

ЗАВИСИМОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БЫСТРЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ ОТ ЛИПИДНОГО СОСТАВА КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ С1300

Изучали функциональные характеристики быстрых натриевых каналов, модифицированных с помощью липосом дифференцированных клеток нейробластомы*. Использовали клетки с повышенным на 60% общим содержанием холестерина. В клетках обнаружен лизолецитин, в лецитине увеличивалось количество полиненасыщенных жирных кислот.

Установлено, что вератрин, добавленный в культуральную среду обогащенных холестерином клеток, увеличивал скорость выхода $^{86}\text{Rb}^+$ в большей степени, чем в контрольных клетках. При изучении температурной зависимости активированного вератрином транспорта Rb^+ в интактных и модифицированных лецитин-холестериновыми липосомами клетках было показано, что активированный вератрином выход Rb^+ более чувствителен к температурным изменениям, чем не активированный. При этом в клетках, модифицированных лецитин-холестериновыми липосомами, он выше, чем в интактных.

Липиды, входящие в состав плазматических мембран, играют наряду со структурной важную функциональную роль в жизнедеятельности клетки. Они регулируют многие ферментативные, рецепторные и транспортные системы [1—5]. В частности, у мутантных клеток *Paramecium tetraurelia* с измененным соотношением фосфолипидов в плазматической мембране нарушается функция потенциалзависимых натриевых и кальциевых каналов [6]. В клетках клональной линии феохромоцитомы, содержащей фосфолипиды, обогащенные ненасыщенными жирными кислотами, активация потенциалзависимых натриевых каналов уменьшается [7]. Показано также, что относительно небольшие изменения содержания холестерина в мембранах клеток различных органов млекопитающих приводят к глубоким изменениям функции мембранных белков. В частности, в опытах *in vitro* на сердце молодых собак было обнаружено значительное изменение электрофизиологических характеристик спонтанно генерируемых потенциалов действия в волокнах Пуркинье с повышенным содержанием холестерина [8]. Приведенные результаты позволяют предположить, что липиды и в том числе холестерин — один из основных компонентов клеток нейробластомы С1300 [9] — могут играть значительную роль в осуществлении специфической нейрональной функции — транспорта ионов через быстрые натриевые каналы. Для проверки этого предположения изучали пассивный транспорт рубидия через активированные вератрином натриевые каналы дифференцированных клеток нейробластомы С1300, модифицированных липосомами.

Материалы и методы

О функции быстрых натриевых каналов судили по выходу $^{86}\text{Rb}^+$ из предварительно нагруженных изотопом дифференцированных клеток. Дифференцировку индуцировали добавлением в культуральную среду 5'-бромдезоксинуридина в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М. Подготовку клеток к эксперименту проводили, как описано ранее [10]. Для предварительной нагрузки изотопом клетки вначале выдерживали в течение 45 мин в бессывороточной среде, содержащей $3-5 \cdot 10^6$ имп/мин $^{86}\text{Rb}^+$. Затем в части флаконов среду заменяли взвесью липосом с тем же количеством изотопа и продолжали инкубацию еще в течение 0,5 ч. После этого каждый флакон трижды промывали средой Игла (по 3 мл), заливали по 3,5 мл той же среды и клетки инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени, обозначенные на графиках, отбирали аликвоты по 100—150 мкл. Радиоактивность проб измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «SL-4000» (Франция). После отбора последней аликвоты остаток среды немедленно сливали, а во флакон Карреля вносили раствор версена для открепления клеток. Отбирая соответствующие аликвоты, проводили расчет содержания $^{86}\text{Rb}^+$,

* Клетки нейробластомы С1300 адаптированы в среде Игла Т. Н. Игнатовой в Ин-те цитологии АН СССР, Ленинград.

оставшегося в клетках, что позволило рассчитать суммарную нагрузку изотопом. Температурную зависимость контрольного и активированного вератрином выхода $^{86}\text{Rb}^+$ изучали при 4, 14, 23, 31 и 37 °С [11].

