

Д.О. Кришталь, В.В. Несін, **М.Ф. Шуба**

Дія паксиліну на кальційзалежний калієвий струм в ізольованих гладеньком'язових клітинах сім'явивідних протоків щура

С помощью метода фиксации мембранного потенциала в конфигурации перфорации мембраны с использованием амфотерицина В было исследовано влияние паксиллина на выходящий кальцийзависимый калиевый ток ($I_{K(Ca)}$) в изолированных гладкомышечных клетках эпидидемального отдела семявыводящих протоков крысы. Суммарный выходящий калиевый ток, вызванный деполяризующим смещением мембранного потенциала до +40 мВ от поддерживаемого потенциала -80 мВ, имел сложную кинетику инактивации, что предполагало наличие в нём нескольких составляющих. Наличие $I_{K(Ca)}$ в составе суммарного выходящего тока было показано путём исключения Ca^{2+} из внешнего раствора. Полученный $I_{K(Ca)}$ характеризовался медленной кинетикой активации и инактивации. Микотоксин паксиллин, являющийся селективным блокатором кальцийзависимых калиевых каналов высокой проводимости (BK_{Ca}) в гладких мышцах, дозозависимо угнетал $I_{K(Ca)}$. При этом в концентрации 70 нмоль/л он уменьшал на 50 % амплитуду $I_{K(Ca)}$, а в концентрации 1 мкмоль/л – практически полностью его подавлял. Было проведено сравнение блокирующего эффекта паксиллина и низких концентраций тетраэтиламмония (ТЭА), неселективного блокатора калиевых каналов в гладких мышцах. Апликация во внешний раствор ТЭА в концентрации 0,3 ммоль/л угнетала выходящий $I_{K(Ca)}$ аналогично 1 мкмоль/л паксиллина. Также было исследовано влияние паксиллина на мембранный потенциал гладкомышечных клеток эпидидемального отдела семявыводящих протоков крысы. В концентрации 1 мкмоль/л он не влиял на поддерживаемый мембранный потенциал в пределах от -60 до -40 мВ. Однако при значениях потенциала выше -40 мВ апликация паксиллина во внешний раствор заметно (до 15 мВ) деполяризовала клеточную мембрану. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что кальцийзависимые калиевые каналы большой проводимости в гладкомышечных клетках эпидидемального отдела семявыводящих протоков крысы могут выполнять роль гиперполяризующего механизма мембранного потенциала при значительной деполяризации клеточной мембраны, но непосредственно не принимают участия в поддержании мембранного потенциала покоя.

ВСТУП

Не викликає сумнівів той факт, що калієві канали відіграють важливу роль у регуляції збуджуваності гладеньком'язових клітин (ГМК) та у підтриманні мембранного потенціалу спокою, який значною мірою залежить саме від калієвої провідності мембрани. Блокування калієвої провідності призводить до деполяризації мембрани та скорочення ГМК, а її активація – до гіперполяризації мембрани, що в свою чергу

зменшує вхід Ca^{2+} у клітину через потенціалкервані кальцієві канали та сприяє таким чином розслабленню клітини.

Раніше нами було показано, що загальний вихідний калієвий струм ізольованих ГМК епідидемальної частини сім'явивідних протоків щура складається з декількох компонент [6]. Так, харібдотоксин, блокатор кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (BK_{Ca}), викликав пригнічення вихідного струму, вказуючи наявність кальційзалежної складової цього

© Д.О. Кришталь, В.В. Несін, **М.Ф. Шуба**

струму. Також із сумарного вихідного струму були виділені 4-амінопіридинчутливий калієвий струм із швидкою кінетикою інактивзації та струм затриманого випрямлення, чутливий до блокувальної дії тетраетиламонію (ТЕА).

