

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

МАНЬКО

Володимир Васильович

УДК 612.014.42:612.31

**ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУМІВ ПОТЕНЦІАЛОЗАЛЕЖНИХ КАЛЬЦІЄВИХ
КАНАЛІВ МЕМБРАНИ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН**

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Автореферат

на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Манько

Київ - 1995



00779133 (U)

AB 32.506

Дисертацією є рукопис

робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин
Львівського державного університету ім. Івана Франка

Науковий керівник:

доктор біологічних наук

М. Ю. Клевець

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

В. К. Рибальченко

доктор медичних наук, професор

Д. Г. Наливайко

Провідна установа -

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Захист дисертації відбудеться "5" Листопада 1995 р.

о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради

Д.01.01.10 при Київському університеті ім. Тараса Шевченка

Адреса: 252022, Київ-22, вул. Глушкова, 2

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотечі Київського
університету ім. Тараса Шевченка, м. Київ, вул. Володимирська-
ка, 60

Автореферат розісланий "30" Травня 1995 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Гушнік к.б.н. Г. П. Гушнінець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Дослідження ролі Ca^{2+} як вторинного посередника у нейро-гуморальній регуляції секреторного процесу є актуальною проблемою сучасної фізіології. На сьогодні відомо, що іони Ca^{2+} беруть участь у активації секреції клітинами травних залоз. Причому, в спряженні стимул-секреція бере участь як внутрішньоклітинний, так і зовнішньоклітинний Ca^{2+} (Hokin, 1966; Schulz, 1975; Petersen, Ueda, 1976; Kanno, Nishimura, 1976; Yoshida, Kanno, 1987; Гриньків, Клевец, Шостаковская, 1988; Дубицький, Шостаковська, 1992; Шевчук, Магура, 1992). Проте питання про шляхи проникнення іонів Ca^{2+} з міжклітинного середовища через плазматичну мембрану залишається невирішеним.

Магура і співавт. (1987) вважають, що збудники секреції викликають активацію хемочутливих кальцієвих каналів секреторних клітин шлунку ссавців. Згідно даних інших дослідників (Maquama, Petersen, 1983; Наливайко, Чепилко, 1988) важливе значення у проникненні Ca^{2+} в ацинарні клітини підшлункової залози мають малоселективні Са-провідні канали для моновалентних катіонів. На підставі пригнічення секреції амілази клітинами диспергованих ацинусів підшлункової залози верапамідом і Mn^{2+} і стимуляції її гіперкалієвою деполяризацією постулюється наявність потенціалозалежних кальцієвих каналів у мембрані цих клітин (Гриньків, Клевец, Шостаковская, 1988). Вільш вагомі докази цього отримано на основі дослідження змін $(\text{Ca}^{2+})_i$ під впливом гіперкалієвої деполяризації, які реєстрували за допомогою екворину (Perashadsingh et al., 1989). Але поки що тільки через мембрану клітин слинної залози личинки хірономуса зареєстровано струм потенціалозалежних кальцієвих каналів (Клевец, Гураль, 1989), дослідження

характеристики якого і присвячена дана робота.

Мета і завдання досліджень. Мета роботи полягала в комплексному дослідженні струмів потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L., на підставі чого можна в'ясувати властивості і структурно-функціональну організацію цих каналів. Для досягнення мети необхідно було: 1) встановити умови оптимальної реєстрації струмів через інтактні кальцієві канали; 2) в'ясувати потенціалозалежність, фармакологічну чутливість, залежність від рівня внутрішньоклітинного метаболізму, pH і температури середовища амплітуди струмів, кінетичні параметри їх інактивації та селективні властивості інтактних каналів; 3) в'ясувати здатність кальцієвих каналів модифікуватися у безкальцієвому середовищі під впливом Са-зв'язуючих речовин та селективність модифікованих каналів; 4) дослідити залежність амплітуди струмів через досліджувані канали від натрієвого градієнту.

Наукова новизна отриманих даних. Методом фіксації потенціалу на мембрані вперше проведено всебічне дослідження струму потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин, в результаті чого отримано такі нові факти: 1) функціональний стан даних кальцієвих каналів контролюється аденілатциклазною системою; 2) інтактні кальцієві канали цих клітин пропускають крім Ca^{2+} деякі інші двовалентні катіони (Ba^{2+} і Sr^{2+}) і блокуються La^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} та Zn^{2+} ; 3) дані канали практично непроникні для одновалентних катіонів; у безкальцієвому середовищі із додаванням різних Са-зв'язуючих речовин вони стають проникними для одновалентних катіонів, при цьому зберігається їх метаболічна залежність; 4) кінетика інактивації інтегральних струмів через

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Дослідження ролі Ca^{2+} як вторинного посередника у нейро-гуморальній регуляції секреторного процесу є актуальною проблемою сучасної фізіології. На сьогодні відомо, що іони Ca^{2+} беруть участь у активації секреції клітинами травних залоз. Причому, в спряженні стимул-секреція бере участь як внутрішньоклітинний, так і зовнішньоклітинний Ca^{2+} (Hokin, 1966; Schulz, 1975; Petersen, Ueda, 1976; Kanno, Nishimura, 1976; Yoshida, Kanno, 1987; Гриньків, Клевец, Шостаковская, 1988; Дубицький, Шостаковська, 1992; Шевчук, Магура, 1992). Проте питання про шляхи проникнення іонів Ca^{2+} з міжклітинного середовища через плазматичну мембрану залишається невирішеним.

Магура і співороб. (1987) вважають, що збудники секреції викликають активацію хемочутливих кальцієвих каналів секреторних клітин шлунку ссавців. Згідно даних інших дослідників (Maquyama, Petersen, 1983; Наливайко, Чепилко, 1988) важливе значення у проникненні Ca^{2+} в ацинарні клітини підшлункової залози мають малоселективні Са-провідні канали для моновалентних катіонів. На підставі пригнічення секреції амілази клітинами диспергованих ацинусів підшлункової залози вераламілом і Mn^{2+} і стимуляції її гіперкалієвою деполяризацією постулюється наявність потенціалозалежних кальцієвих каналів у мембрані цих клітин (Гриньків, Клевец, Шостаковская, 1988). Більш вагомі докази цього отримано на основі дослідження змін $[\text{Ca}^{2+}]_i$ під впливом гіперкалієвої деполяризації, які реєстрували за допомогою екворину (Pershadsingh et al., 1989). Але поки що тільки через мембрану клітин слинної залози личинки хірономуса зареєстровано струм потенціалозалежних кальцієвих каналів (Клевец, Гураль, 1989), дослідження

характеристики якого і присвячена дана робота.