Липосомы готовили, как описано в предыдущей работе [12]. Перед экспериментом из флаконов Карреля сливали питательную среду и клетки (3–4 млн), содержащие $\approx 0,4$ мкмоль суммарных липидов, заливали 3 мл взвеси липосом, содержавших эквимольные количества (около 4 мкмоль на мл взвеси) лецитина и холестерина. Инкубацию проводили при 37 °С. Через 1 ч клетки отмывали от липосом бессолевой средой Игла и использовали в эксперименте. Экстракцию и определение липидов в клетках проводили, как описано ранее [9].

Результаты и обсуждение

В опыте использованы intactные и обогащенные холестерином клетки. Клетки, обогащенные холестерином, характеризуются также относительным увеличением количества полиненасыщенных жирных кислот в молекулах лецитина и появлением лизолецитина (см. таблицу).

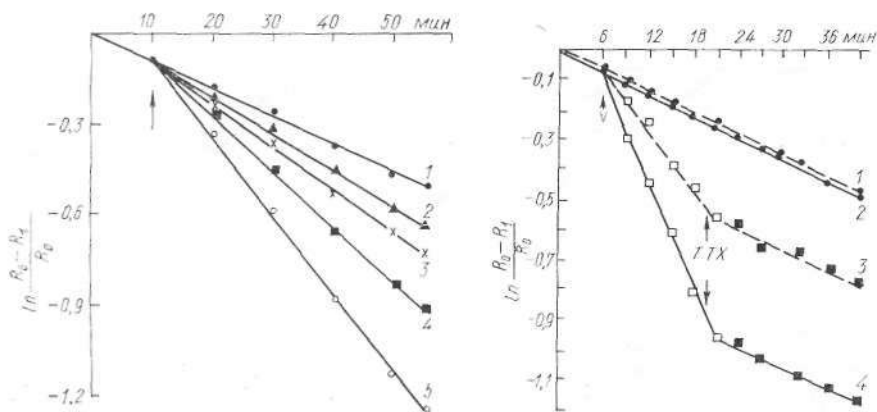


Рис. 1. Активация вератрином выхода Rb^+ из предварительно нагруженных изотопом дифференцированных клеток нейробластомы С1300 при 20 °С.

1 — контроль, 2 — вератрин 90, 3 — 170, 4 — 690, 5 — 1030 мкг/мл среды. R_0 — общее количество поглощенного изотопа, R_1 — выход изотопа в данную единицу времени.

Рис. 2. Влияние тетродотоксина на активированный вератрином выход $^{86}\text{Rb}^+$ из intactных и обогащенных холестерином клеток нейробластомы С1300.

1 — intactные клетки, 2 — обогащенные холестерином, 3 — действие вератрина (V; 680 мкг/мл среды) и тетродотоксина (TTX; 5·10⁻⁷ М) на intactные клетки, 4 — клетки, не обогащенные холестерином. Моменты внесения препаратов обозначены стрелками.

На рис. 1 представлены результаты исследования влияния дозы вератрина на процесс активированного им транспорта Rb^+ через быстрые натриевые каналы. Вератрин в дозах 90, 170, 690, 1030 мкг/мл культуральной среды в условиях данного эксперимента при комнатной температуре увеличивал выброс Rb^+ из клеток в 1,3, 1,5, 2,0 и 3,0 раза соответственно. Для дальнейшей работы была избрана доза 690 мкг вератрина на 1 мл среды, активировавшая при комнатной температуре выброс Rb^+ из клетки в 2 раза.

На рис. 2 представлены результаты изучения активированного вератрином транспорта рубидия в модифицированных лецитин-холестериновыми липосомами клетках при 27 °С. Видно, что вератрин, добавленный в культуральную среду контрольных клеток, ускоряет выход Rb^+ в 3,5 раза. В клетках, обогащенных холестерином, этот выход в аналогичных условиях ускоряется в 5 раз. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что в клетках, обогащенных холестерином, активированный вератрином транспорт ионов через быстрые натриевые каналы ускоряется в большей степени, чем в контрольных. Тетродотоксин в обоих случаях полностью снимает активирующее влияние вератрина. Таким образом, полученные результаты подтверждают выводы других авторов о том, что липидное окружение оказывает заметное влияние на работу молекул, ответственных за генерацию потенциала действия [6, 7].

