

Влияние внеклеточной концентрации ионов калия на кинетику калиевых токов клеток РС-12

Г.А.Абгарян, В.В.Кучер, В.Б.Аракелян, К.Э.Косемян, А.В.Аракелян, Л.Р.Григорян

*Ереванский государственный медицинский университет им.М.Гераци
Институт физиологии им.О.О.Богомольца, Киев*

Ереванский государственный университет

375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: ионные каналы, кинетика ионных токов, активация и инактивация

Исследованию ионной проводимости возбудимых мембран посвящено огромное число работ. Несмотря на значительные успехи в этой области, молекулярный механизм проводимости ионных каналов окончательно не выяснен. В особенности это относится к природе воротных токов [7]. Известно, что открывание и закрывание ионных каналов в возбудимых мембранах связано с перемещением заряженных воротных частиц под действием электрического поля. Особый интерес представляют работы, в которых, помимо потенциала, обнаружено и влияние других физических факторов на воротный процесс. Можно надеяться, что этот сложный процесс может быть понят в результате анализа и сопоставления различных по своей природе причин действия на воротные частицы. В этой связи исследование влияния градиента осмотического давления на кинетику ионных токов представляет определенный интерес, поскольку осмотический поток воды модифицирует свойства натриевых и калиевых каналов, и таким образом появляется возможность варьированием величины водного потока получить дополнительную информацию о механизме функционирования ионных каналов [3,8]. В работах [5,6] показано, что водный поток действует на воротное устройство натриевого канала. В работе [2] исследовано влияние внеклеточного верапамила на кинетику инактивации калиевых каналов в нейроне *Helix*. Установлено, что верапамил эффективно ускорял процесс инактивации, причем увеличение скорости инактивации не зависит от того, в каком состоянии находятся калиевые каналы – проводящем или непроводящем. В качестве фактора, влияющего на воротный процесс калиевых каналов, используют внеклеточный калий, в частности показано, что внеклеточный калий немонотонным образом влияет на кинетику калиевых каналов [1,4]. В данной работе исследовано влияние внеклеточной концентрации ионов калия на кинетику калиевого тока через клетки РС-12.

Материал и методы

В работе была использована линия клеток феохромоцитомы крысы РС-12, которая является клеточной линией нейронного происхождения. Эта нейросекреторная линия представляет собой трансформированные хромоаффинные клетки, полученные из мозгового слоя коры надпочечников крысы [9]. РС-12 является удобной моделью для изучения процессов, протекающих в нервных тканях, поскольку они могут неограниченно делиться *in vitro*, дифференцироваться под действием определенных факторов и приобретать некоторые свойства, присущие зрелому симпатическому нейрону [9]. Потенциалзависимая калиевая проводимость клеток РС-12 является доминирующей, что позволяет использовать их в качестве адекватной модели для исследования потенциалзависимости и кинетических характеристик калиевых токов.

Калиевые токи были получены фиксацией потенциала на целой клетке методом «patch-clamp». Метод позволяет непосредственно регистрировать ионные токи, которые протекают через мембрану при заданном уровне мембранного потенциала. Сущность метода состоит в том, что мембранный потенциал почти мгновенно смещают до некоторого нового значения и поддерживают его на этом уровне при помощи электронной схемы с обратной связью (рис. 1).

Ток, протекающий через мембрану, измеряют отдельным усилителем. Метод позволяет контролировать мембранный потенциал, осуществлять «прямоугольное» изменение мембранного потенциала с одновременной непосредственной регистрацией электрического тока, текущего через мембрану. Зарегистрированный ток может быть разделен на отдельные ионные компоненты, которые дают непосредственно информацию об активности ионных каналов. Количественное описание кинетики активации интегрального калиевого тока клеток РС-12 можно

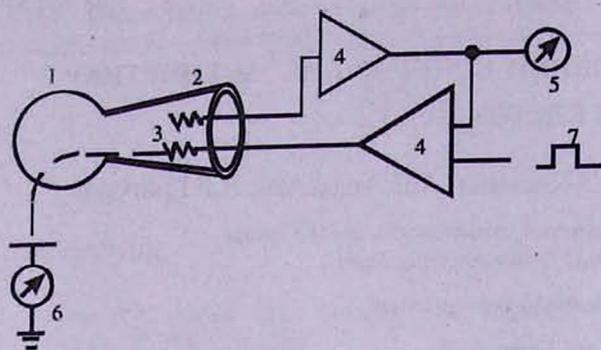


Рис.1. Схема фиксации потенциала на целой клетке методом «patch-clamp».