Мета і завдання досліджень. Мета роботи полягала в комплексному дослідженні струмів потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L., на підставі чого можна в'ясувати властивості і структурно-функціональну організацію цих каналів. Для досягнення мети необхідно було: 1) встановити умови оптимальної реєстрації струмів через інтактні кальцієві канали; 2) в'ясувати потенціалозалежність, фармакологічну чутливість, залежність від рівня внутрішньоклітинного метаболізму, pH і температури середовища амплітуди струмів, кінетичні параметри їх інактивації та селективні властивості інтактних каналів; 3) вияснити здатність кальцієвих каналів модифікуватися у безкальцієвому середовищі під впливом Са-в'язуючих речовин та селективність модифікованих каналів; 4) дослідити залежність амплітуди струмів через досліджувані канали від натрієвого градієнту.

Наукова новизна отриманих даних. Методом фіксації потенціалу на мембрані вперше проведено всебічне дослідження струму потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин, в результаті чого отримано такі нові факти: 1) функціональний стан даних кальцієвих каналів контролюється аденілатцикласною системою; 2) інтактні кальцієві канали цих клітин пропускають крім Ca^{2+} деякі інші двовалентні катіони (Ba^{2+} і Sr^{2+}) і блокуються La^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} та Zn^{2+} ; 3) дані канали практично непроникні для одновалентних катіонів; у безкальцієвому середовищі із додаванням різних Са-в'язуючих речовин вони стають проникними для одновалентних катіонів, при цьому зберігається їх метаболічна залежність; 4) кінетика інактивації інтегральних струмів через

інтактні кальцієві канали секреторних клітин є струмовалежною і майже не залежить від типу проникаючого катіона; інактивація ЕДТА-індукованого натрієвого струму зберігається, хоча дещо і сповільнюється; 5) амплітуда струмів через кальцієві канали залежить від наявності натрієвого градієнту, що свідчить про функціональний зв'язок каналів і Na-Ca-обмінного механізму.

На основі результатів власних досліджень і даних літератури запропоновано модель структурно-функціональної організації потенціаловалежного кальцієвого каналу мембрани секреторних клітин слинної залози личинки хірономуса та його зв'язку з Na-Ca-обмінником. Крім того, теоретично обгрунтовано можливість реєстрації струму Na-Ca-обміну мембрани секреторних клітин у відповідь на гіперполяризацію мембрани і експериментально його зареєстровано.

Науково-практична цінність роботи. Отримані дані значно розширюють уявлення про властивості і структурно-функціональну організацію потенціаловалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин, залежність їх функціонування від клітинного метаболізму і Na-Ca-обміну. Це може стати теоретичним обгрунтуванням медико-клінічних досліджень з метою розробки методів корекції секреції травних ферментів.

Апробація роботи. На основі матеріалів дисертації були зроблені доповіді: на II з'їзді фізіологів Західного регіону України (1993 р., Львів); на 1-му з'їзді Українського біофізичного товариства (1994 р., Київ), на XIV з'їзді Українського фізіологічного товариства (1994 р., Львів-Київ), на щорічних наукових конференціях Львівського університету (1993-1995 рр., Львів), на засіданні кафедри фізіології людини і тварин Львівського університету в листопаді 1994 р.

Матеріали дисертації висвітлені у 6 публікаціях.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису об'єкта і методів досліджень, викладення отриманих результатів та їх обговорення, висновків і списку літератури (256 назв). Робота викладена на 184 сторінках, містить 8 таблиць та ілюстрована 21 малюнком.

Декларація особистого внеску дисертанта. Робота виконана дисертантом повністю і самостійно.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проведені на ізольованих за допомогою мініатюрних ріжучих інструментів клітинах слинної залози личинки хірономуса в використанні методу фіксації потенціалу в умовах внутрішньоклітинної перфузії. Розчин для внутрішньоклітинної перфузії був такого складу (ммоль/л): тріс-Cl - 146,14, NaCl - 16, АТФ - 1,0, MgCl₂ - 2,0, ЕРТА - 0,1, глюкоза 5,55; pH 7,0. Вихідний зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl - 136,9, KCl - 5,55, CaCl₂ - 1,76, MgSO₄ - 0,49, MgCl₂ - 0,46, Na₂HPO₄ - 0,35, KH₂PO₄ - 0,44, глюкоза 5,55; pH 7,2. В ході досліджень використовували різні модифікації цих розчинів. МП контролювали за допомогою універсального вольтметра В7-16. Для деполяризаційних зміщень МП використовували прямокутні імпульси тривалістю 1,5 - 3,5 с. Струми, що виникали у відповідь на деполяризацію або гіперполяризацію мембрани, підсилювали за допомогою підсилювача УВН2-03 і подавали на вхід цифрово-аналогового перетворювача електрокардіометра ЕКМ-01, яким і вимірювали їх амплітудні і часові параметри. Результати досліджень опрацьовували за загальновианианими статистичними методиками. Для розрахунків використовували програми для персональних комп'ютерів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

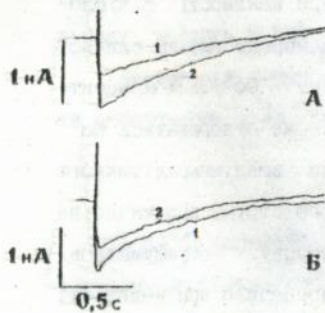
1. Характеристика інтегрального потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин

Перші вимірювання I_{Ca} (Клевец, Гураль, 1989) провадились при наявності тільки кальцієвого градієнту. В результаті наших досліджень з'ясувалось, що при наявності фізіологічних концентрацій Na^+ і Ca^{2+} через мембрану клітин слинної залози реєструється значно більший струм. Оскільки концентрація Cl^- є зрівноваженою, цей струм може створюватись Ca^{2+} або Na^+ . Внаслідок еквімолярної заміни зовнішньоклітинного Na^+ на холін⁺ амплітуда зареєстрованого струму практично не змінювалась, а внаслідок заміни на сахарозу - зменшувалась. Тому усі наступні дослідження ми провадили при наявності натрієвого градієнту або при заміні $NaCl$ на холін- Cl .

