

ВЛИЯНИЕ СИМПОРТА NaK_2Cl И ПРОНИЦАЕМОСТИ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ НА БАЛАНС ИОННЫХ ПОТОКОВ И ТРАНСМЕМБРАННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ У ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК РАЗНОГО ТИПА

© А. А. Веренинов, Л. Н. Глушанкова, А. А. Рубашкин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Компьютерным расчетом получены данные, характеризующие зависимость стационарных значений внутриклеточной концентрации калия, натрия и хлора, содержания воды, трансмембранной разности электрических и электрохимических потенциалов и потоков калия, натрия и хлора по отдельным трактам от величины потока катионов через Na,K-ATF азный насос, систему симпорта и проницаемости ионных каналов у высококаллевых животных клеток с высоким и низким мембранными потенциалами. Показано, что симпорт NaK_2Cl и хлорные каналы являются преимущественно «регуляторами клеточного объема», поскольку значительные изменения содержания внутриклеточной воды при изменении работы этих трактов достигаются без существенного изменения мембранного потенциала и внутриклеточного отношения K/Na , тогда как при изменении Na,K-ATF азного тракта и катионных каналов изменения клеточного объема сопряжены с резкими изменениями мембранного потенциала и отношения K/Na . Показано, что симпорт NaK_2Cl у клеток с мембранным потенциалом порядка 70 мВ может увеличивать объем клетки не более чем в 1.6 раза. У высококаллевых клеток с мембранным потенциалом порядка 10 мВ симпорт NaK_2Cl , наоборот, уменьшает объем, но не более чем в 1.8 раза. У клеток с промежуточными значениями мембранного потенциала имеют место промежуточные эффекты. На фоне работающего симпорта NaK_2Cl увеличение проницаемости хлорных каналов изменяет систему противоположно симпорту и в тех же пределах. Изменения в системе, вызванные симпортом и изменением хлорных каналов, практически не различимы по «статическим» показателям (мембранному потенциалу, отношению K/Na , внутриклеточным концентрациям ионов, содержанию внутриклеточной воды и т. п.) и отличаются лишь ионными потоками. Симпорт NaK_2Cl и хлорные каналы могут сильно влиять на объем клеток и при малых (порядка 5—10 %) удельных потоках ионов по симпортному тракту, которые трудно обнаружить в опыте путем ингибиторного анализа.

Система NaK_2Cl -симпорта, осуществляющая сопряженный перенос через плазматическую мембрану в одном направлении Na^+ , K^+ и Cl^- в соотношении 1:1:2, была открыта в 80-е годы (Geck et al., 1980; Haas et al., 1982; Duhm, Gobel, 1984; Chipperfield, 1986; Geck, Heinz, 1986, и др.). К настоящему времени показано, что она широко распространена среди клеток самой разной тканевой и видовой принадлежности и на нее нередко приходится значительная часть трансмембранного переноса однозарядных ионов (Веренинов, Марахова, 1986; Haas, 1989, 1994). Полным ходом идут исследования молекулярной организации симпортера NaK_2Cl (Payne, Forbush, 1995; Gillen et al., 1996; Payne et al., 1996).

По существующим представлениям, симпорт NaK_2Cl и перенос ионов хлора по каналам электродиффузионного типа играют существенную роль в регуляции содержания воды в животных клетках (Hoffmann, 1987; Rothstein, Bear, 1989; Gilles et al., 1991; Sarkadi, Parker, 1991; Jentsch, 1994; Mac Knight et al., 1994; Hoffmann, Dunham, 1995; Strange et al., 1996, и др.). Эти представления опираются главным образом на исследования ионных потоков в процессе регуляторного изменения объема клеток при переводе их в аннзосмотические среды и на исследования влияния блокаторов рассматриваемых трактов на регуляторное изменение содержания внутриклеточной воды. Расчеты влияния симпорта NaK_2Cl и переноса ионов хлора по электродиффузионным каналам на ионный и водный баланс клеток проводились (Веренинов, Марахова, 1986; Lew, Bookchin, 1986; Strieter et al., 1990; Веренинов, Веренинов, 1991; Веренинов и др., 1995), однако многие вопросы остаются еще мало изученными. Известно, что нетто-поток ионов