1 - клетка; 2 - микропипетка; 3 - электроды; 4 - усилители; 5 - вольтметр; 6 - амперметр; 7 - источник напряжения

представить уравнением:

$$I_K = g_{K \max} \cdot \left(1 - \exp\left\{-\frac{t}{\tau_{aK}}\right\}\right)^4 \cdot (U - U_K), \quad (1)$$

где I_K - плотность калиевого тока; $g_{K \max}$ - средняя максимальная удельная проводимость калиевых каналов; t - время; τ_{aK} - постоянная времени активации интегрального тока; U - мембранный потенциал; U_K - равновесный потенциал для K^+ , рассчитанный по уравнениям Нернста, исходя из концентраций K^+ во внеклеточном и внутрипипеточном растворах.

Инактивацию интегрального калиевого тока можно представить как сумму неинактивирующегося и инактивирующегося тока с одноэкспоненциальной инактивацией:

$$I_K = \left[g_{K \max 1} + g_{K \max 2} \cdot \exp\left\{-\frac{t}{\tau_{iK}}\right\} \right] \cdot (U - U_K), \quad 2$$

где I_K - плотность калиевого тока; $g_{K \max 1}$ - средняя

максимальная удельная проводимость неинактивирующихся калиевых каналов; $g_{K \max 2}$ - средняя максимальная удельная проводимость инактивирующихся калиевых каналов; τ_{iK} - постоянная времени инактивации интегрального тока.

При определенных значениях $g_{K \max}$, $g_{K \max 1}$, $g_{K \max 2}$ кинетические постоянные времени τ_{aK} , τ_{iK} подбирали таким образом, чтобы среднеквадратичная разница между экспериментальными точками на соответствующем интервале и значениями, полученными из уравнений (1) и (2), была наименьшей. Калиевые токи через клетки PC-12 измеряли при внеклеточной концентрации ионов калия в 5, 10, 15 и 20 мМ.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены конкретные кривые изменения кинетики калиевого тока в контроле (рис.2 А) и при значении внеклеточной концентрации ионов калия в 20 мМ (рис.2 Б) при различных значениях мембранного потенциала. Нами были получены ана-

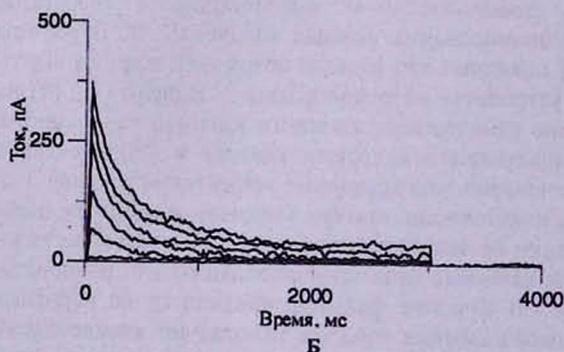
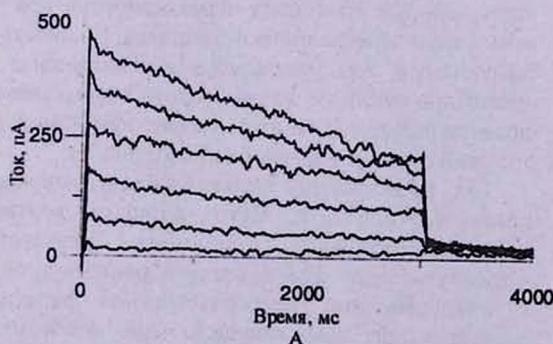
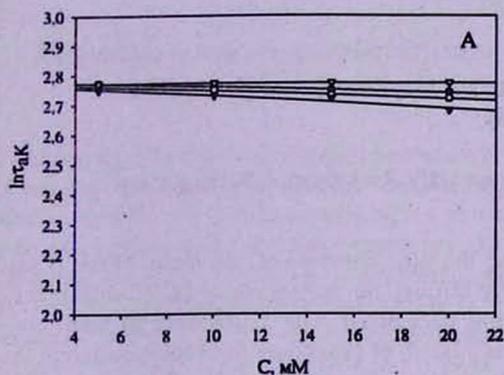