В ході досліджень з'ясувалось, що амплітуда I_{Ca} клітин верхньої і нижньої долей залози є різною. Густина струму клітин верхньої долі більша і становить $1,17 \pm 0,12 \times 10^{-6}$ А/см², а клітин нижньої долі - $0,88 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ А/см². Отже, амплітуда I_{Ca} клітин верхньої долі залози є більша, що може бути зумовлено або більшою густиною кальцієвих каналів, або ж вищою їх провідністю.

У зв'язку з виявленими відмінностями ми провели дослідження ВАХ I_{Ca} клітин обидвох долей залози. Виявилось, що порogi активації I_{Ca} клітин нижньої і верхньої долей залози лежать негативніше -60 мВ. Збільшення амплітуди I_{Ca} клітин верхньої долі внаслідок подальшої деполяризації мембрани є значнішим, ніж клітин нижньої долі залози, і максимального значення він досягає при ТП -20 мВ ($0,78 \pm 0,08$ нА), після чого зменшується. У той же час амплітуда I_{Ca} клітин нижньої долі залози стає максимальною при ТП -10 мВ ($0,63 \pm 0,03$ нА),

після чого тех зменшується. Отже, максимум I_{Ca} клітин верхньої долі зміщений відносно максимуму I_{Ca} клітин нижньої долі залози на 10 мВ у негативний бік.



Мал. 1. Зміна амплітуди I_{Ca} клітин нижньої (А) і верхньої (Б) долей залози під впливом введення в клітину 2АМФ, АТФ і Mg^{2+} . 1 - I_{Ca} у контролі; 2 - I_{Ca} після додавання до внутрішнього розчину суміші 2АМФ, АТФ і Mg^{2+} . ФП - -60 мВ, ПП - -10 мВ.

Кальцієві канали клітин верхньої і нижньої долей залози відрізняються і метаболічною залежністю (мал. 1). Внаслідок додавання до внутрішнього розчину необхідної для запуску і підтримання 2АМФ-залежного фосфорилування регуляторних доменів каналів суміші (2АМФ - 10^{-4} моль/л, АТФ - 2 ммоль/л, Mg^{2+} - 3 ммоль/л) на клітинах нижньої долі слинної залози спостерігалось збільшення I_{Ca} на $84,28 \pm 24,89$ %. Контрольне введення у клітинний перфузат тільки 2АМФ викликало незначне зростання I_{Ca} на $21,36 \pm 8,97$ %. Отже, кальцієві канали клітин нижньої долі залози мають виражену метаболічну залежність.

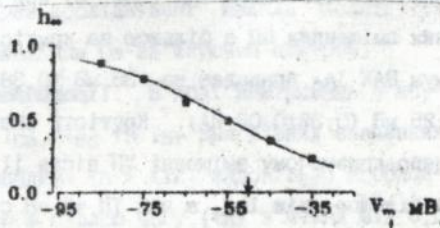
При введенні цієї ж суміші у клітини верхньої долі залози спостерігається зменшення амплітуди I_{Ca} на $16,51 \pm 2,62$ %. Контрольне введення тільки 2АМФ призвело до зменшення струму на $10,04 \pm 2,23$ %.

Наступні дослідження ми провели на клітинах нижньої долі залози, оскільки кальцієві канали цих клітин мають вира-

жену метаболічну залежність. Амплітуда I_{Ca} цих каналів (ТП -10 мВ) зменшувалася внаслідок дії на зовнішню поверхню мембрани 10^{-4} моль/л верапамілу на $53,80 \pm 6,14$ %, а 10^{-6} моль/л нітрендипіну - на $33,05 \pm 4,81$ %. Отже, кальцієві канали досліджуваних клітин є помірно чутливими до органічних блокаторів кальцієвих каналів L-типу збудливих мембран. Помірне зменшення амплітуди I_{Ca} ми отримали і при додаванні до зовнішнього розчину у концентрації 5 ммоль/л полівалентних катіонів. При додаванні La^{3+} амплітуда I_{Ca} при ТП -10 мВ зменшувалась на $53,28 \pm 5,41$ %, Ni^{2+} - на $49,56 \pm 5,42$ %, Cd^{2+} - на $47,63 \pm 5,03$ %, Zn^{2+} - на $38,40 \pm 3,42$ %, а при додаванні Ba^{2+} - зменшення ($7,58 \pm 4,72$ %) було статистично недостовірним. При закисленні середовища до рН 4 амплітуда I_{Ca} (ТП -10 мВ) зменшувалась на $14,76 \pm 2,88$ %, що свідчить про наявність каналних фіксованих зарядів і про роль взаємодії проникаючих іонів з ними. Зниження температури на $10^{\circ}C$ викликає зменшення амплітуди I_{Ca} на $28,52 \pm 2,68$ %. Q_{10} становить $1,42 \pm 0,05$, а енергія активації - 24 кДж/моль, що свідчить про невисоку температурну залежність I_{Ca} та низький енергетичний бар'єр кальцієвих каналів цих клітин.

Крива стаціонарної інактивації (мал. 2) задовільно описується рівнянням:

$$h = (1 + \exp((V_m - V_{0.5})/k_h))^{-1}$$
 де $V_{0.5}$ - $-50,4$ мВ, а коефіцієнт крутості $k_h = 16,1$. Отже, характерною рисою I_{Ca} мембрани досліджуваних клітин є незначна кру-



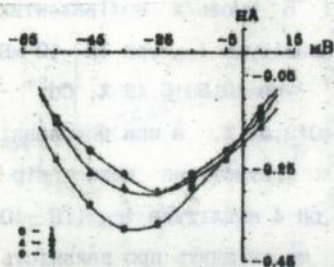
ткою рисою I_{Ca} мембрани досліджуваних клітин є незначна кру-

Мал. 2. Крива стаціонарної інактивації I_{Ca} клітин нижньої долі слинної залози. ТП - -25 мВ.