У більшості наукових праць, в яких досліджувалась участь VK_{Ca} у регуляції скорочувальної активності різних типів вісцеральних гладеньких м'язів, було показано, що їх основна роль полягала у реполяризації мембрани під час збудження гладеньких м'язів [4], і ці канали не брали безпосередньої участі у підтриманні потенціалу спокою ГМК. Проте в деяких об'єктах, наприклад в кишечнику морської свинки, аплікація блокатора VK_{Ca} харібдотоксину підвищувала спонтанну активність тканини та пригнічувала гіперполяризацію, викликану стимуляцією нерва. Це свідчило про те, що в даному типі гладеньких м'язів певна популяція VK_{Ca} є постійно активною [7].

Мікотоксин паксилін все частіше використовують останнім часом як блокатор VK_{Ca} у різних типах гладеньком'язових тканин [10, 13]. Це пов'язано з тим, що, наприклад, блокатор кальційзалежних калієвих каналів (K_{Ca}) харібдотоксин у культуральних нервових клітинах може також пригнічувати деякі компоненти потенціалкерowanego калієвого струму [12]. Паксилін, при його низькій вартості у порівнянні з іншими блокаторами VK_{Ca} , такими, як харібдотоксин чи іберіотоксин, є високоспецифічним блокатором VK_{Ca} [10]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити дію паксиліну на кальційзалежний калієвий струм ($I_{K(Ca)}$) і на мембранний потенціал ГМК, ізольованих із епідидимальної частини сім'явивідних протоків щура.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на поодиноких ГМК, ізольованих із епідидимальної части-

ни сім'явивідних протоків (vas defrens) дорослих щурів (15 тварин) масою 350-400 г. Тварин присипляли за допомогою ефіру, а потім декапітували.

Поодинокі ГМК отримували методом ферментативно-механічної ізоляції. Очищену від сполучної тканини епідидимальну частину сім'явивідного протоку щура розрізали вздовж і видаляли внутрішній епітеліальний шар. Потім тканину нарізали на шматочки розміром близько 2 x 2 мм і поміщали у номінально безкальцієвий розчин, до якого було попередньо додано (мг/мл): колагеназу типу XI (1,5), протеазу типу X (0,5) і бичачий сироватковий альбумін (1,5). У цьому розчині шматочки тканини інкубували протягом 25 – 30 хв при 35,5° С. Після інкубації їх відмивали у безкальцієвому розчині та диспергували за допомогою пастерівської піпетки до появи поодиноких клітин. Ізольовані клітини зберігали до кінця експерименту в цьому самому розчині при 5° С.

Для відведення іонних струмів і мембранного потенціалу були використані відповідно стандартний метод фіксації потенціалу та струму ("patch-clamp") у конфігурації перфорування ділянки мембрани під піпеткою за допомогою антибіотика амфотерицину Б, 1 мг якого розчиняли в 10 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) та розводили в піпетковому розчині до кінцевої його концентрації 200 мкг/мл. Досліди проводили при кімнатній температурі (22–24° С). Фіксацію потенціалу та реєстрацію струмів здійснювали за допомогою підсилювача List EPC 7 ("List Medical Electronic", Німеччина) з опором зворотного зв'язку перетворювача струм–напруга 500 МОм. Сигнал з виходу підсилювача надходив на аналогово-цифровий перетворювач Digidata 1200A ("Axon Instruments", США), та далі у комп'ютер IBM PC/AT. Результати аналізували за допомогою програми pCLAMP 5,5 ("Axon Instruments", США). Мікропіпетки для вимірювання трансмембранних іонних

струмів виготовляли з м'якого молібденового скла. Опір піпеток, заповнених внутрішньопіпетковим розчином, становив 2 – 4 МОм. Компенсування струму витоків не проводили.

У роботі використовували колагеназу (тип XI), протеазу (тип X), бичачий сироватковий альбумін, ТЕА, етиленглікольбіс(б-аміноетиловий ефір)-N,N,N,N-тетраоцтової кислоти (ЕГТА), 4-(2-гідроксипетил)-1-піперазинетансульфонову кислоту (НЕРЕС), паксилін, ДМСО, амфотрицин Б та Na_2ATP виробництва фірми "Sigma" (США). Всі інші реактиви – вітчизняного виробництва.