Рис.2. Группа интегральных калиевых токов клеток PC-12 при изменении мембранного потенциала от его начального значения (-80 мВ) до фиксированного потенциала в интервале от -10 (верхняя кривая) до +40 мВ с шагом 10 мВ и длительностью 1 с.

А - контроль;

Б - внеклеточная концентрация ионов калия равна 20 мМ.

логичные кривые для других значений внеклеточной концентрации ионов калия (5, 10 и 15 мМ). Сопоставив экспериментальные кривые из рис.2 с теоретическими зависимостями (1) и (2), можно определить постоянные времени активации и инактивации при заданном значении внеклеточной концентрации ионов калия. Эксперименты показали, что постоянная времени активации с увеличением концентрации ионов калия во внеклеточном растворе почти не изменяется. Напротив, постоянная времени инактивации заметно зависит как от концентрации калия во внеклеточном растворе, так и от потенциала на мембране.



- Мембранный потенциал равен 10 мВ
- Мембранный потенциал равен 20 мВ
- ▽ Мембранный потенциал равен 30 мВ
- ▽ Мембранный потенциал равен 40 мВ

При исследовании механизма активации и инактивации проводимости канала важным является этап выяснения вида функциональной зависимости постоянной времени активации и постоянной времени инактивации от концентрации ионов калия во внеклеточном растворе. С этой целью экспериментально полученные постоянные времени активации и инактивации были представлены в логарифмических координатах – зависимость логарифма постоянной времени активации (инактивации) от концентрации внеклеточного калия – рис.3, из которого видно, что постоянная времени активации примерно на два порядка меньше

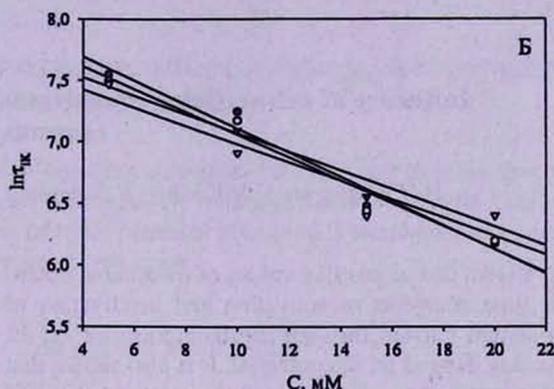


Рис.3. Зависимость логарифма постоянной времени активации (А) и инактивации (Б) от внеклеточной концентрации ионов калия при различных значениях мембранного потенциала. τ_{iK} и τ_{aK} выражены в мс, а прямые через точки проведены методом наименьших квадратов.

постоянной времени инактивации, т.е. активация является быстрым процессом. Из рис.3.(А) видно также, что в области положительных значений мембранного потенциала (от 10 до 40 мВ) постоянная времени активации практически не зависит от концентрации ионов калия во внеклеточном растворе. Следовательно, можно написать:

$$\tau_{aK} = \tau_{a0} \quad (3)$$

Зависимость же логарифма постоянной времени инактивации линейно уменьшается с увеличением концентрации ионов калия во внеклеточном растворе (рис.3.(Б)). Причем эта зависимость практически одна и та же для потенциалов 10, 20, 30 и 40 мВ.

$$\tau_{iK} = \tau_{i0} \exp(-\gamma C) \quad (4)$$

где τ_{i0} слабо зависит от C

Из рис.3 (А, Б) видно, что при положительных зна-

чениях потенциала на мембране постоянные времени активации и инактивации слабо зависят от потенциала.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об экспоненциальной зависимости постоянной времени инактивации от концентрации ионов калия во внеклеточном растворе. Это обстоятельство может свидетельствовать об активационном механизме влияния концентрации ионов калия во внеклеточном растворе на процесс инактивации калиевой проводимости клеток РС-12.