тість наростання стаціонарної інактивациі із деполяризаційним зміщенням фіксованого МП.

2. Порівняння інтегральних струмів двовалентних катіонів через потенціалоалежні кальцієві канали

При дослідженні ВАХ I_{Ba} і I_{Sr} через кальцієві канали мембрани клітин нижньої доли залози замінювали фізіологічну



Мал. 3. Порівняння ВАХ I_{Ba} (1), I_{Sr} (2) та I_{Ca} (3) клітин нижньої доли залози. Концентрація проникаючого іона 1,76 ммоль/л. ФП -65 мВ.

концентрацію $CaCl_2$ у зовнішньому розчині, що не містив інших двовалентних катіонів, на еквімолярну кількість $BaCl_2$ або $SrCl_2$. З'ясувалося, що I_{Ba} є близький за амплітудно-часовими параметрами до I_{Ca} . Співвідношення I_{Ba} і I_{Ca} , що розвиваються при зміщенні МП від -65 до -55 мВ, становить $1,29 \pm 0,19$. Крутість зростання I_{Ba} (мал. 3) при подальших деполяризаційних зміщеннях МП є більшою за крутість зростання I_{Ca} . Максимум ВАХ I_{Ba} припадає на -35 мВ ($0,38 \pm 0,05$ нА), а I_{Ca} - на -25 мВ ($0,32 \pm 0,03$ нА). Крутість зменшення амплітуди I_{Ba} при деполяризуючому зміщенні МП після її максимального значення є більшою, ніж I_{Ca} , а при ТП +5 мВ середнє значення амплітуд обидвох струмів становить $0,12 \pm 0,04$ нА. Отже, ВАХ I_{Ba} цих клітин, як і збудливих клітин (Бурый, Гордиенко, Шуба, 1989), всунута в бік негативніших значень МП, що може бути

зумовлено як зміною поверхневого потенціалу внаслідок нерівнозначної заміни Ca^{2+} на Ba^{2+} , так і наявністю в мембрані каналів з різною селективністю.

Амплітудно-часові параметри I_{Sr} і I_{Ca} є теж близькими. Крутість зростання амплітуди I_{Sr} (мал. 3) внаслідок збільшення ступеня деполяризації мембрани є дещо більшою, ніж I_{Ca} . Максимуми ВАХ обидвох струмів збігаються і припадають на -25 мВ, а достовірної різниці між амплітудами I_{Ca} ($0,30 \pm 0,04$ нА) і I_{Sr} ($0,30 \pm 0,05$ нА) при цьому немає. Крутість зменшення I_{Ca} і I_{Sr} внаслідок подальших деполяризуючих зміщень МП є приблизно однаковою, хоча існує певна тенденція до перевищення амплітуди I_{Sr} . Таким чином, ВАХ I_{Sr} і I_{Ca} є близькі між собою.

Селективність. Оскільки струми реверсії через інтактні кальцієві канали не можна зареєструвати (Дорошенко и др., 1978), встановлення їх відносної проникності для Ba^{2+} і Sr^{2+} здійснювали порівнянням пікових значень амплітуд I_{Ba} і I_{Sr} та I_{Ca} при ТП, що відповідає максимумам їх ВАХ. В результаті обчислень виявилось, що співвідношення $I_{\text{Ba}} : I_{\text{Ca}}$ при максимумах ВАХ становить $1,24 \pm 0,07$, а $I_{\text{Sr}} : I_{\text{Ca}} - 1,05 \pm 0,05$. Отримані дані дозволяють стверджувати, що в основі проведення двовалентних катіонів через досліджувані канали лежить їх взаємодія з внутрішньоканальним Са-зв'язуючим центром.

Часові параметри інактивациї. В ході вимірювань в'ясувалось, що інактивация I_{Ca} , I_{Ba} та I_{Sr} при різних значеннях ТП у всіх досліджених випадках ($n > 112$) задовільно апроксимується одною експонентою з сталою часу (τ_h) в межах від 0,5 до 2 с. Виявилось також, що достовірної різниці між кінетикою інактивациї I_{Ca} і I_{Ba} чи I_{Sr} немає. Лише τ_h I_{Sr} статистично вірогідно перевищує τ_h I_{Ca} при максимумах їх ВАХ. Для

I_{Ca} аналогічної закономірності виявити не вдалось.

Встановлено також, що для I_{Ca} характерна тенденція до зростання τ_h в обидва боки від значення МП, що відповідає максимуму ВАХ. Це вказує на можливість існування зв'язку між амплітудою I_{Ca} та його інактивацією, про що свідчить і коефіцієнт кореляції між піковими значеннями амплітуди I_{Ca} і τ_h ($r = -0,67$, $n = 56$). Струмозалежність може бути зумовлена наявністю Ca-залежного механізму інактивації (Eckert, Chad, 1986). Проте цьому суперечить залежність τ_h I_{Ba} і I_{Sr} від пікових значень амплітуд цих струмів - коефіцієнти кореляції становлять відповідно $-0,68$ ($n = 24$) і $-0,63$ ($n = 32$). А для Ca-залежного механізму інактивації залежність τ_h I_{Ba} і I_{Sr} від їх амплітуди є нехарактерною (Eckert, Chad, 1986). Тобто, згідно наших даних у досліджуваних каналах немає Ca-залежного механізму інактивації, аналогічного такому, що є у кальцієвих каналах збудливих клітин.

3. Модифікація кальцієвих каналів в безкальцієвому середовищі з додаванням Ca-зв'язуючих речовин

Внаслідок проведення однофакторного дисперсійного аналізу виявилось, що амплітуда I_{Ca} статистично достовірно залежить від $[Ca^{2+}]_z$ в межах від 0,1 до 1,76 ммоль/л. При подальшому збільшенні $[Ca^{2+}]_z$ (до 5 ммоль/л) спостерігається неістотне зростання I_{Ca} , що свідчить про насичення, в основі якого лежить взаємодія Ca^{2+} з певними каналними структурами. Якщо до зовнішнього розчину не додавали Ca^{2+} і не використовували Ca-зв'язуючі речовини, то тільки у 3 клітинах з 7 вхідний струм був відсутній. Збереження вхідного струму у решти клітин можна пояснити або наявністю слідів Ca^{2+} у зовнішньому розчині, або ж появою за цих умов струму іншої іон-

ної природи.

