

С. В. Король, О. П. Костюк

Неспецифічні струми через потенціалкеровані кальцієві канали нейронів спінальних гангліїв щурів у безкальцієвому розчині

(Представлено академіком НАН України П. Г. Костюком)

У гостроізолюваних нейронах спінальних гангліїв щурів методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” досліджено поведінку потенціалкерованих кальцієвих каналів в умовах відсутності у зовнішньоклітинному розчині іонів кальцію. Встановлено, що в безкальцієвому розчині, який вміщує калій, такі канали втрачають свою селективність і набувають здатності пропускати вхідний калієвий струм. Порівняно вольтамперні характеристики кальцієвого, калієвого та натрієвого струмів, що протікали через потенціалкеровані кальцієві канали.

Вивчення властивостей потенціалкерованих кальцієвих каналів становить значний науковий інтерес, оскільки кальцієві канали відіграють важливу роль у процесах, що протікають у всьому організмі і, зокрема, у нервовій системі. Кальцієві канали в нормальних фізіологічних умовах, коли концентрація позаклітинного кальцію становить приблизно 2 мМ, є високоселективними структурами по відношенню до іонів кальцію. Проте виявлено, що при зниженні зовнішньоклітинної концентрації двовалентних катіонів до мікромолярних значень або при повному їх усуненні кальцієві канали втрачають селективність і стають здатними пропускати деякі одновалентні катіони [1]. Також відомі факти про те, що в організмі можливе виникнення патологічних станів, при яких концентрація кальцію в зовнішньоклітинному мікрооточенні кальцієвих каналів може падати нижче фізіологічних значень [2]. Цілком імовірно, що за таких умов кальцієві канали можуть деякий час проводити одновалентні катіони, серед яких можуть бути іони калію. Тому вивчення калієвої проникності потенціалкерованих кальцієвих каналів, яка виникає при застосуванні безкальцієвого розчину, є актуальним, оскільки воно може дати більш детальне розуміння молекулярної природи та механізмів функціонування кальцієвих каналів, а також дозволити екстраполювати отримані результати на функціональний рівень організму при виникненні певних патологій у нервовій системі.

Матеріали та методи. Досліди проводили на ферментативно ізолюваних нейронах спінальних гангліїв щурів тритижневого віку лінії Вістар. Струми через потенціалкеровані кальцієві канали реєстрували методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” [3] з використанням підсилювача Dagan 3900A (США).

Для реєстрації калієвого струму через кальцієві канали застосовували зовнішньоклітинний розчин з калієм у концентрації 10 мМ, який не містив іонів Ca^{2+} та Na^+ . При дослідженні натрієвого струму, який проходив через потенціалкеровані кальцієві канали, використовували безкальцієвий розчин без іонів K^+ , який вміщував іони Na^+ в концентрації 10 мМ. Натрієву проникність кальцієвих каналів досліджували при використанні неселективного блокатора кальцієвих каналів кобальту, застосовуючи різницевий метод. Суть методу полягала в тому, що натрієвий струм через кальцієві канали отримували шляхом