Склад зовнішнього розчину (ммоль/л): KCl – 5,9, NaCl – 135, MgCl_2 – 1,2, CaCl_2 – 2,5, D-глюкоза – 5, НЕРЕС – 10 (рН 7,4,

NaOH). Внутрішньопіпетковий розчин містив (ммоль/л): KCl – 140, MgCl_2 – 2, Na_2ATP – 1, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10 (рН 7,3, KOH).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У переважній більшості досліджуваних клітин у відповідь на деполяризувальні зміщення мембранного потенціалу від -80 мВ до рівнів, вищих за -40 мВ, тривалістю 500 мс, спочатку виникав вхідний струм, що мав дуже швидку кінетику активації та інактивації, і через декілька мілісекунд змінювався вихідним струмом великої амплітуди. Зі збільшенням рівня деполяризації амплітуда вихідного струму підвищувалася (рис. 1, а). Кінетика струму мала складний

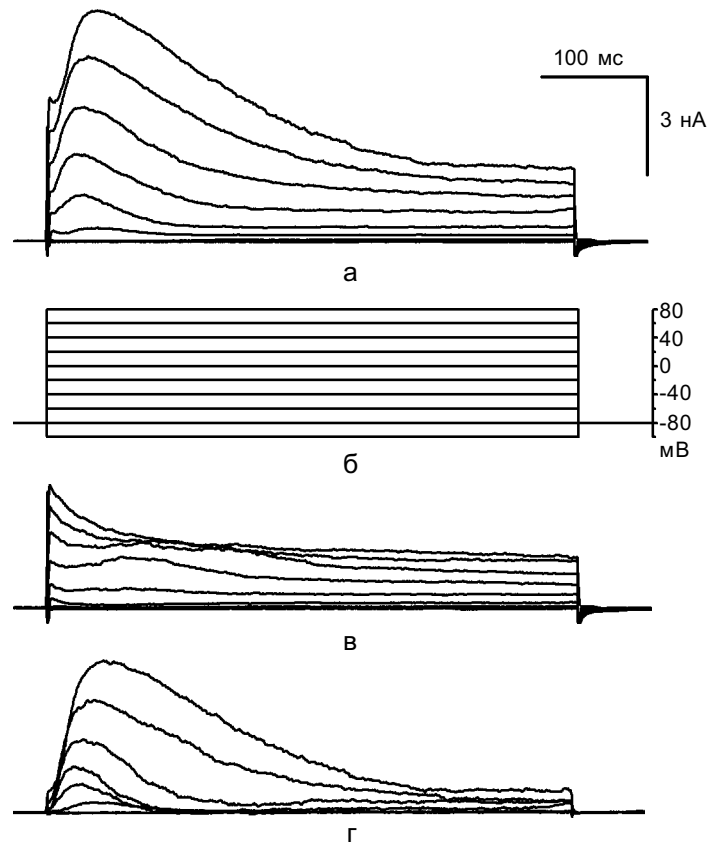


Рис. 1. Вплив видалення Ca^{2+} із зовнішнього розчину на вихідний струм: а – вихідні струми в контролі, в – за відсутності у зовнішньому розчині Ca^{2+} , б – протокол експерименту, г – вихідні кальційзалежні струми, отримані відніманням струмів у безкальцієвому розчині від відповідних струмів у контролі

характер. Найчастіше після досягнення максимального значення струм мав чітко виражену складову, що швидко спадає та переходить у стаціонарний компонент, котрий залишався на сталому рівні навіть при довготривалій деполяризації мембрани. Швидкість активації та інактивації вихідного струму варіювали у різних клітин.

