. Tomita // J. Physiol., 225: 693-703, (1972).
7. И.А. Владимиров // Физиол. журнал, 33, № 5: 624-627, (1975).
8. C. Miller, E. Moczydlowski, R. Latorre, M. Phillips // Nature, 313: 316-318, (1985).
9. H. Meves // "Handbook of Experimental Pharmacology", H. Herken and F. Hucho, Berlin, (1992): 739-774.
10. M.L. Garcia, H.-G. Knaus, P. Munujos, et al. // Am. J. Physiol., 269 (Cell Physiol. 38): C1-C10, (1995).
11. M. Hugues, H. Schmid, G. Romey, et al. // EMBO J., 1: 1039-1042, (1982).
12. A.L. Blatz, K.L. Magleby // Nature, 323: 718-720, (1986).
13. T. Capiod, D.C. Ogden // J. Physiol., 409: 285-295, (1989).
14. J.J. Singer, J.V. Walsh // Pflug. Arch., 408: 98-111, (1987).
15. T. Tomita // Jpn. J. Physiol., 38: 1-18, (1988).
16. W.C. Cole, K.M. Sanders // Am. J. Physiol., 26, № 3: C461-C469, (1989).
17. S.L. Hu, Y. Yamamoto, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 94, № 5: 833-847, (1989).
18. S.L. Hu, Y. Yamamoto, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 94, № 5: 849-862, (1989).
19. А.В. Повстан, А.В. Зима, В.Л. Резников и др. // Нейрофизиология, 29, № 4/5: 340-350, (1997).
20. А.В. Повстан, А.В. Зима, М.И. Хархун, М.Ф. Шуба // Нейрофизиология, 31, № 6, (1999).
21. O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al. // Pflug. Arch., 391, № 1: 85-100, (1981).
22. A. Marty // Nature, 291: 497-500, (1981).
23. А.В. Зима, А.Э. Белевич, Я.Д. Цицора, М.Ф. Шуба // Физика живого, 4, № 1: 67-72, (1996).
24. J.N. Barrett, K.L. Magleby, B.S. Pallotta // J. Physiol., 331: 211-230, (1982).
25. A. Marty, E. Neher // J. Physiol., 367: 117-141, (1985).
26. Y. Yamamoto, S.L. Hu, C.Y. Kao // Gen. J. Physiol., 93, № 3: 521-550, (1989).
27. А.В. Зима, А.Э. Белевич, А.М. Цугорка, М.Ф. Шуба // Нейрофизиология, 26, № 3: 218-222, (1994).
28. В.В. Рекалов, А.М. Цугорка // Биол. мембраны, 6, № 1: 59-66, (1989).
29. В.А. Бурый, Д.В. Гордиенко, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 9, № 2: 595-601, (1992).
30. M.T. Nelson, H. Cheng, M. Rubart, et al. // Science 270 (5236): 633-637, (1995).
31. D.V. Gordienko, T.B. Bolton, M.B. Cannell // J. Physiol., 507: 707-720, (1998).
32. C.D. Benham, T.B. Bolton // J. Physiol., 381: 385-406, (1986).
33. Д.В. Гордиенко, В.А. Бурый, М.Ф. Шуба // Биол. мембраны, 12 № 2: 129-137, (1995)