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению температурной зависимости пассивного и активированного вератрином транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ в интактных и модифицированных лецитин-холестериновыми липосомами клетках нейробластомы (рис. 3). Видно, что при 4°C вератрин не активировал быстрые натриевые каналы, и скорость выхода

изотопа при этой температуре практически не отличалась от контрольной величины. При 14°C в интактных клетках увеличение скорости выхода радиоактивного изотопа под влиянием вератрина происходило лишь в 1,1 раза, т. е.

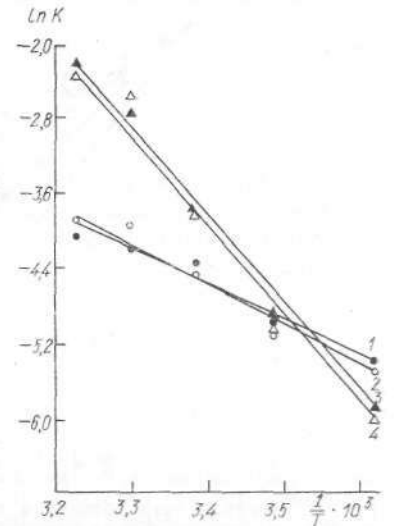
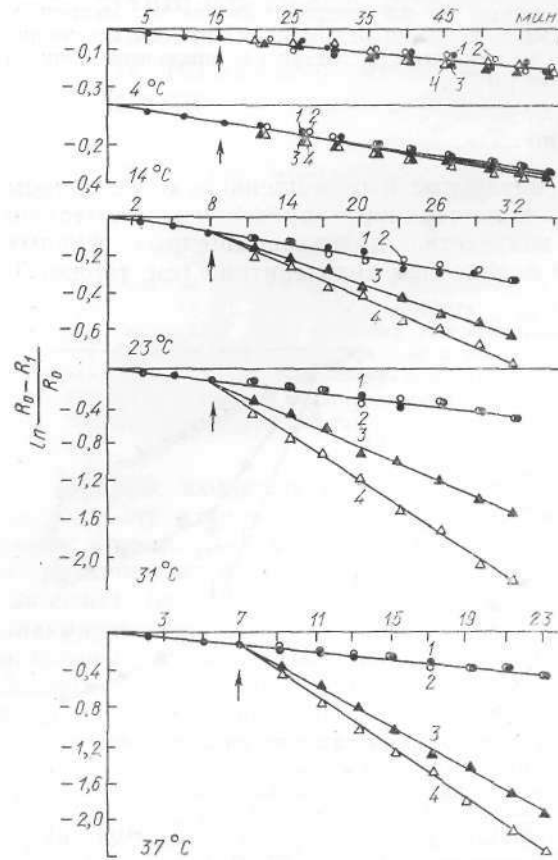


Рис. 3. Температурная зависимость скорости пассивного и активированного вератрином транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ из нагруженных изотопом интактных и модифицированных липосомами клеток.

1 — контрольные клетки, 2 — модифицированные лецитин-холестериновыми липосомами, 3 — контрольные клетки+вератрин, 4 — модифицированные клетки+вератрин. Стрелкой указано время введения вератрина.

Рис. 4. График Аррениуса температурной зависимости скорости пассивного и активированного вератрином выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из предварительно нагруженных изотопом контрольных и модифицированных липосомами клеток.

1 — контрольные клетки, 2 — модифицированные лецитин-холестериновыми липосомами, 3 — контрольные клетки+вератрин, 4 — модифицированные клетки+вератрин.

практически также не отличалось от контроля. В клетках, обогащенных холестерином, увеличение скорости выхода Rb^+ под влиянием вератрина было несколько выше. При 23°C вератрин активировал скорость выхода Rb^+ через быстрые натриевые каналы по сравнению с контролем в 2,3 раза в интактных и в 2,9 раз в модифицированных клетках. При 31° и 37°C эти увеличения скорости составляли соответственно 5 и 5,6; 6,1 и 7,5 раз. Очевидно, активированный вератрином выход Rb^+ является гораздо более чувствительным к температурным изменениям, чем не активированный. При этом в клетках, обогащенных холестерином, он выше, чем в интактных. Результаты данных исследований, представленные в виде графика Аррениуса на рис. 4, позволили рассчитать энергию активации для пассивного и активированного вератрином транспорта Rb^+ в интактных и обогащенных холестерином клетках, составляющую для пассивного транспорта величины

7,0 и 8,5 ккал/моль соответственно. Для активированного вератрином транспорта — 18,91 и 18,85 ккал/моль.