Для перевірки останнього припущення до зовнішнього розчину без двовалентних катіонів додавали 5 ммоль/л ЕДТА. При наявності лише натрієвого градієнту реєструвався вхідний струм, який за кінетикою близький до I_{Ca} , а за амплітудою перевищував його у $2,27 \pm 0,36$ рази. При заміні у зовнішньому розчині половини Na^+ на катіони $tris^+$ амплітуда струму зменшувалась на $57,41 \pm 6,12$ %; коли повасклітинний розчин не містив Na^+ , струм був відсутній. Амплітуда цього струму зменшувалась внаслідок дії на зовнішню поверхню мембрани 10^{-4} моль/л верапамілу (на $41,39 \pm 0,35$ %) та при підвищенні $[Ca^{2+}]_s$ за допомогою Ca-EGTA-буферу. Отримані результати свідчать, що вхідний струм при використанні безкальцієвого розчину з додаванням хелатуючих речовин переноситься іонами Na^+ через модифіковані кальцієві канали.

Незначна деполяризація мембрани від ФП -80 мВ (≈ 1 мВ) супроводжується виникненням I_{Na} . I_{Ca} за таких умов ще не реєструється. Із збільшенням деполяризації I_{Na} зростає рівніше, і досягає свого максимуму в проміжку від -50 до -40 мВ, що на 10 - 15 мВ негативніше максимуму I_{Ca} . Отже, поріг активації і максимум амплітуди ЕДТА-індукованого I_{Na} досліджуваних клітин зміщений в бік негативних значень МП, правда, не так різко, як у нервових клітинах (Шуба, 1983).

В процесі модифікації кальцієвих каналів клітин нижньої долі залози зберігається їх метаболічна залежність: амплітуда індукованого I_{Na} при додаванні суміші цАМФ (10^{-4} моль/л), АТФ (2 ммоль/л) і іонів Mg^{2+} (3 ммоль/л) до внутрішнього розчину зростала на $56,13 \pm 10,20$ %. При цьому рівниці між зростанням I_{Ca} через інтактні канали і I_{Na} через модифіковані канали за критерієм Стюдента немає. А інактивується

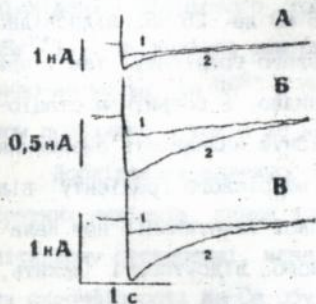
ЕДТА-індукований I_{Na} статистично достовірно повільніше, ніж I_{Ca} : при ТП -40 мВ τ_h відповідно становлять 848 і 712 мс.

При дослідженні залежності амплітуди I_K і I_{Na} від рН середовища для зв'язування Ca^{2+} використовували аніони SO_4^{2-} , константа комплексоутворення яких з Ca^{2+} не змінюється при рН > 4 (Досон и др., 1991). З'ясувалось, що при рН 4 амплітуда I_K зменшується на $12,21 \pm 1,08 \%$, I_{Na} - на $12,79 \pm 4,10 \%$. Це свідчить про збереження каналних фіксованих зарядів в процесі модифікації і про роль взаємодії проникаючих катіонів з ними.

Відносна селективність модифікованих кальцієвих каналів. Амплітуда I_K і I_{L1} через модифіковані кальцієві канали статистично достовірно є більшою, ніж I_{Na} . А амплітуда струмів, що переносяться органічними катіонами, у всіх випадках є меншою за амплітуду I_{Na} . Проте закономірності, відомої для натрієвих потенціалозалежних каналів збудливих клітин (Хилле, 1981; Шуба, 1983), виявити не вдалось. Зокрема, через модифіковані кальцієві канали найкраще з органічних катіонів проникають холін⁺ і $CH_3NH_3^+$, дещо гірше - $ONNH_3^+$, а $NH_2NH_3^+$ практично не проникає через них. Ряд селективності модифікованих кальцієвих каналів має такий вигляд: $I_K : I_{L1} : I_{Na} : I_{холін} : I_{CH_3NH_3} : I_{ONNH_3} : I_{NH_2NH_3} = 1,55 : 1,36 : 1 : 0,80 : 0,79 : 0,64 : 0,07$.

Для встановлення ступеня модифікації кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин під впливом різних Ca -зв'язуючих речовин знаходили співвідношення між амплітудами індукованого цими речовинами I_{Na} і I_{Ca} через інтактні канали при максимумі ВАХ (ТП -25 мВ). З'ясувалось, що при додаванні почергово до зовнішнього безкальцієвого розчину 1 ммоль/л ЕДТА, ЕГТА, цитрату, пірофосфату, фосфату і оксалату натрію дане

співвідношення становило відповідно $1,58 \pm 0,11$, $1,44 \pm 0,16$, $1,89 \pm 0,18$, $5,44 \pm 0,90$, $5,02 \pm 0,34$ і $3,95 \pm 0,29$. Різну ступінь модифікуючого впливу Са-зв'язуючих речовин пояснюють (Шуба, 1983) різною константою комплексоутворення: чим більша спорідненість речовини до Ca^{2+} , тим більший I_{Na} вона індукує. Отримані нами дані не зовсім узгоджуються з таким поясненням. Ми припустили, що існує зв'язок між розмірами молекул Са-зв'язуючих речовин та їх модифікуючою здатністю. Не маючи змоги оцінити розміри молекул цих речовин, ми порівнювали маси їх лігандів і кількість атомів у них. У результаті обчислень в'ясувалось, що коефіцієнт кореляції між масою ліганда і співвідношенням $I_{\text{Na}} : I_{\text{Ca}}$ становить $-0,753$, а між кількістю атомів у ліганді та його модифікуючою здатністю $-0,816$. На основі цього можна стверджувати, що речовини з меншими розмірами молекул краще модифікують кальцієві канали цих клітин. Залежність між розмірами молекул Са-зв'язуючих речовин і їх здатністю модифікувати кальцієві канали має нелінійний характер. Ця залежність задовільно апроксимується гіперболою, що зумовлено, мабуть, взаємодією двох факторів - спорідненістю до Ca^{2+} і доступністю до його зв'язування у зовнішньоклітинному примембранному просторі.