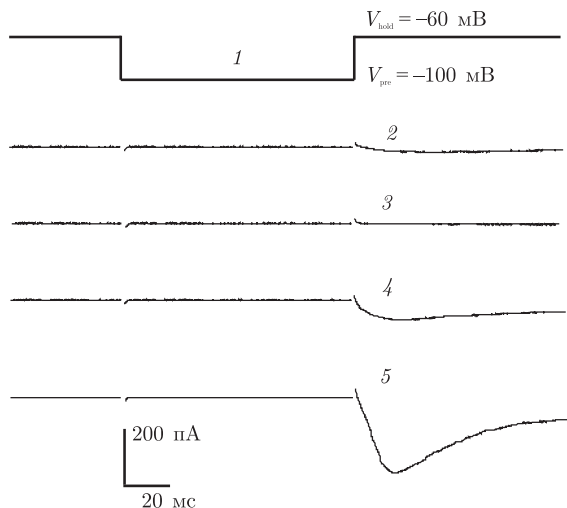


Рис. 1. Залежність амплітуди струму в безкальцієвому розчині від концентрації іонів K^+ : 1 — преімпульс, який застосовували для ініціації струмів; 2 — струм у контрольному розчині з 2 мМ Ca^{2+} та 10 мМ K^+ ; 3 — струм у безкальцієвому безкалієвому розчині; 4 — струм у безкальцієвому розчині, що містив 5 мМ K^+ ; 5 — струм у безкальцієвому розчині, що містив 10 мМ K^+ ; V_{hold} — підтримуваний потенціал; V_{pre} — амплітуда преімпульсу. Нейрон спінального ганглія щура

віднімання струму, що протікав через натрієві канали, за наявності кобальту в зовнішньоклітинному безкальцієвому розчині, від загального струму, який протікав через кальцієві та натрієві канали в безкальцієвому розчині без кобальту. Використання опосередкованого (різницевого) методу зумовлене наявністю стійких до дії тетродотоксину натрієвих каналів у мембрані соми нейронів спінальних гангліїв. Усі розчини, використані при даному дослідженні, містили 600 мкМ Mg^{2+} .

Результати та їх обговорення. Вхідні струми були виявлені після заміни контрольного розчину (який вміщував 2 мМ кальцію) на тестовий (безкальцієве середовище з 10 мМ калію), безпосередньо після закінчення преімпульсу амплітудою -100 мВ тривалістю 100 мс. Підтримуваний потенціал становив -60 мВ. При використанні безкальцієвого розчину амплітуда струмів зростала при збільшенні концентрації іонів калію (рис. 1).

Натрієву проникність кальцієвих каналів досліджували за допомогою вищезгаданого різницевого методу. Струми реєстрували при послідовних деполяризаційних зміщеннях мембранного потенціалу змінної амплітуди тривалістю 75 мс від підтримуваного потенціалу -100 мВ. Спочатку отримували натрієвий струм, який протікав через натрієві та кальцієві канали одночасно (рис. 2, а), в безкальцієвому розчині, що містив іони Na^+ .

Після додавання в зовнішній розчин кобальту (4 мМ) реєстрували натрієвий струм лише через натрієві канали (рис. 2, б). Взнявши різницю пар реєстрацій, які відповідали одному й тому ж зміщенню мембранного потенціалу, ми отримували натрієвий струм через потенціалкеровані кальцієві канали в безкальцієвому розчині (рис. 2, в). Вольтамперну характеристику кальцієвих каналів за таких експериментальних умов будували як залежність амплітуди різницевого натрієвого струму від амплітуди відповідного мембранного потенціалу, до якого зміщували підтримуваний потенціал (рис. 3).

Як і при застосуванні іонів калію в якості основних переносників заряду через потенціалкеровані кальцієві канали в безкальцієвому розчині, вольтамперна характеристика кальцієвих каналів, отримана при використанні іонів натрію, зазнавала зміщення в бік гіперпо-