через систему NaK2Cl-симпорта определяется трансмембранным градиентом химических потенциалов Na⁺, K⁺ и Cl⁻, знак которого у разных клеток может быть различным, и соответственно поток ионов по симпортному тракту может быть направлен как внутрь клетки, так и наружу. В первом случае увеличение переноса ионов по симпортному тракту приводит к увеличению содержания внутриклеточной воды и объема клетки, а во втором, наоборот, — к уменьшению объема (Duhm, Göbel, 1984). Вместе с тем систематический сравнительный анализ влияния симпорта NaK2Cl и проницаемости хлорных каналов у клеток разного типа до сих пор не проводился. Такой анализ крайне необходим, когда нужно выяснить, с изменением работы каких трактов связаны наблюдаемые в опыте изменения ионного и водного баланса клетки. К числу других мало изученных вопросов относится связь между величиной парциального потока ионов по симпортному тракту и влиянием его на общий ионный и водный баланс клетки. Исследованию этих вопросов и посвящена настоящая работа.

Методика

Математическая модель, использованная в настоящей работе, была подробно описана ранее (Веренинов, Марахова, 1986; Веренинов, Веренинов, 1991; Веренинов и др., 1995). Основу расчета, как и в работах других исследователей (Jakobsson, 1980; Lew, Bookchin, 1986; Strieter et al., 1990), составляют уравнения, отражающие материальный баланс по проникающим через мембрану ионам, макроскопическую электронейтральность внутриклеточной среды и равенство осмотической активности среды и цитоплазмы. Ионы перемещаются в рассматриваемой модели из среды в цитоплазму и из цитоплазмы в среду по следующим трактам: через Na,K-АТФазный насос, переносающий натрий из цитоплазмы в среду, а калий из среды в цитоплазму, через каналы электродиффузионного переноса ионов и через систему симпорта NaK2Cl, осуществляющую перенос в одном направлении сразу 4 ионов в соотношении 1Na:1K:2Cl. Принято, что поток натрия и калия через Na,K-АТФазный насос есть линейная функция внутриклеточной концентрации натрия, а поток через системы симпорта — линейная функция разности химических потенциалов ионов, участвующих в симпорте. Для описания движения калия, натрия и хлора по ионным каналам используется уравнение Гольдмана. Система уравнений имеет следующий вид:

$$p_{nH} [n_1 \exp(u) - n_0] / [1 - \exp(u)] - \beta n_1 + S = 0, \quad (1)$$

$$p_{KH} [k_1 \exp(u) - k_0] / [1 - \exp(u)] + (\beta/\gamma) n_1 + S = 0, \quad (2)$$

$$p_{CH} [c_1 - c_0 \exp(u)] / [1 - \exp(u)] + 2S = 0, \quad (3)$$

$$c_1 = (n_1 + k_1) [(1 - z)/(1 + z)] + (n_0 + k_0 + c_0)z/(z + 1), \quad (4)$$

где n_0, k_0, c_0 — концентрации Na⁺, K⁺ и Cl⁻ вне клетки; n_1, k_1, c_1 — концентрации Na⁺, K⁺ и Cl⁻ внутри клетки; z — внутриклеточный заряд в расчете на 1 моль осмотиков, не проникающих сквозь мембрану, всюду в расчетах принят равным -1.5 (Веренинов, Марахова, 1986); p_n, p_k, p_c — коэффициенты проницаемости для ионов Na⁺, K⁺ и Cl⁻ соответственно; u — безразмерный потенциал $u = VF/(RT)$, V — трансмембранная разность потенциалов. Первые члены в уравнениях (1)–(3) представляют собой потоки по электродиффузионному (гольммановскому) тракту, вторые члены в уравнениях (1), (2) — это помповые потоки соответственно Na⁺ и K⁺, третьи члены суть симпортные компоненты потоков, которые вычисляли по формуле $S = Q [1 - (n_1 k_1 c_1) / (n_0 k_0 c_0)]$, где Q — входной поток натрия через систему симпорта. Систему уравнений (1)–(4) решали численно относительно четырех неизвестных n_1, k_1, c_1, u , после чего найденные величины использовали для вычисления объема клетки и потоков по соответствующим трактам. Объем клетки на единицу непроникающих внутриклеточных осмотиков вычисляли по формуле $Vol = (z + 1) / [(n_0 + k_0 + c_0) - 2(n_1 + k_1)]$.