Для того, щоб показати наявність кальційзалежної компоненти у складі загального вихідного трансмембранного калієвого струму, зовнішньоклітинний розчин замінювали на такий самий, який номінально не містив Ca^{2+} . Це значно зменшувало сумарний вихідний калієвий струм (див. рис. 1, в). На рис. 1, г зображено $I_{\text{K(Ca)}}$, отримані за допомогою віднімання струмів за відсутності Ca^{2+} у зовнішньому розчині (див. рис. 1, в) із струмів у контролі при відповідному рівні деполяризації мембрани (див. рис. 1, а). Вони мали відносно повільну кінетику активації та інактивації. Отримані результати свідчили про те, що досить велика частка сумарного вихідного струму припадає на $I_{\text{K(Ca)}}$. Останній активувався при деполяризації мембрани, більшій за -40 мВ (при підтримуваному на мембрані

потенціалі -80 мВ), і при деполяризації до $+80$ мВ максимум його амплітуди становив близько 70 % від максимальної амплітуди сумарного вихідного струму в контролі. Водночас наприкінці тестового імпульсу тривалістю 500 мс амплітуда $I_{\text{K(Ca)}}$ становила лише близько 30–35 % від амплітуди в контролі, що свідчило про значний внесок потенціалкерowanego калієвого струму затриманого випрямлення на цьому етапі.

У наступних експериментах досліджували залежність блокувальної дії паксиліну від його концентрації на $I_{\text{K(Ca)}}$. При підтримуваному на мембрані потенціалі -60 мВ та стимуляції до $+40$ мВ, тривалістю 500 мс, паксилін дозозалежно пригнічував вихідний струм (рис. 2, а). У цьому разі пригнічення спостерігалось вже при концентрації 10 нмоль/л, а в концентрації 1 мкмоль/л токсин максимально пригнічував вихідний струм. На рис. 2, б представлено паксилін-чутливі струми у “чистому” вигляді, отримані відніманням струму при наявності 1 мкмоль/л паксиліну від кривих у контролі, та за наявності в розчині 10, 30 нмоль/л, 0,1 та 0,3 мкмоль/л паксиліну. Залежність блокувального ефекту від концентрації

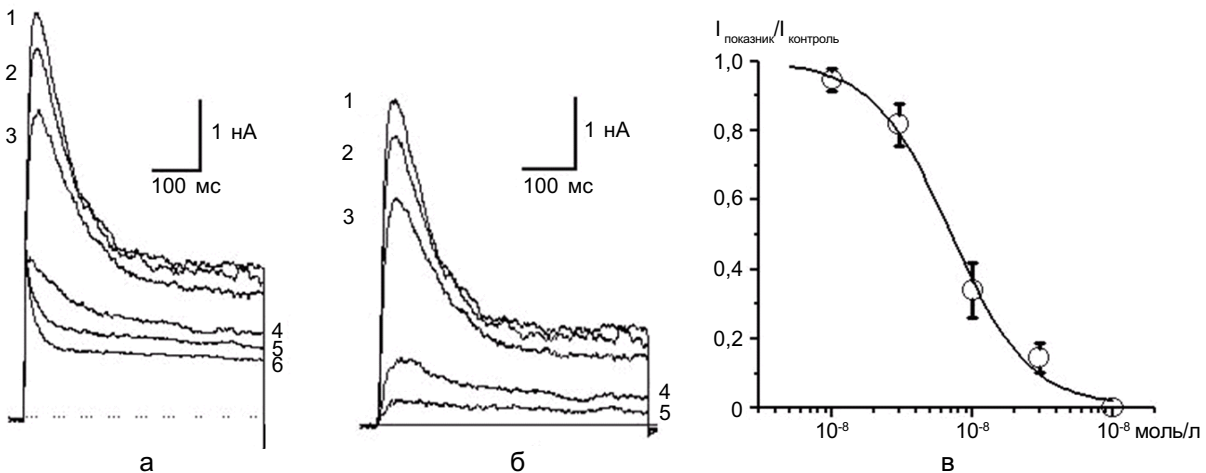


Рис. 2. Дія паксиліну на вихідний струм гладеньком’язових клітин сім’явидних протоків щура: а – струми за наявності у зовнішньому розчині різних концентрацій паксиліну, б – паксилінзалежні вихідні струми, отримані відніманням струму за наявності 1 мкмоль/л паксиліну від кривих у контролі та при різних концентраціях блокатора (1 – контроль (без паксиліну), 2 – 0,01, 3 – 0,03, 4 – 0,1, 5 – 0,3, 6 – 1 мкмоль/л), в – крива залежності блокувальної дії паксиліну від його концентрації на $I_{\text{K(Ca)}}$

паксиліну добре описувалася сигмоїдальною кривою, побудованою за методом найменших квадратів (див. рис. 2, в), при цьому концентрація паксиліну, що викликала 50%-ве пригнічення $I_{K(Ca)}$, становила $70 \text{ нмоль/л} \pm 5 \text{ нмоль/л}$ ($n=4$).