Увеличение скорости выхода изотопа в модифицированных клетках по сравнению с интактными при неизменном уровне энергии активации данного процесса позволяет предполагать, что в модифицированных клетках при аналогичных условиях активируется большее количество ионных каналов. Не исключено также, что облегчается процесс связывания вератрина с канальным белком в модифицированных клетках.

Содержание липидов в клетках нейробластомы C1300 после инкубации в течение 1 ч с лецитин-холестериновыми липосомами ($M \pm m$, $n=5-7$)

Клетки	Холестерин			Фосфолипиды		Жирные кислоты лецитина (% от их общего содержания)	
	нмоль на 10^6 клеток					насыщенные	ненасыщенные
	общее содержание	свободный	этерифицированный	общее содержание	лизолецитин		
Контроль	$15,55 \pm 0,86$	$11,91 \pm 0,8$	$3,64 \pm 0,3$	$33,65 \pm 3,55$	—	33,3	66,7
Инкубация с лецитин-холестериновыми липосомами	$24,82 \pm 1,28^*$	$17,06 \pm 0,93^*$	$7,76 \pm 0,88^*$	$39,14 \pm 3,82$	$4,24 \pm 0,82$	31,3	68,7

* — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,01$.

Полученные нами результаты не позволяют говорить о том, какое именно изменение (или сумма изменений) в липидном составе клеток ответственно за повышение активации вератрином ионного транспорта через быстрые натриевые каналы. Это может быть связано с повышением уровня холестерина — одного из основных липидных компонентов клеток нейробластомы. Однако возможно, что наблюдаемый эффект зависит от появления в составе клеток лизолецитина или изменения соотношения жирных кислот в молекулах фосфолипидов. В литературе имеются сведения о том, что лизофосфолипиды и жирные кислоты могут оказывать влияние на связывание нейротоксинов в соответствующих рецепторах молекул ионных каналов [13, 14]. Это в свою очередь может сказываться на влиянии токсинов на работу каналов.

Следует отметить также, что отсутствие перегиба графика Аррениуса при 20 °C свидетельствует о том, что, по-видимому, данные процессы осуществляются без существенных конформационных изменений структур, принимающих участие в транспорте ионов.

N. M. Gulaya, G. L. Volkov, V. K. Lishko, N. N. Goussieva, E. P. Klimenko

DEPENDENCE OF FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF FAST SODIUM CHANNELS ON THE LIPID COMPOSITION OF NEUROBLASTOMA C1300 CELLS

Summary

The paper deals with functional characteristics of fast sodium channels modified by liposomes of differentiated neuroblastoma cells. Cells with a 60% increased total cholesterol content were used. The cells were found to contain lysolecithin. In lecithin the amount of polyunsaturated fatty acids was enhanced.

It is established that veratrin added to the culture medium of cholesterol-enriched cells increased the rate of ^{86}Rb release to a greater extent than in the control cells. When studying the temperature dependence of veratrin-activated transport of Rb^+ in the intact and lecithin-cholesterol-liposomes-modified cells it was shown that the veratrin-activated Rb^+ release is more sensitive to temperature fluctuations than nonactivated one. In this case it is higher in lecithin-cholesterol-liposomes-modified cells than in intact ones.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