Далее в тексте, таблицах и рисунках приняты следующие обозначения:

K⁺, Na⁺, Cl⁻ — концентрации ионов во внутриклеточной среде, мМ; V — трансмембранная разность электрических потенциалов (потенциал покоя), мВ; Vol (Cell water) — объем клетки, приравняемый к содержанию в ней воды, мл на 1 мосмоль не проникающих через мембрану внутриклеточных осмотиков; $ContNaK$ — суммарное содержание в клетке калия и натрия, ммоль на 1 мосмоль внутриклеточных осмотиков; $ContCl$ — внутриклеточное содержание хлора, в тех же единицах; K/Na — соотношение внутриклеточного содержания калия и натрия; $\Delta\mu K^+, \Delta\mu Na^+, \Delta\mu Cl^-$ — разность электрохимических потенциалов калия, натрия и хлора между цитоплазмой и средой, мВ; β — коэффициент пропорциональности между потоком натрия через Na,K-АТФазный насос и внутриклеточной концентрацией натрия; γ — отношение потока натрия через насос к потоку калия, принятое равным 1.5; P_{Na}, P_K, P_{Cl} — коэффициенты проницаемости для трактов электродиффузионного переноса натрия, калия и хлора (коэффициенты Гольдмана); Q — входной поток калия или натрия через систему симпорта, ммоль на 1 мосмоль непроникающих внутриклеточных осмотиков в условную единицу времени; общий поток Na⁺, K⁺ или Cl⁻ выражен в тех же единицах, что и Q ; $PEN \dots SIC$ — парциальные потоки: отношение потока по тому или иному тракту к общему потоку данного иона, первый индекс обозначает тракт (P — насос, S — симпорт, G — каналы электродиффузионного переноса), второй индекс — входной (I) или

выходной (Е) поток, а третий — вид ионов (Na^+ , K^+ , Cl^-); $f_{\text{Na}}/f_{\text{K}}$ — отношение потока натрия к потоку калия; k_{K} — константа обмена калия: отношение потока калия через клеточную мембрану к содержанию калия в клетке.

В расчетах принималось, что концентрации Na^+ , K^+ и Cl^- в нормальной среде (310 мосмоль/л) составляют соответственно 150, 5 и 155 мМ. Изменения осмотической активности среды достигались изменением концентрации NaCl . Сходные зависимости получаются, если концентрация NaCl в среде снижена и изменение осмотической активности достигается изменением концентрации вводимого в среду неэлектролита.

Результаты

Влияние NaK2Cl -симпорта и P_{Cl} на водный и ионный баланс существенно зависит от того, каковы исходное трансмембранное распределение ионов, трансмембранная разность электрических потенциалов и потоки ионов по основным трактам трансмембранного переноса. При заданном ионном составе среды и заданной величине «доннановского» внутриклеточного электрического заряда ионный баланс, как известно, определяется кинетикой переноса ионов через мембрану. В табл. 1 показано, как зависят трансмембранная разность электрических потенциалов, соотношение концентраций калия и натрия в клетке и ее объем от параметров, характеризующих кинетику переноса калия, натрия и хлора через мембрану, в простейшем случае, когда в мембране имеются лишь Na, K-ATF азный насос и ионные каналы, электродиффузионное движение ионов по которым может быть описано известным уравнением Гольдмана. Высококалиевые клетки с большой трансмембранной разностью электрических потенциалов получают при относительно больших значениях отношения $\gamma P_{\text{K}}/\beta$ и малых значениях P_{Na}/β , тогда как высококалиевые клетки с низкой трансмембранной разностью потенциалов, наоборот, при малых значениях отношения $\gamma P_{\text{K}}/\beta$ и больших — P_{Na}/β . Для первых характерны меньшая доля помпового переноса во входном потоке калия PIK (табл. 2), более низкое отношение стационарного потока натрия к потоку калия $f_{\text{Na}}/f_{\text{K}}$ и более высокая константа скорости обмена калия k_{K} . Перечисленные характеристики кинетики переноса ионов через клеточную мембрану при заданных концентрациях ионов в среде и заданном значении z в рамках рассматриваемой модели однозначно определяются отношениями $\gamma P_{\text{K}}/\beta$ и P_{Na}/β .