Відомо, що неселективний блокатор калієвих каналів ТЕА в низьких концентраціях (менше ніж 1 моль/л) здатний блокувати переважно K_{Ca} [1, 3]. Тому ми порів-

нювали його дію на вихідний трансмембранний іонний струм ГМК *vas deferens* щура з блокувальним впливом паксиліну. ТЕА дозозалежно блокував вихідний струм, що виникав при деполяризації мембрани до $+40 \text{ мВ}$ від підтримуваного потенціалу -60 мВ , тривалістю 500 мс (рис. 3, а). При цьому в концентрації 1 ммоль/л блокатор викликав пригнічення струму приблизно на 50% (див. рис. 3, б).

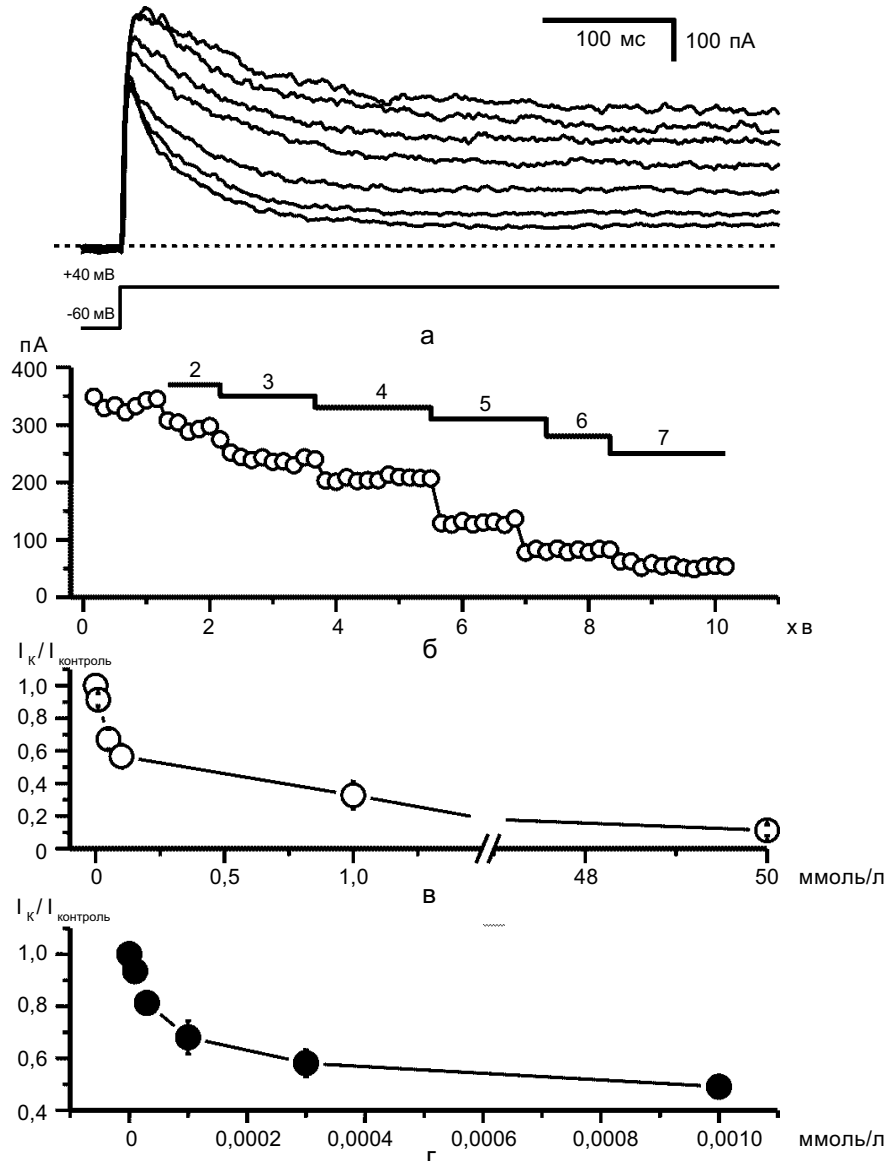


Рис. 3. Порівняння блокувальної дії паксиліну та тетраетиламонію (ТЕА) на вихідний калієвий струм: а – струми за наявності у зовнішньому розчині ТЕА у різних концентраціях (1 – контроль (без ТЕА), 2 – 0,01, 3 – 0,05, 4 – 0,1, 5 – 1, 6 – 10, 7 – 50 ммоль/л), в і г – криві залежності блокувальної дії ТЕА та паксиліну відповідно на калієвий струм

Для порівняння блокувального ефекту ТЕА і паксиліну криві доза – ефект були побудовані по точкам, які являли собою середні значення струмів для кожної з відповідних концентрацій блокаторів наприкінці тестового імпульсу (останні 50 мс деполяризувальної сходинок загальною тривалістю 500 мс). Це було зроблено з метою максимального зменшення впливу потенціалкерowanego швидкого А-струму, оскільки за 450 мс тестового імпульсу він фактично повністю інактивувався. Аналіз отриманих кривих (див. рис. 3, в, г) показав, що концентрація ТЕА, необхідна для пригнічення вихідного струму, аналогічного викликаному аплікацією паксиліну в концентрації 1 мкмоль/л, становить 0,3 ммоль/л. Проведені нами експерименти показали, що при додаванні 1 мкмоль/л