

УДК 577.352.53

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛИЯ В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ

© 2021 г. В. Л. Замойский<sup>1,\*</sup>, Е. В. Бовина<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН С. О. Бачурин<sup>1</sup>, В. В. Григорьев<sup>1</sup>

Поступило 11.04.2021 г.  
После доработки 22.05.2021 г.  
Принято к публикации 23.05.2021 г.

Методом patch-clamp в конфигурации whole cell показано, что ионы внешнего калия играют важную роль в регулировании кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК). Показана четкая зависимость проводимости КАХК от изменений концентрации ионов калия с наружной стороны мембраны клетки. Влияние, оказываемое калием на проводимость КАХК в диапазоне 0–15 мМ, существенно больше, чем влияние, вызываемое им на другие ионные токи – натриевые или калиевые. Есть основания полагать, что такое изменение проводимости КАХК может вносить свой вклад в патофизиологические процессы, характерные для гипокалиемии и гиперкалиемии.

*Ключевые слова:* метод patch-clamp, клетки Пуркинье мозжечка, кальций-активируемые хлорные каналы (КАХК), ионы калия

DOI: 10.31857/S2686738921050334

Вопрос регуляции кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК) является весьма актуальным в свете значительного участия КАХК во многих важнейших физиологических и патофизиологических процессах в организме млекопитающих, в том числе и человека. Доказана роль КАХК в механизмах гипертонии, астмы, муковисцидоза, ноцицепции, нарушении функционирования желудочно-кишечного тракта, урологических патологиях [1–4], замедлении рефлексов и нарушении умственных процессов [5]. Ряд симптомов указывают на то, что нарушения в работе КАХК могут лежать в основе ряда клинических проявлений гипокалиемии [6, 7] и гиперкалиемии [8].

Хотя установлены некоторые механизмы взаимодействия КАХК с различными клеточными сигнальными путями [9], многие другие возможные механизмы регуляции КАХК остаются неисследованными.

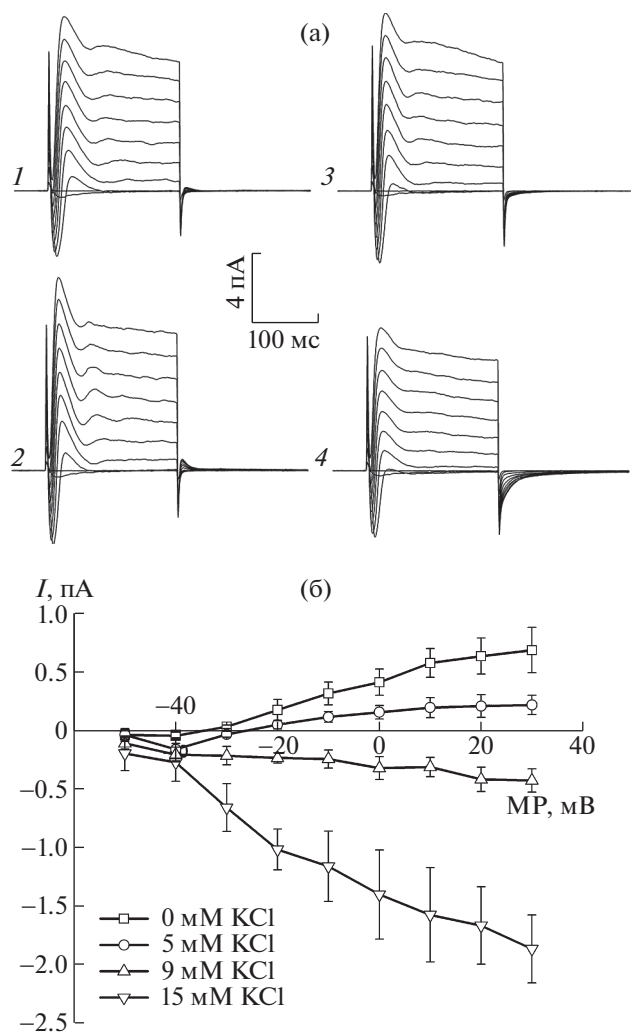
Целью данной работы было исследование роли эндогенных электролитов, а именно, ионов

калия в регуляции токов КАХК. Как известно, калий играет важнейшую роль в физиологических процессах, и даже незначительные изменения в концентрации его ионов в крови или спинно-мозговой жидкости приводят к весьма существенным патофизиологическим процессам, описываемым терминами гипокалиемия и гиперкалиемия.

В результате установлено, что ионы калия с наружной стороны клеточной мембраны играют важную роль в регулировании кальций-активируемых хлорных токов. Показана четкая зависимость амплитуды и потенциала реверсии хлорных токов от изменений концентрации наружного калия. Изменения в работе кальций-активируемых хлорных каналов существенно больше, чем изменения, оказываемые теми же концентрациями наружного калия на другие ионные каналы – натриевые или катионные (калиевые). Есть основания полагать, что изменение амплитуд хлорных токов вносит свой вклад в патофизиологические процессы, характерные для гипокалиемии и гиперкалиемии.