1. Ginsberg B. H., Jabour J., Spector A. A. Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—690, N 1.—P. 157—164.
2. Phospholipid modification retards intracellular transport and secretion of immunoglobulin G1 by mouse MOP8-31C plasmacytoma cells / A. Nakano, M. Maeda, M. Nishijima, I. Akamatsu // *Ibid.*—1982.—692, N 2.—P. 177—187.
3. Hirata F., Axelrod J. Phospholipid methylation and biological signal transmission // *Science.*—1980.—209, N 6641.—P. 1082—1091.
4. Effect of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine enrichment on the structure and function of yeast membrane / A. Trivedi, S. Khare, G. S. Singhal, R. Prasad // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—692, N 2.—P. 202—210.
5. Wilkening P., Nirenberg M. Lipid requirement for long-lived morphine-dependent activations of adenylate cyclase of neuroblastoma X glioma hybrid cells // *J. Neurochem.*—1980.—34, N 2.—P. 321—326.
6. Mutational alteration of membrane phospholipid composition and voltage-sensitive ion channel function in *Paramecium* / M. Forte, Y. Satow, D. Nelson, C. Kung // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 11.—P. 7195—7199.
7. Williams T. P., McGree R. The effects of membrane fatty acid modification of clonal pheochromocytoma cells on depolarisation-dependent exocytosis // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 7.—P. 3491—3501.
8. Enzymatic and electrophysiological changes of the function of membrane proteins by cholesterol / S. G. A. Alivisatos, C. Papastavrou, E. Dronka-Liapati et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1977.—79, N 3.—P. 677—683.
9. Изменение липидного состава клеток мышинной нейробластомы C1300 в процессе дифференцировки / Н. М. Гулая, Г. Л. Волков, Н. Н. Говсева, И. П. Артеменко, Н. А. Латышев // *Укр. биохим. журн.*—1984.—56, № 6.—С. 677—681.
10. Транспорт Rb^+ через активированные натриевые каналы клеток нейробластомы клона № 18Ф1 / В. К. Лышко, Н. М. Гулая, Г. Л. Волков, Н. Н. Говсева // *Там же.*—1981.—55, № 6.—С. 657—661.
11. Palfrey C., Littauer U. Z. Sodium-dependent efflux of K^+ and Rb^+ through the activated sodium channel of neuroblastoma cells // *Biochim. et biophys. acta.*—1976.—72, N 1.—P. 209—215.
12. Модификация липидного состава клеток нейробластомы C1300 с помощью липосом / Н. М. Гулая, Г. Л. Волков, Н. Н. Говсева, И. П. Артеменко // *Укр. биохим. журн.*—1986.—58, № 1.—С. 000
13. Baumgold J. 3H -Saxtoxin binding to nerve membranes: inhibition by phospholipase A_2 and by unsaturated fatty acids // *J. Neurochem.*—1980.—34, N 2.—P. 327—334.
14. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from Electrophorus electricus electroplax membranes / W. S. Agnew, S. R. Levinson, J. S. Brabson, M. A. Raftery // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75, N 3.—P. 2606—2610.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина
АН УССР, Киев

Получено 30.04.85

УДК 577.352:465

А. П. ЧАНТУРИЯ, С. Л. МИРОНОВ, Ю. В. СОКОЛОВ

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КАНАЛА, ОБРАЗУЕМОГО α -ЛАТРОТОКСИНОМ В БИСЛОЙНОЙ ФОСФОЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ

Получены вольт-амперные характеристики канала, который образует α -латротоксин при встраивании в бислойную липидную мембрану, разделяющую растворы различного ионного состава. Они использованы для определения параметров двухбарьерной модели энергетического профиля этого канала. Показано, что селективность таких каналов основана на тех же принципах, что и у кальциевых каналов биологических мембран и определяется, в основном, связыванием ионов внутри канала. Сродство к каналу для проникающих ионов щелочноземельных металлов уменьшается в последовательности $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} \approx Ba^{2+}$, а блокирующая способность катионов переходных металлов увеличивается в ряду $Mn^{2+} < Zn^{2+} \ll Ni^{2+} \ll Co^{2+} < Cd^{2+} \ll La^{3+}$. Канал пропускает также и одновалентные катионы, причем его проницаемость зависит от концентрации двухвалентных ионов с цис-, но не с транс-стороны мембраны.

Изучение молекулярных механизмов транспорта ионов через биологические мембраны — одна из наиболее актуальных задач современной мембранологии. Существенную роль в ее решении играют модельные ион-транспортные системы, обеспечивающие избирательный пере-