паксиліну у зовнішній розчин, що містив 0,3 ммоль/л ТЕА, вихідний струм фактично не зменшувався. Таким чином, навіть відносно низькі концентрації ТЕА, менші за 0,5 ммоль/л, ефективно блокують VK_{Ca} у ГМК, ізольованих із *vas deferens* щура, аналогічно до паксиліну.

На заключному етапі досліджень, з метою з'ясування ролі K_{Ca} в регуляції мембранного потенціалу в ГМК *vas deferens* щура, було проведено низку експериментів з використанням методики “patch

clamp” у режимі фіксації струму. Паксилін у концентрації 1 мкмоль/л не впливав помітно на мембранний потенціал клітин у межах від -60 до -40 мВ. Однак при значеннях мембранного потенціалу, вищих за -40 мВ, аплікація паксиліну у зовнішній розчин значно (до 15 мВ) деполяризувала клітинну мембрану (рис. 4).

Паксилін являє собою мікотоксин і є одним з найефективніших небілкових блокаторів VK_{Ca} [8, 11]. У дослідях, проведених на культурі міоцитів бичачої аорти [8], у конфігурації inside-out паксилін у концентрації 10 нмоль/л при аплікації з внутрішнього боку мембрани пригнічував активність поодинокого кальційактивованого калієвого каналу на 44 – 70 %. При цьому він не конкурує з харібдотоксином за місце зв'язування, а навпаки, алостерично підвищує його спорідненість, що свідчить про просторову відокремленість місць зв'язування цих двох блокаторів у каналі. Водночас досліди, проведені з іншим відомим високоспецифічним блокатором VK_{Ca} , іберіотоксином, на ГМК мезентеріальної артерії щура [10] показали, що при додаванні 150 нмоль/л цього блокатора до зовнішнього розчину за наявності 300 нмоль/л паксиліну подальшого пригнічення трансмембранного калієвого струму не відбувалося. В даній роботі нами було