Исследования осуществляли электрофизиологическим методом на свежeweделенных нейронах Пуркинье из мозжечка (12–15 дней) мозга крыс самцов линии Вистар ( $n = 19$ ). Выделение единичных нейронов проводили ферментно-меха-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Черноголовка, Московская область, Россия  
\*e-mail: vzam@yandex.ru



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду хлорных токов. а – Кривые записи токов при разных концентрациях калия (потенциал фиксации  $-70$  мВ): 1–5 мМ, 2–0 мМ, 3–9 мМ, 4–15 мМ; б – графики амплитуды хлорных токов при различных концентрациях калия (потенциал фиксации  $-70$  мВ). По оси ординат – величина тока в пА; по оси абсцисс – уровень мембранного потенциала в мВ.

ническим способом [10]. Трансмембранные токи отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации на целой клетке (whole-cell) с помощью прибора ЕРС-9 (“НЕКА”, Германия) [11]. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (“НЕКА”, Германия).

В экспериментах использовали физиологический раствор, содержащий 140 мМ NaCl (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, HEPES 10 мМ, рН 7.36, осмолярность 305 мосм), в микропипетке–электроре – раствор, содержащий 140 мМ KCl (140 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, EGTA 11 мМ, HEPES 10 мМ, K<sub>2</sub>ATP 5 мМ, рН 7.2, осмолярность 285 мосм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При потенциале фиксации  $-70$  мВ в ответ на нарастающие ступени деполяризующих импульсов по  $+10$  мВ регистрировались ионные токи от целой клетки, состоящие из токов положительной и отрицательной полярности (рис. 1а).

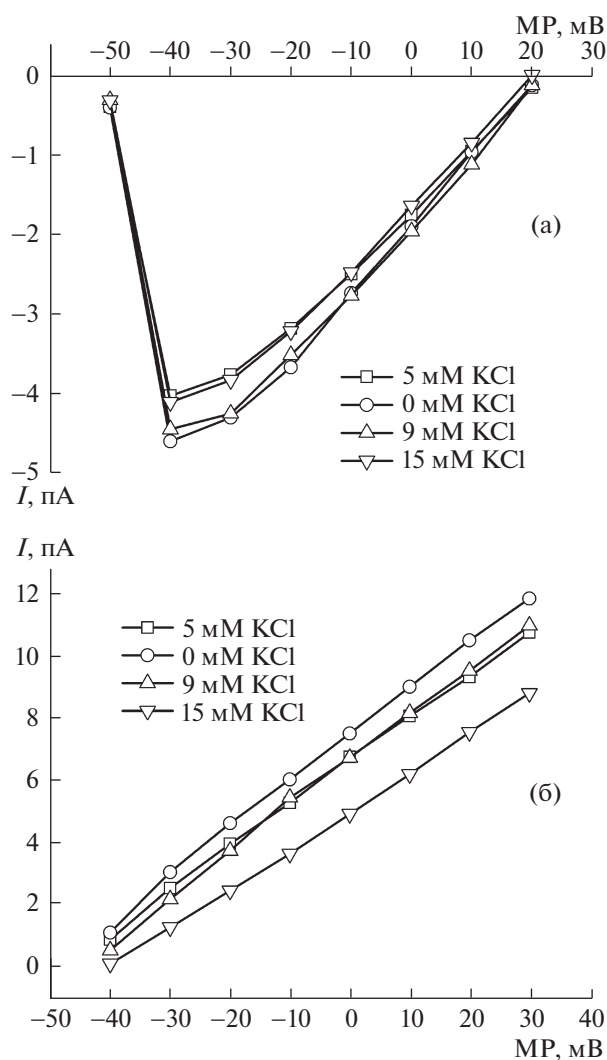
Такие ответы соответствуют классическим представлениям: быстрый, входящий в клетку ток ионов натрия, вызывающий деполяризацию мембраны, и выходящие токи, переносимые ионами калия, компенсирующими деполяризацию на мембране.

По окончании каждого тестового импульса, в зависимости от ионных условий, можно было регистрировать небольшой ток, направленный “вверх” от базовой линии. Максимальная величина этого тока обычно не превышала 100–300 пА. При потенциале на мембране ниже  $-20$  мВ этот ток реверсирует, приобретает входящее направление, однако его амплитуды не превышали 50–80 пА. В предыдущих исследованиях нами было показано, что этот ток является кальций-активируемым хлорным током [12–14]. Уменьшение наружной концентрации ионов калия вело к увеличению (или к появлению, в случае отсутствия при 5 мМ) этого выходящего тока, который достигал максимальных значений (до 1.8 нА) при 0 мМ калия (рис. 1а, 1б). Увеличение концентрации внешнего калия свыше 5 мМ вело к сдвигу потенциала реверсии тока в область  $-60$  мВ на мембране клетки. При концентрации калия порядка 7 мМ происходила полная реверсия направления тока, который становился входящим. На графике видно, что амплитуда входящего тока увеличивалась значительно при увеличении калия до 9 мМ, а особенно она вырастала при увеличении калия до 15 мМ (рис. 1а, 1б). Было также установлено, что амплитуды и проводимость этого тока незначительно зависят от потенциала фиксации: при  $-40$  мВ токи имели несколько большую амплитуду, чем при  $-70$  мВ, а при  $-100$  мВ токи были немногим меньше, чем при  $-70$  мВ.