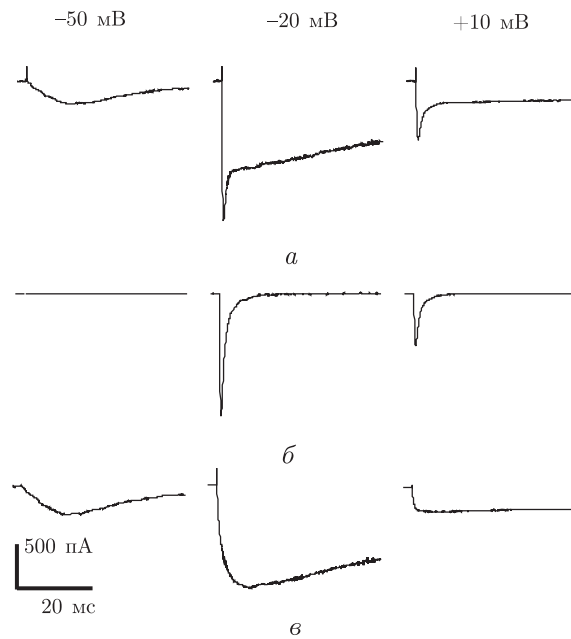


Рис. 2. Натрієвий струм через потенціалкервані кальцієві канали в безкальцієвому розчині: *a* — струми в безкальцієвому розчині з 10 мМ Na^+ ; *б* — струми в безкальцієвому розчині з 10 мМ Na^+ та 4 мМ Co^{2+} ; *в* — різниця між відповідними парами струмів з *a* та *б*. Вгорі вказано мембранні потенціали, при яких отримували дані струми. Підтримуваний потенціал -100 мВ. Нейрон спінального ганглія щура

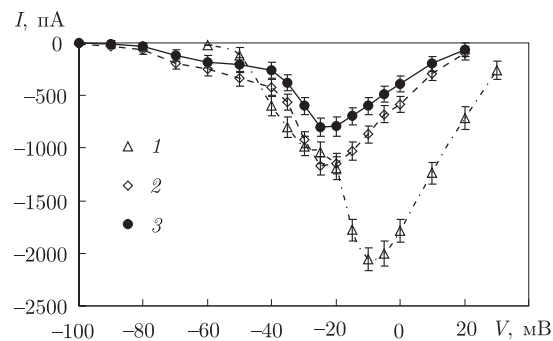


Рис. 3. Вольтамперні характеристики потенціалкерваних кальцієвих каналів нейронів спінальних гангліїв щурів, отримані при застосуванні позаклітинних розчинів різного іонного складу: *1* — контрольний розчин з 2 мМ кальцію; *2* — безкальцієвий розчин з 10 мМ Na^+ (різницева ВАХ); *3* — безкальцієвий розчин з 10 мМ K^+ ($n = 8$). Підтримуваний потенціал -100 мВ

ляризації приблизно на 15 мВ (рис. 3). Таке явище виникає внаслідок зміни поверхневого заряду мембрани клітини, оскільки вилучення іонів Ca^{2+} з зовнішнього середовища значною мірою знімає екранування негативних зарядів, які містить зовнішній бік клітинної мембрани. В результаті зменшується трансмембранна різниця потенціалів, через що полегшується активація потенціалкерваних іонних каналів. Така ситуація відображається у зміщенні вольтамперної характеристики каналів у бік гіперполяризації.

Порівнюючи результати досліджень при застосуванні розчинів з трьома типами проникаючих катіонів (Ca^{2+} , K^+ та Na^+), ми виявили, що амплітуда кальцієвого струму є най-

більшою серед амплітуд струмів, які переносились кожним типом катіонів через потенціалкеровані кальцієві канали, незважаючи на меншу концентрацію іонів кальцію (2 мМ). Водночас амплітуда калієвого струму є найменшою серед амплітуд струмів, які досліджувались у даній роботі (рис. 3). Імовірно, такі результати пов'язані зі специфікою самого кальцієвого каналу, призначеного для пропускання саме іонів Ca^{2+} , і з розподілом кристалічних радіусів обраних катіонів. Оскільки іон калію за розмірами більший за іони натрію та кальцію, то слід очікувати, що амплітуда калієвого струму буде меншою за амплітуди натрієвого та кальцієвого струмів.

Незважаючи на наявні знання про структуру та функції потенціалкерованих кальцієвих каналів, деякі питання, одним з яких є проблема селективності, залишаються нез'ясованими. Зокрема, в наш час залишається актуальною проблема зміни властивостей кальцієвих каналів у зовнішньоклітинних розчинах різного іонного складу.