Мал. 4. I_{Ca} (1) через інтактні і I_{Na} (2) через модифіковані за допомогою ЕРТА (А), оксалату (В) і фосфату (В) натрію кальцієві канали клітин нижньої долі залози.

числень в'ясувалось, що коефіцієнт кореляції між масою ліганда і співвідношенням $I_{\text{Na}} : I_{\text{Ca}}$ становить $-0,753$, а між кількістю атомів у ліганді та його модифікуючою здатністю $-0,816$. На основі цього можна стверджувати, що речовини з меншими розмірами молекул краще модифікують кальцієві канали цих клітин. Залежність між розмірами молекул Са-зв'язуючих речовин і їх здатністю модифікувати кальцієві канали має нелінійний характер. Ця залежність задовільно апроксимується гіперболою, що зумовлено, мабуть, взаємодією двох факторів - спорідненістю до Ca^{2+} і доступністю до його зв'язування у зовнішньоклітинному примембранному просторі.

4. Дослідження значення натрієвого градієнту для проникнення кальцію через кальцієві канали

З метою в'яснення значення натрієвого градієнту для функціонування кальцієвих каналів ми досліджували зміну амплітуди I_{Ca} при еквімолярній заміні зовнішньоклітинного NaCl на тріс-Cl. З'ясувалось, що внаслідок такої заміни амплітуда I_{Ca} значно зменшується і це зменшення суттєво залежить від рівня ФП. За умови, що в амплітуду вхідного інтегрального струму вносить вклад Na^+ , то її зменшення внаслідок ліквідації натрієвого градієнту при деполяризації мембрани від різних значень ФП до -25 мВ було б однаковим.

З'ясувалось, що амплітуда I_{Ca} , зумовленого деполяризацією мембрани від ФП -85, -65 і -45 мВ до -25 мВ, відповідно зменшується як при наявності натрієвого градієнту, так і при його ліквідації, що пов'язано, очевидно, з розвитком стаціонарної інактивациі. Але оскільки існує залежність зменшення амплітуди I_{Ca} внаслідок ліквідації натрієвого градієнту від значення ФП, то в основі стаціонарної інактивациі при наявності натрієвого градієнту і при його відсутності лежить, мабуть, не потенціалоозалежний, а Ca-залежний механізм. Встановлення на мембрані певного ФП супроводжується зміною ΔE_{Na} - чим менший ФП, тим менше значення ΔE_{Na} . Але оскільки виведення Na-Ca-обмінном Ca^{2+} з клітин залежить від ΔE_{Na} (Костерин, 1990), то її зменшення призводить до зростання $[Ca^{2+}]_i$ і блокування кальцієвих каналів останніми. Внаслідок цього при ФП -45 мВ і при наявності натрієвого градієнту значна частина кальцієвих каналів є вже заблокованими. Тому ліквідація натрієвого градієнту в цих умовах найменше відбивається на амплітуді I_{Ca} . І дійсно, при стабілізації $[Ca^{2+}]_i$ за допомогою Ca-Mg-EGTA-буферу на рівні 10^{-5} моль/л дане змен-

шення є однаковим при деполяризації мембрани від різних значень ФП.

Підсумовуючи сказане, можна стверджувати, що ліквідація натрієвого градієнту приводить до зменшення I_{Ca} за рахунок нагромадження в клітинах Ca^{2+} внаслідок зміни функціонування Na-Ca-обміну. При наявності натрієвого градієнту підтримується низька $[Ca^{2+}]_B$ і, очевидно, фізіологічний функціональний стан кальцієвих каналів.

В ході дослідження з'ясувалось, що внаслідок ліквідації натрієвого градієнту значно зменшуються також I_{Ba} та I_{Sr} . Амплітуда I_{Ba} при максимумі ВАХ (ТП -35 мВ) зменшується на $71,96 \pm 10,65 \%$, а I_{Sr} - на $71,34 \pm 5,88 \%$. Очевидно, внаслідок ліквідації натрієвого градієнту підвищується $[Ba^{2+}]_B$ і $[Sr^{2+}]_B$ і ці катіони теж блокують кальцієві канали. Це можливо за умови, що Ba^{2+} і Sr^{2+} транспортуються Na-Ca-обмінником приблизно в такій же мірі, як і Ca^{2+} .

Дослідження залежності амплітуди I_{Ca} від типу одновалентних катіонів, якими замінювали катіони Na^+ у зовнішньоклітинному середовищі, може служити непрямим методом виявлення специфічності Na-Ca-обмінника до цих катіонів. Внаслідок еквімолярної заміни зовнішньоклітинного Na^+ на K^+ амплітуда I_{Ca} (ТП - 25 мВ) зросла на $63,12 \pm 6,13 \%$, а на Li^+ , $NH_2NH_3^+$, $ONNH_3^+$ - зменшилась відповідно на $58,11 \pm 3,15\%$, $55,70 \pm 3,30 \%$, $36,24 \pm 4,13 \%$. Наведені факти свідчать, що Na-Ca-обмінник мембрани цих клітин не характеризується, мабуть, абсолютною специфічністю до Na^+ .