В то же время влияние изменений в концентрации внешнего калия на входящие быстрые натриевые токи (рис. 2А) и на выходящие (преимущественно, калиевые) токи (рис. 2Б) было незначительным и не превышало 20%.

Наши исследования показали, что изменения в концентрации внешнего калия приводят к существенному изменению амплитуды и проводимости хлорного тока через КАХК. Изменения в работе КАХК существенно больше, чем изменения, оказываемые теми же концентрациями наружного калия на другие ионные каналы – натриевые или катионные (калиевые). Это указывает на то, что калий осуществляет более избирательное действие на токи КАХК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существует избирательное влияние некоторых



**Рис. 2.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду входящих и выходящих токов в нейронах Пуркинью. а – график зависимости амплитуды быстрых натриевых токов от концентрации калия (потенциал фиксации –70 мВ); б – график зависимости амплитуды выходящих (преимущественно, калиевых) токов от концентрации калия (потенциал фиксации –70 мВ).

экстраклеточных катионов и анионов на другие ионные каналы. Хорошо известным фактом является четкая зависимость активации целого ряда каналов – калиевых, хлорных и других – от концентрации внутриклеточного кальция. О влиянии каких-либо экстраклеточных ионов на каналы, проводящие отличные от них ионы, известно крайне мало.

Ранее нами показана зависимость быстрых натриевых токов в нейронах Пуркинью от концентрации наружного хлора [15]. Изложенные в этой статье (и ранее) результаты позволяют говорить о

том, что наряду с внутриклеточной регуляцией кальцием в нейронах имеется значительное влияние ряда ключевых ионов – калия, хлора – на функционирование соседних каналов (и проводимых ими токах), осуществляемое ими с наружной стороны мембраны, т.е. концентрациями этих ионов в межклеточной (спинномозговой) жидкости.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00378) и Государственного задания 2019–2020 гг. (тема № 0090-2019-0005).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunzelmann K., Tian Y., Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Ousingsawat J., Thevenod F., Roussa E., Rock J., Schreiber R. // *Pflügers Arch.*, 2011. V. 462. P. 195–208.
2. Kamaledin M.A. // *J. Cell Physiol.*, 2018. V. 233. P. 787–798.
3. Ji Q., Guo S., Wang X., Pang C., Zhan Y., Chen Y., An H. // *J Cell Physiol.* 2019. V. 234. P. 7856–7873.
4. Григорьев В.В. // *Биомедицинская химия.* 2021. Т. 67. № 1. С. 17–33.
5. Huang W.C., Xiao S., Huang F., Harfe B.D. et al. // *Neuron.* 2012. V. 12. № 74(1). P. 179–192.
6. Guo S., Chen Y., Pang C., Wang X., Qi J., Mo L., Zhang H., An H., Zhan Y. // *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 2017. V. 469. P. 681–692.
7. Yu K., Whitlock J.M., Lee K., Ortlund E.A., Cui Y.Y., Hartzell H.C. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e06901.
8. Wang B., Li C., Huai R., Qu Z. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2015. V. 82. P. 22–32.
9. Crottès D., Jan L.Y. // *Cell Calcium.* 2019. V. 82. P. 102050.
10. Kaneda M., Nakamura H., Akaike N. // *Neurosci. Res.* 1988. V. 5. P. 299–315.
11. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. // *Pflügers Arch.* 1981. V. 391. P. 85–100.
12. Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В., Бачурин С.О. // *ДАН*, 2015. Т. 465, С. 372–374.
13. Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В. // *БЭБМ*, 2016. Т. 162, С. 672–677.
14. Замойский В.Л., Вихарева Е.А., Григорьев В.В., Бачурин С.О. // *ДАН*, 2016. Т. 470. С. 347–349.
15. Замойский В.Л., Григорьев В.В. // *ДАН*, 2017. Т. 477. С. 493–495.

**ROLE OF POTASSIUM IONS IN REGULATION  
OF CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS****V. L. Zamoyski<sup>a,#</sup>, E. V. Bovina<sup>a</sup>, Correspondent-Member of the RAS S. O. Bachurin<sup>a</sup>, and V. V. Grigoriev<sup>a</sup>***<sup>a</sup> Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,  
Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation**<sup>#</sup>e-mail: [vzam@yandex.ru](mailto:vzam@yandex.ru)*

Using the patch-clamp method, in the whole cell configuration, it was shown that external potassium ions play an important role in the regulation of calcium-activated chloride channels (CaCC). A clear dependence of conductivity of the CaCC in dependence of external potassium concentration was shown. The effect of external potassium in range 0–15 mM on the conductivity of chloride channels was significantly greater than the effect it has on other ionic currents—sodium or potassium. There is reason to believe that these changes in the conductivity of CaCC may contribute the development of pathophysiological processes like hypokalemia or hyperkalemia.

*Keywords:* patch-clamp method, Purkinje cells of the rat cerebellum, calcium-activated chloride channels (CaCC), potassium ions