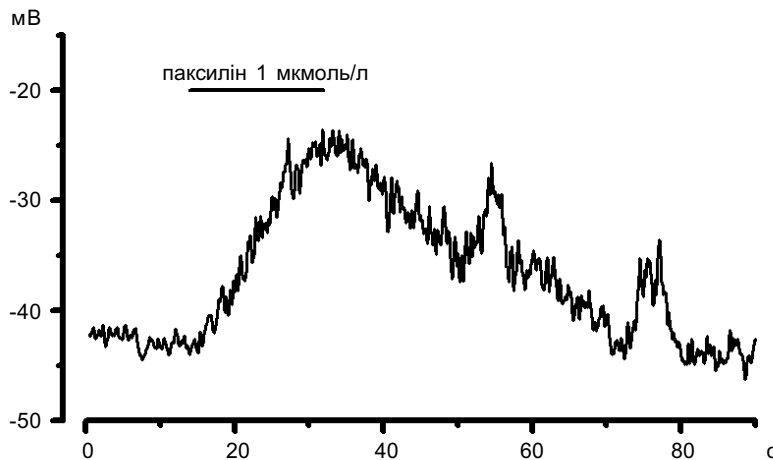


Рис. 4. Дія паксиліну на мембранний потенціал у гладеньком'язових клітинах сім'явидних протоків щура. Горизонтальний відрізок відзначає час аплікації 1 мкмоль/л паксиліну до зовнішнього розчину

проведено порівняння блокувальної дії на K_{Ca} паксиліну та ТЕА, який є широко відомим неселективним блокатором калієвої провідності. ТЕА може блокувати калієві канали не лише із зовнішнього, але також і з внутрішнього боку мембрани, при цьому константа дисоціації збільшується в десятки разів. Так, у дослідях на бичачих хромафінних клітинах [14] було показано, що при аплікації ТЕА з внутрішнього боку мембрани константа дисоціації становить 30 ммоль/л, а з зовнішнього – 0,2 ммоль/л. Аналогічні дані було отримано на клітинах скелетних [3] і гладеньких [2] м'язів.

У наших дослідях ТЕА, доданий до зовнішнього розчину, ефективно блокував $I_{K(Ca)}$, при цьому його концентрація, необхідна для пригнічення вихідного струму, аналогічного до викликаного аплікацією 1 ммоль/л паксиліну, становила 0,3 ммоль/л. Порівняння блокувального ефекту ТЕА на $I_{K(Ca)}$ із дією іншого селективного блокатора VK_{Ca} , харібдотоксину, давало подібні результати для дії ТЕА в ГМК, ізольованих із інших тканин [1, 9]. Отже, можна стверджувати, що ТЕА у невеликих концентраціях ефективно блокує саме складову струму крізь VK_{Ca} в ізольованих ГМК vas deferens щура.

Літературні дані щодо рівня мембранного потенціалу спокою у досліджуваному нами типі клітин, отримані за допомогою мікроелектродних вимірювань на інтактній тканині, показують достатньо широкий спектр значень, від -53 до -70 мВ, із середнім значенням близько -58 мВ [5]. Проведені нами дослідження дії паксиліну на мембранний потенціал ізольованих ГМК епідидимального відділу vas deferens щура показали, що аплікація 1 ммоль/л паксиліну не змінювала помітно мембранний потенціал досліджуваних клітин у межах від -60 до -40 мВ. Але при значеннях мембранного потенціалу, більших за -40 мВ, вона викликала помітну деполяризацію клітинної мембрани. Як нами було раніше показано

[6], при таких значеннях мембранного потенціалу доступність до активації каналів інших складових вихідного струму у досліджуваному типі клітин – потенціалкероаних струмів затриманого випрямлення та А-типу – є незначною. Можна зробити висновок, що VK_{Ca} сприяють гіперполяризації клітинної мембрани при тривалих деполяризаціях мембрани ГМК, а отже, беруть участь у процесі реполяризації, тобто відіграють важливу роль у регуляції мембранного потенціалу в ГМК vas deferens щура.