Для підтвердження наявності Na-Ca-обміну в мембрані досліджуваних клітин ми спрямували зусилля на виявлення та ідентифікацію його струму у відповідь на гіперполяризаційні зміщення МП. Виявилось, що при наявності фізіологічних гра-

дієнтів Ca^{2+} і Na^+ внаслідок гіперполяризуючого зміщення МП від рівня ФП (-20 мВ) розвивається вхідний струм, який повільно досягає свого максимуму і не зменшується протягом гіперполяризації мембрани (3 с). Струм, що розвивається у відповідь на гіперполяризацію мембрани, залежить від натрієвого градієнту: внаслідок зменшення E_{Na} до 0 мВ його амплітуда є значно меншою, а при $E_{\text{Na}} = -45$ мВ струм має вихідний напрям. Напрямок струму визначається знаком ΔE_{Na} при ФП: негативному значенню ΔE_{Na} при ФП відповідає вхідний струм, а позитивному - вихідний. При подальшій зміні знаку ΔE_{Na} не змінюється ні напрям, ні характер залежності його амплітуди від ΔE_{Na} . Це свідчить, що даний струм є не каналний, а відображає електрогенний ефект Na-Ca-обміну.

Структурно-функціональна організація кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин

Таким чином, потенціалозалежні кальцієві канали клітин нижньої долі залози суттєво не відрізняються від кальцієвих каналів збудливих клітин. Вони організовані за принципом мембранної пори і містять активаційні ворота, які відкриваються у відповідь на деполяризацію мембрани. Віля зовнішнього отвору розміщений Ca-зв'язуючий регуляторний центр, вилучення Ca^{2+} з якого за допомогою Ca-зв'язуючих речовин призводить до втрати селективності. Діаметр пори модифікованих кальцієвих каналів перевищує 0,26 нм, але є менший 2 нм. Відбір проникаючих одновалентних катіонів здійснюється за принципом стеричної відповідності і електростатичної взаємодії з від'ємними фіксованими зарядами, які відіграють роль, очевидно, внутрішньоканального Ca-зв'язуючого центру. Ступінь спорідненості Ca-зв'язуючих угруповань до двовалентних

катіонів визначає їх здатність до проникнення або блокування каналів. З цитоплазматичного боку досліджувані кальцієві канали мають ділянку, фосфорилування якої цАМФ-залежною протеїнкіназою призводить до зростання ймовірності їх активації. Причому, метаболічна залежність даних каналів не втрачається в процесі їх модифікації безкальцієвим середовищем. Передбачається також існування з цитоплазматичного боку каналів ще одного Са-зв'язуючого центру, через який за принципом негативного зворотнього зв'язку здійснюється блокування кальцієвої провідності. Такий ефект спостерігається при зміщеннях Φ у позитивному напрямку або ліквідації натрієвого градієнту, що призводить до зміни функціонування Na-Ca-обміну.

ВИСНОВКИ

1. Потенціалозалежні кальцієві канали клітин нижньої і верхньої долей слинної залози личинки *Chironomus plumosus* є низькопороговими. Амплітуда кальцієвого струму протягом деполаризуючого зміщення через ці канали повільно зменшується.

2. Введення в клітини нижньої долі цАМФ на фоні АТФ і Mg^{2+} супроводжується збільшенням амплітуди кальцієвого струму, а в клітини верхньої долі - зменшенням.

3. Кальцієвий струм каналів клітин нижньої долі залози помірно зменшується при дії на зовнішню поверхню мембрани полівалентних катіонів ($La^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$), верапамілу і нітрендипіну, під впливом зниження температури і закислення середовища.

4. При збільшенні $[Ca^{2+}]_i$ спостерігається насичення амплітуди кальцієвого струму кальцієвих каналів клітин нижньої долі залози. Крім кальцію через дані канали проникають катіони барію та стронцію ($Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+}$),

вольт-амперні характеристики їх струмів є близькими. Зменшення амплітуди струмів двовалентних катіонів протягом деполяризації мембрани описується одною експонентою, є струмова-лежним і майже не залежить від типу проникаючого катіона.

5. Кальцієві канали клітин нижньої долі залози стають проникними для одновалентних катіонів у безкальцієвому середовищі із додаванням різних кальційзв'язуючих речовин (ЕДТА, ЕГТА, цитрату, оксалату, пірофосфату і ортофосфату натрію). При цьому зберігається їх метаболічна залежність і одноекспоненціальність зменшення струму протягом деполяризуючого зміщення. Максимум вольт-амперної характеристики індукованого натрієвого струму незначно зміщений у негативному напрямку відносно максимуму кальцієвого струму. Виявлена також гіперболічна залежність між розмірами молекул кальційзв'язуючих речовин і їх модифікуючою здатністю.

6. Модифіковані безкальцієвим середовищем кальцієві канали проникні для одновалентних катіонів у такій послідовності: $K^+ > Li^+ > Na^+ > \text{холін}^+ > CH_3NH_3^+ > OHNH_3^+ > NH_2NH_3^+$. Внаслідок закислення середовища незначно зменшується амплітуда як калієвого, так і натрієвого індукованих струмів. Це свідчить, що відбір проникаючих катіонів здійснюється за принципом стеричної відповідності і електростатичної взаємодії з від'ємно зарядженими угрупованнями.

7. Амплітуда кальцієвого струму збільшується при заміні зовнішньоклітинного Na^+ на K^+ і зменшується - при заміні на інші одновалентні катіони у послідовності: $OHNH_3^+ > NH_2NH_3^+ > Li^+ > \text{трис}^+$. Таке зменшення пов'язане, мабуть, з нагромадженням в клітині Ca^{2+} внаслідок зміни режиму функціонування Na-Ca-обмінника.

Список публікацій за темою дисертації:

1. Клевець М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин // Физиол. журн. - 1992. - 38, №3. - С. 70 - 75.
2. Клевець М.Ю., Манько В.В., Полуйко В.Ю. Значення позаклітинного кальцію в підтриманні функціонального стану потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин // Науково-методичні аспекти фізіології. - Львів, 1993. - С. 38 - 39.
3. Манько В.В., Клевець М.Ю. Селективність модифікованих безкальцієвим середовищем кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин / Львів. ун-т. - Львів, 1994. - 12 с.: іл. 6 - Вібліогр. 11 назв. - Укр. - Деп. в ДНТБ України 25.08.94, N 1789 - Ук 94.
4. Манько В.В. Дослідження ступеня модифікації потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин під впливом рівних кальційзв'язуючих речовин / Львів. ун-т. - Львів, 1994. - 12 с.: іл. 7 - Вібліогр. 7 назв. - Укр. - Деп. в ДНТБ України 25.08.94, N 1787 - Ук 94.
5. Клевець М.Ю., Манько В.В. Порівняння кальцієвого, барієвого і стронцієвого потенціалозалежних струмів мембрани секреторних клітин // Матеріали 1-го з'їзду Українського біофізичного товариства, м. Київ, 20 - 24 червня 1994 р. - Київ, 1994. - С. 114 - 115.
6. Клевець М.Ю., Манько В.В. Значення натрієвого градієнта для реєстрації струму через кальцієві потенціалозалежні канали мембрани секреторних клітин // XIV з'їзд Українського фізіологічного товариства, м. Київ, 1 - 4 листопада 1994 р. Тев. доп. - Київ, 1994. - С. 10 - 11.