Таблица 1

Влияние активного транспорта (β , γ) и проницаемости калиевых и натриевых каналов (P_{K} , P_{Na}) на стационарное распределение K^+ и Na^+ (K/Na), мембранный потенциал (V), объем клетки (Vol) и трансмембранную разность электрохимических потенциалов натрия ($\Delta\mu_{\text{Na}}$) и калия ($\Delta\mu_{\text{K}}$) в модели без симпорта

P_{Na}/β	0.05	0.1	0.2	0.5
$\gamma P_{\text{K}}/\beta$				
0.3	11 -107 -46 9.8 47.4	6.6 -78.4 -29 12 62.7	4.3 -52.4 -10 25 77.4	K/Na $\Delta\mu_{\text{Na}}$ V Vol $\Delta\mu_{\text{K}}$
1.0	7.9 -121 -69 8.7 24.3	4.4 -93.7 -54 9.3 36.4	2.5 -65.7 -37 11 49.9	1.4 -34.2 -13 20 66.0
2.0	7.0 -128 -78 8.5 14.8	3.7 -101 -66 8.8 24.1	2.0 -73.0 -49 9.6 35.7	1.0 -38.9 -25 13 51.0
5.0	6.4 -133 -86 8.4 7.0	3.1 -109 -76 8.6 12.4	1.5 -81.1 -62 8.9 20.3	0.6 -44.3 -36 11 33.0

Таблица 2

Влияние активного транспорта (β , γ) и проницаемости калиевых (P_K) и натриевых (P_{Na}) каналов на стационарное распределение K^+ и Na^+ , мембранный потенциал (V), помповый компонент входного потока калия (PIK), константу обмена калия (kK) и отношение потоков калия и натрия ($J_{Na/K}$) в модели без симпорта

P_{Na}/β	0.05	0.1	0.2	0.5
$\gamma P_K/\beta$				
0.3	11 .075 -46 .83 1.27	6.6 .112 -29 .90 1.43	4.3 .164 -10 .95 1.65	K/Na kK V PIK $J_{Na/K}$
1.0	7.9 .142 -69 .59 .91	4.4 .205 -54 .74 1.15	2.5 .311 -37 .85 1.39	1.4 .512 -13 .92 1.90
2.0	7.0 .222 -78 .43 .65	3.7 .307 -66 .59 .91	2.0 .463 -49 .74 1.18	1.0 .809 -25 .85 1.67
5.0	6.4 .452 -86 .23 .35	3.1 .577 -76 .37 .57	1.5 .841 -62 .53 .84	0.6 1.56 -36 .71 1.31

Данные табл. 1 и 2 показывают, что изменения потока ионов через насос, равно как и изменения проницаемости калиевых и натриевых каналов, ранее всего отражаются на соотношении внутриклеточного содержания калия и натрия K/Na и мембранном потенциале V , и лишь при больших изменениях переноса ионов через насос и каналы, вызывающих весьма значительные изменения отношения K/Na и мембранного потенциала, наблюдаются существенное изменение водного баланса и сопутствующее ему изменение суммарного внутриклеточного содержания катионов. При умеренных изменениях потока через насос и каналы отношение K/Na изменяется без заметного изменения суммарного содержания катионов. Как будет показано ниже, симпорт NaK_2Cl и проницаемость хлорных каналов влияют преимущественно на водный баланс.