Існує ряд захворювань, причиною виникнення яких є порушення функціонування кальцієвих каналів. Одним з таких захворювань є епілепсія. При дослідженні даної хвороби було виявлено, що в певних структурах кори головного мозку перед епілептичним нападом відбувається різке падіння зовнішньоклітинної концентрації кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) до значень порядку 0,45–0,55 мМ [2, 4], а під час самих нападів концентрація кальцію становить 1,2 мМ [5]. При іншому нервовому розладі — депресії, що поширюється, концентрація зовнішньоклітинного кальцію знижується до 0,08 мМ [6]. Очевидно, кальцієві струми повинні змінюватись при зниженні позаклітинної концентрації кальцію. Оскільки амплітуда кальцієвих струмів залежить від концентрації кальцію в зовнішньому середовищі, при зниженні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, що спостерігається при епілептичних нападах, кальцієвий струм повинен був би зменшитись. Проте, виявилось, що зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ може здійснювати збуджуючий ефект, імовірно, внаслідок зміни селективності кальцієвих каналів. Остання обставина може призводити до деполяризації мембрани і, як наслідок, опосередковувати збудження нейронів, що до цього знаходились у спокою.

Зважаючи на сказане, слід враховувати, що ситуації, в яких концентрація двовалентних катіонів у зовнішньоклітинному середовищі ставала б нижче нормального значення, можуть бути цілком реальними. Такі зміни, як правило, носять патологічний характер. Отже, можливість проникності кальцієвих каналів для одновалентних катіонів *in vivo* зовсім не виключена.

Останніми десятиліттями все частіше з'являються роботи, присвячені дослідженню структурних та функціональних особливостей селективного фільтру, воротного механізму та сенсору напруги потенціалзалежних кальцієвих каналів [7–9]. Так, при використанні методу заміщень амінокислот, що звернені всередину пори каналу, виявляється, що кальцієві канали перестають пропускати двовалентні катіони, проте одновалентні легко проникають через них. Можливо, маніпуляції з молекулярною структурою певних компонент каналу в кінцевому результаті можуть призвести до тих же наслідків у функціонуванні каналу, які ми мали змогу спостерігати у наших експериментах з використанням безкальцієвого розчину. Таким чином, проведене дослідження розкрило ще один аспект у селективних властивостях потенціалкерованих кальцієвих каналів.

1. Kostyuk P. G. and Krishtal O. A. Effects of calcium and calcium-chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusc neurones // J. Physiol. – 1977. – **270**. – P. 569–580.
2. Hablitz J. J., Heinemann U., Lux H. D. Step reduction in extracellular Ca^{2+} activate a transient inward current in chick dorsal root ganglion cells // Biophys J. – 1986. – **50**. – P. 753–757.

3. *Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflügers Arch.* – 1981. – **391**. – P. 85–100.
4. *Pumain R., Kurcewicz I., Louvel J.* Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes // *Science.* – 1983. – **222**. – P. 177–179.
5. *Pumain R., Menini C., Cheinermann U. et al.* Chemical synaptic transmission is not necessary for epileptic seizures to persist in the baboon *Papio papio* // *Exp. Neurol.* – 1985. – **89**. – P. 250–258.
6. *Hansen A. J., Zeuthen T.* Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex // *Acta Physiol. Scand.* – 1981. – **113**. – P. 437–445.
7. *Tang S., Mikala G., Bahinski A. et al.* Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**. – P. 13026–13029.
8. *Cibulsky S. M. and Sather W. A.* The EEEE locus is the sole high-affinity Ca^{2+} binding structure in the pore of a voltage-gated Ca^{2+} channel: block by Ca^{2+} entering from the intracellular pore entrance // *J. Gen. Physiol.* – 2000. – **116**. – P. 349–362.
9. *Wu X.-S., Edwards H. D., Sather W. A.* Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca^{2+} channel // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 31778–31785.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 07.04.2009

S. V. Korol, E. P. Kostyuk

Nonspecific currents through voltage-gated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons in calcium-free solution

Behavior of voltage-gated calcium channels of acute isolated rat dorsal root ganglion neurons in the absence of calcium ions in external solution has been investigated with the whole cell patch-clamp method. It was determined that such channels lose their selectivity and acquire the ability to pass inward potassium current in a calcium-free potassium-containing solution. Current-voltage characteristics of calcium, potassium and sodium currents flowed through voltage-gated calcium channels have been compared.