Таким образом, показано, что с увеличением концентрации ионов калия во внеклеточном растворе процесс инактивации ускоряется и слабо зависит от мембранного потенциала. Зависимость постоянной времени активации от концентрации ионов калия во внеклеточном растворе незначительна. Основываясь на этом, можно считать, что изменение концентрации калия влияет на механизмы инактивации, а незначительное изменение кинетики активации может являться проявлением связи между механизмами активации и инактивации.

Поступила 23.10.03

Կալիումի իոնների արտաբջջային կոնցենտրացիայի ազդեցությունը PC-12 բջիջների կալիումային հոսանքների կինետիկայի վրա

Ն.Ն.Աբգարյան, Վ.Վ.Կուչեր, Վ.Բ.Արակելյան, Կ.Է.Կոսեմյան, Լ.Վ.Արակելյան, Լ.Ռ.Գրիգորյան

Ցույց է տրված, որ թաղանթի վրա պոտենցիալի դրական արժեքների դեպքում PC-12 բջիջների թաղանթներով անցնող կալիումային հոսանքի ակտիվացման և ինակտիվացման հաստատունները թույլ են կախված պոտենցիալից: Հաստատված է նաև, որ կալիումի իոնների արտաբջջային կոնցենտրացիայի

մեծացմանը զուգընթաց կտրուկ նվազում է ինակտիվացման ժամանակի հաստատունը, իսկ ակտիվացման ժամանակի հաստատունը գործնականում չի փոփոխվում: Ինակտիվացման ժամանակի հաստատունի կախվածությունը կալիումի իոնների արտաբջջային կոնցենտրացիայից ունի էքսպոնենցիալ տեսք:

Influence of extracellular concentration of potassium on the kinetics of potassium currents in PC-12 cells

N.N.Abgaryan, V.V.Kucher, V.B.Arakelyan, K.E.Kosemyan, H.V.Arakelyan, L.R.Grigoryan

It is shown that at positive values of membrane potential the time constants of activation and inactivation of the potassium current through the membrane of PC-12 cells weakly depend on the potential. It is also shown that with the increase in the extracellular concentration of potassium ions the time constant of inactivation falls

sharply and the time constant of activation of the potassium current through the membrane of PC-12 cells practically remains unchanged. The dependence of time constant of inactivation of potassium ion concentration in the extracellular solution has an exponential form.

Լիտերատուրա

1. *Աբգարյան Գ.Ա.* Исследование нелинейных фото- и электроиндуцированных явлений в сложных неметаллических соединениях и микрогетерогенных структурах биологической природы. Док. дисс. Ереван, 1998.
2. *Կոստյուկ Ս.Գ., Կրիշտալ Ե.Օ.* Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. М., 1981.
3. *Կրիշտալ Ե.Օ., Օսիպչուկ Ե.Վ., Սիմոնիչ Ե.Վ.* ДАН СССР, 1981, т. 259, 5, с. 1253.
4. *Լոպատին Ա.Ն., Կոնդրատև Ս.Է., Լոգինով Ե.Վ., Միշոնիկ Ե.Ի.* Биологические мембраны, 1988, т. 5, 7, с.711.
5. *Չիշմաև Ի.Վ., Տորոկինա Զ.Ա.* ДАН СССР, 1987, т. 292, 4, с. 989.
6. *Չիշմաև Ի.Վ., Տորոկինա Զ.Ա.* Нейрофизиология, 1986, т. 18, 4, с. 518.
7. *Արմսթրոնգ Ս.Մ., Բեզանիլա Բ.* Nature, 1973, 242, p.459.
8. *Տուլեյմանյան Մ.Ա., Այրապետյան Տ.Ն., Արակելյան Վ.Վ., Այրապետյան Վ.Կ.* Cell. and Mol. Neurobiology, 1993, 13, 2, p.183.
9. *Գրին Լ.Ա., Թիշլեր Ա.Տ.* Adv. Cell. Neurobiol, 1982, 3, p. 373.