

УДК 577.352.465

А.В.Сударикова (6 курс, каф. ФХБК); Ю.А.Негуляев, д.б.н., в.н.с. ИНЦ РАН,
Е.А.Морачевская, к.б.н., с.н.с. ИНЦ РАН

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ ДЛЯ ИОНОВ МАГНИЯ

Ионы магния имеют большое значение для многих клеточных процессов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки и пролиферации, включая мембранный транспорт и функционирование ферментных систем. Известно, что ионы магния модулируют работу важнейших энергозависимых транспортеров (Na, K-АТФаза, Ca-АТФаза) и ионных каналов клеточных мембран, влияют на синтез белков и липидный обмен, участвуют в подготовке клеток к синтезу ДНК и делению, а также непосредственно в репликации ДНК. Существующее на сегодняшний день понимание проблем транспорта магния и его регуляции сводится к тому, что магний может поступать в клетку по градиенту концентрации и выводиться через $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -обменник [1]. Остается открытым вопрос, какие мембранные механизмы опосредуют вход Mg^{2+} из внешней среды в цитоплазму и, в частности, какова роль ионных каналов в обеспечении магниевого баланса. Традиционно магний рассматривался как регулирующий фактор: в многочисленных исследованиях получены данные об ингибирующем действии ионов Mg^{2+} на различные типы ионных каналов, в том числе и механочувствительных [2]. В то же время сведения о проницаемости ионных каналов плазматической мембраны для Mg^{2+} крайне ограничены. Механочувствительные каналы, относящиеся к семейству катион-селективных, были ранее идентифицированы в клетках K562 [1, 4], охарактеризованы их проводящие и воротные свойства. **Задача** данной работы заключалась в том, чтобы с помощью прямых измерений ионных токов оценить, проницаемы ли механочувствительные каналы для ионов магния.

Клеточная культура. Клетки миелоидной лейкемии человека K562 (Всероссийская коллекция клеточных культур, ИНЦ РАН) культивировали на среде RPMI-1640, с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. За 2-4 дня до эксперимента клетки высевали на покровные стекла размером 4×4 мм.

Электрофизиология. Для регистрации ионных токов через одиночные каналы плазматической мембраны использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp). Стекланные пипетки изготавливали на микрокузнице МЭ-4. При заполнении раствором они имели сопротивление 5-25 МОм. С входной головки преобразователя ток-напряжение (сопротивление обратной связи 20 ГОм) сигнал поступал на высокоомный операционный усилитель (Burr-Brown OPA-128), далее записывался на жесткий диск компьютера через 12-разрядный аналого-цифровой преобразователь (L-card, Москва). Для активации механочувствительных каналов использовали известный способ механической стимуляции участка плазматической мембраны клеток посредством уменьшения гидростатического давления в регистрирующей пипетке (suction).

Основные результаты работы. Для исследования возможной проницаемости механочувствительных каналов в клетках K562 для ионов Mg^{2+} были проведены эксперименты в конфигурации cell-attached, в которых механозависимые токи регистрировали при различных концентрациях магния с наружной стороны плазматической мембраны: в присутствии 90 (n=52), 20 (n=38) и 2 (n=4) mM MgCl_2 в регистрирующей пипетке. В контрольных экспериментах было показано, что большие органические катионы,

в частности, TRIS^+ и NMDG^+ , не проникают через исследуемые каналы. Для поддержания тоничности растворов, содержащих 90, 20 и 2 мМ MgCl_2 , остальные катионы были заменены на непроницающие катионы NMDG^+ . Было обнаружено, что в 52 % ($n=94$) стабильных патчей с раствором в пипетке, содержащим ионы магния, в качестве единственного потенциально проникающего катиона, присутствовали механозависимые токи (рис.1). Во всем диапазоне исследуемых потенциалов наблюдали токи как входящего, так и выходящего направления. Входящие токи были обусловлены переносом ионов магния, а выходящие токи – переносом одновалентных внутриклеточных катионов, скорее всего калия.

Вольт-амперные характеристики, измеренные в достаточно широком диапазоне напряжений, отклонялись от линейности по типу выходящего выпрямления и были описаны линейной зависимостью отдельно для входящих и выходящих токов. В присутствии MgCl_2 в концентрации 2 мМ проводимость для входящих токов составила около 5 пСм. При увеличении концентрации магния во внеклеточном растворе до 20 или 90 мМ мы наблюдали лишь незначительное повышение проводимости: при 20 мМ MgCl_2 проводимость составляла 6.8 ± 0.5 пСм. Таким образом, для токов, переносимых ионами Mg^{2+} , имеет место выраженный эффект насыщения, по-видимому, обусловленный связыванием этих ионов с анионным локусом, характеризующимся константой диссоциации для Mg^{2+} около 1 мМ. Значения проводимости для выходящих токов были близки к регистрируемым в нормальных ионных условиях (Na^+ – основной внеклеточный катион). Так, при 20 мМ MgCl_2 в пипетке проводимость одиночного канала для токов, переносимых ионами K^+ , составляла 11.3 ± 1.0 пСм.

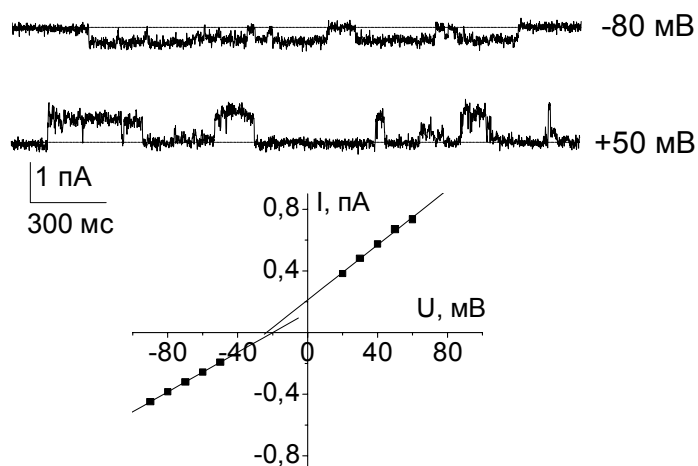


Рис. 1. Записи токов через механочувствительные каналы на участке мембраны (отведение cell-attached; 20 мМ MgCl_2 в пипетке) и соответствующая вольт-амперная характеристика.

Проведенные эксперименты по измерению ионных токов однозначно свидетельствуют, что механочувствительные каналы проницаемы для ионов магния, причем как при физиологических, так и при более высоких концентрациях MgCl_2 в растворе с наружной стороны мембраны. Полученные количественные данные позволяют оценить значения относительной проницаемости и проводимости одиночного канала для уровня внеклеточного магния в пределах 2 мМ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. P.V. Flatman. Annu. Rev. Physiol. 1991 53: 259-271.
2. Small D.L., Morris C.E. 1995. J. Exp. Biol. 198: 1919-1929.