Манько В.В. Характеристика токов потенциалозависимых кальциевых каналов мембраны секреторных клеток.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология человека и животных, Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1995.

Защищается 6 научных работ, содержащих экспериментальные исследования. Установлено, что функциональное состояние кальциевых каналов мембраны клеток слюнной железы личинки хирономуса контролируется аденилатциклазной системой. Проведены исследования селективности этих каналов и показано, что они непроницаемы для одновалентных катионов; в бескальциевой среде с добавлением равных Ca-авяывающих веществ они теряют свою селективность, сохраняя метаболическую зависимость; кинетика инактивации интегральных токов через эти каналы токовозависима и почти не зависит от типа проникающего катиона. Предложена модель структурно-функциональной организации этих каналов и их зависимости от Na-Ca-обмена.

Manko V.V. Characteristic of the currents of the potential-dependent calcium-channels of the secretory cell membrane.

Thesis for Ph.D. degree in biological sciences by speciality: 03.00.13 - Man and Animals Physiology. Taras Shevchenko University, Kiyv, 1995.

There are defence of 6 scientific publications containing experimental researches. It have been shown that functional state of the Ca channels of the cell membrane of the salivary glands in Chironomus larvas is controled by adenilatcyclase system. Selectivity of these channels have been devised and it was shown that they are not permeable

Список публікацій за темою дисертації:

1. Клевець М.Ю., Манько В.В. Характеристика потенціалозалежного кальцієвого струму мембрани секреторних клітин // Физиол. журн. - 1992. - 38, №3. - С. 70 - 75.
2. Клевець М.Ю., Манько В.В., Полуйко В.Ю. Значення поваклітинного кальцію в підтриманні функціонального стану потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин // Науково-методичні аспекти фізіології. - Львів, 1993. - С. 38 - 39.
3. Манько В.В., Клевець М.Ю. Селективність модифікованих безкальцієвим середовищем кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин / Львів. ун-т. - Львів, 1994. - 12 с.: іл. 6 - Вібліогр. 11 назв. - Укр. - Деп. в ДНТБ України 25.08.94, N 1789 - Ук 94.
4. Манько В.В. Дослідження ступеня модифікації потенціалозалежних кальцієвих каналів мембрани секреторних клітин під впливом різних кальційв'язуючих речовин / Львів. ун-т. - Львів, 1994. - 12 с.: іл. 7 - Вібліогр. 7 назв. - Укр. - Деп. в ДНТБ України 25.08.94, N 1787 - Ук 94.
5. Клевець М.Ю., Манько В.В. Порівняння кальцієвого, барієвого і стронцієвого потенціалозалежних струмів мембрани секреторних клітин // Матеріали 1-го з'їзду Українського біофізичного товариства, м. Київ, 20 - 24 червня 1994 р. - Київ, 1994. - С. 114 - 115.
6. Клевець М.Ю., Манько В.В. Значення нагрівового градієнта для реєстрації струму через кальцієві потенціалозалежні канали мембрани секреторних клітин // XIV з'їзд Українського фізіологічного товариства, м. Київ, 1 - 4 листопада 1994 р. Тев. доп. - Київ, 1994. - С. 10 - 11.

Манько В.В. Характеристика токов потенциалозависимых кальциевых каналов мембраны секреторных клеток.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология человека и животных, Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1995.

Защищается 6 научных работ, содержащих экспериментальные исследования. Установлено, что функциональное состояние кальциевых каналов мембраны клеток слюнной железы личинки хиромомуса контролируется аденилатциклазной системой. Проведены исследования селективности этих каналов и показано, что они непроницаемы для одновалентных катионов; в бескальциевой среде с добавлением равных Ca-связывающих веществ они теряют свою селективность, сохраняя метаболическую зависимость; кинетика инактивации интегральных токов через эти каналы токовозависима и почти не зависит от типа проникающего катиона. Предложена модель структурно-функциональной организации этих каналов и их зависимости от Na-Ca-обмена.

Manko V.V. Characteristic of the currents of the potential-dependent calcium-channels of the secretory cell membrane.

Thesis for Ph.D. degree in biological sciences by speciality: 03.00.13 - Man and Animals Physiology. Taras Shevchenko University, Kyiv, 1995.

There are defence of 6 scientific publications containing experimental researches. It have been shown that functional state of the Ca channels of the cell membrane of the salivary glands in Chironomus larvas is controled by adenilatcyclase system. Selectivity of these channels have been devised and it was shown that they are not permeable

for monovalent cations; in the Ca-free medium containing different Ca-binding substances they lost selectivity but keeps unchanged the metabolic dependence; inactivation kinetic of currents through these channels is current-dependent but it is almost not dependent on the type of permeated cation. It was proposed the model of structural-functional organization of these channels and their dependence on the Na-Ca exchange.

Ключові слова: потенціалозалежні кальцієві канали, Na-Ca-обмін, мембрана секреторних клітин.

1118711

Ав 32.506
АВ 32.506

Підписано до друку 25.05.95. Формат 60x84/16. ПепІр друк. № 1.
Друк офсет. Умовн. друк. арк. 1,8. Умов. фарб. відб. 1,8.
Обл.-вид. арк. 2,0. Тираж 100. Зам. ІІ9.

Машинно-офсетна лабораторія Львівського держуніверситету
Ім. І. Франка. 290602 Львів, вул. Університетська, 1.