D.O.Kryshstal, V.V.Nessin, M.F.Shuba

EFFECT OF PAXILLINE ON Ca^{2+} -DEPENDENT K^{+} CURRENT IN SMOOTH MUSCLE CELLS ISOLATED FROM RAT VAS DEFERENS

The properties of the outward Ca^{2+} -dependent K^{+} current (KCa) were investigated in single smooth muscle cells (SMCs) isolated from epididymal part of the rat vas deferens (RVD) using amphotericin B perforated patch-clamp technique. The complex kinetic of the net outward current elicited by positive voltage steps from -80 mV to $+40$ mV suggested the presence of several components of this current. KCa current was separated from the net outward current by removal of Ca^{2+} from the external solution. KCa was characterized by slow kinetics of current activation and decay. Mycotoxin paxilline, the selective blocker of the large conductance KCa channels, inhibited KCa current in a dose-dependent manner. At the concentration of 70 nM paxilline evoked 50% inhibition of KCa and at 1 mM complete suppression of KCa current was achieved. The blocking effect of low concentrations of a non-selective KCa channels inhibitor tetraethylammonium (TEA) was compared to that of paxilline. The external application of 0,3 mM TEA inhibited KCa current similarly to 1 mM of paxilline. Finally, we studied the effect of paxilline on the resting membrane potential of RVD SMCs. Paxilline (1 mM) did not affect the membrane potential of SMCs with the resting potential in the range of -60 to -40 mV. However, at potentials more positive than -40 mV application of paxilline significantly (up to 15 mV) depolarized the membrane of SMCs. These results suggest that the large conductance KCa channels in RVD SMCs do not contribute to the resting membrane potential but could serve as a hyperpolarizing mechanism at the significant membrane depolarizations.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Повстан О.В., Зима О.В., Хархун М.І., Шуба М.Ф. Властивості харібдотоксинчутливого компонента кальційзалежного калієвого струму в гладеньком'язових клітинах taenia coli морської свинки // Нейрофізіологія. – 2000. – **32**, № 1. – С.16–21.
2. Benham C.D., Bolton T.B., Lang R.J., Takewaki T. The mechanism of action of Ba²⁺ and TEA on single Ca²⁺-activated K⁺ channels in arterial and intestinal smooth muscle cell membranes // Pflug. Arch. – 1985. – **403**, № 2. – P.120–127.
3. Blatz A.L., Magleby K.L. Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle // J. Gen. Physiol. – 1984. – № 1. – P.1–23.
4. Farrugia G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal // Annu. Rev. Physiol. – 1999. – **61**. – P.45–84.
5. Goto K. Electrophysiological analysis of colchicine-induced supersensitivity in the rat vas deferens // J. Physiol. – 1980. – **308**. – P.465–477.
6. Harhun M.I., Jurkiewicz A., Jurkiewicz N.H., et al. Voltage-gated potassium currents in rat vas deferens smooth muscle cells // Pflug. Arch. – 2003. – **446**(3). – P.380–386.
7. Hong S.J., Roan Y.F., Chang C.C. Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca(2+)-activated K+ channel // Amer. J. Physiol. – 1997. – **272**(5 Pt. 1). – P.G962–G971.
8. Knaus H., McManus O.B., Lee S.H. et al. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels // Biochemistry. – 1994. – **33**(19). – P.5819–5828.
9. Kolb H.A. Potassium channels in excitable and non-excitable cells // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. – 1990. – **115**. – P.51–91.
10. Li G., Cheung D.W. Effects of paxilline on K+ channels in rat mesenteric arterial cells // Eur. J. Pharmacol. – 1999. – **372**(1). – P.103–107.
11. Sanchez M., McManus O.B. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel // Neuropharmacology. – 1996. – **35**(7). – P.963–968.
12. Schweitz H., Stansfeld C.E., Bidard J.N. et al. Charybdotoxin blocks dendrotoxin-sensitive voltage-activated K+ channels // FEBS Lett. – 1989. – **250**(2). – P.519–522.
13. Tammaro P., Smith A.L., Hutchings S.R. et al. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K+ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells // Brit. J. Pharmacol. – 2004. – **143**(2). – P.303–317.
14. Yellen G. Ionic permeation and blockade in Ca²⁺-activated K⁺ channels of bovine chromaffin cells // J. Gen. Physiol. – 1984. – № 2. – P.157–186.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 21.06.2007*