Рассматривая данные табл. 1 и 2, отметим еще один момент, на который редко обращают внимание. Содержание воды на единицу собственных внутриклеточных осмотиков у высококалиевых клеток с высоким и, напротив, низким мембранными потенциалами, как показывает расчет, должно сильно различаться. Так, например, у клеток типа высококалиевых эритроцитов, мембранный потенциал которых близок к 10 мВ, содержание воды в расчете на 1 моль не проникающих через мембрану внутриклеточных осмотиков, по расчету, должно быть примерно в 3 раза больше, чем у клеток с таким же отношением K/Na , но мембранным потенциалом 50—60 мВ. Известно, что содержание воды у животных клеток, по крайней мере у непролиферирующих дифференцированных клеток, весьма постоянно и независимо от мембранного потенциала составляет 3.0—3.5 мл на 1 г сухой массы клеток (практически на 1 г белка; Веренинов, Марахова, 1986). Отсюда следует, что клетки с низким мембранным потенциалом должны сильно отличаться от клеток с высоким потенциалом по содержанию внутриклеточных осмотиков на 1 г белка и(или) удельной величине внутриклеточного заряда на единицу внутриклеточных осмотиков z .

Существенное различие высококалиевых клеток с высоким и низким мембранными потенциалами состоит в том, что у первых трансмембранная разность электрохимических потенциалов для натрия по абсолютной величине больше, чем для калия, тогда как у клеток 2-го типа, наоборот, меньше (табл. 1). Соответст-

венно общая трансмембранная разность электрохимических потенциалов для этих двух ионов, которая является движущей силой для NaK2Cl-симпорта, в первом случае имеет знак минус в цитоплазме, а во втором — в окружающей среде. В связи с этим результирующий нетто-поток Na^+ , K^+ и Cl^- по тракту NaK2Cl-симпорта у клеток 1-го типа должен быть направлен внутрь клетки, а у клеток 2-го типа — наружу. Отсюда следуют два важных обстоятельства: 1) у клеток 1-го типа симпорт должен приводить к возрастанию электрохимического потенциала ионов хлора во внутриклеточной среде, а у клеток 2-го типа, наоборот, к его снижению относительно потенциала хлора во внешней среде; 2) у клеток 1-го типа симпорт должен приводить к увеличению содержания в них воды и, следовательно, к увеличению их объема, тогда как у клеток 2-го типа, наоборот, к уменьшению объема.

Влияние проницаемости хлорных каналов на ионный баланс у клеток 1-го и 2-го типов должно быть противоположным, из-за того что трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов хлора у них разного знака. В обоих случаях увеличение проницаемости хлорных каналов создает эффект, противоположный симпорту. У клеток 1-го типа увеличение проницаемости хлорных каналов приводит к уменьшению объема, а у клеток 2-го типа, наоборот, к его увеличению.

Влияние NaK2Cl-симпорта и проницаемости хлорных каналов на внутриклеточную концентрацию Na^+ , K^+ и Cl^- , объем клетки и баланс потоков оказывается существенно зависящим не только от типа клетки, но и от области рассматриваемых изменений симпорта и проницаемости. Для того чтобы более детально проанализировать этот вопрос, ниже будет приведен расчет влияния симпорта и хлорной проницаемости на клетки двух типов с фиксированными значениями P_{Na}/β и $\gamma P_{\text{K}}/\beta$, у которых при отсутствии симпорта трансмембранная разность электрических потенциалов составляет либо -68 (клетки 1-го типа), либо -8.9 мВ (клетки 2-го типа) при отношении K/Na в первом случае 5.4, а во втором — 6.9. Примером клеток 1-го типа могут служить клетки возбудимых тканей, а из невозбудимых — лимфоциты. Клетки 2-го типа подобны высококалиевым эритроцитам.

Основные показатели, характеризующие ионный баланс и баланс потоков у клеток двух рассматриваемых типов, приведены в табл. 3 и 4. Они включают в себя группу показателей, характеризующих «статику» распределения ионов между цитоплазмой и средой ($V \dots \text{Cl}^-$) и «кинетику» их движения между цитоплазмой и средой в условиях динамического равновесия потоков (потоки).

При переходе от статических показателей к потокам возникают степени свободы, связанные с нормировкой потоков, но если использовать безразмерные отношения потоков ионов разного вида или «парциальные» потоки, т. е. отношение потока ионов данного вида по одному из трактов к общему потоку, то значения этих отношений оказываются однозначно связанными со статическими показателями. Анализ этих безразмерных кинетических показателей в ряде случаев оказывается более мощным средством для установления роли того или иного тракта в перестройках ионного баланса по сравнению с анализом статических показателей.

Рис. 1 демонстрирует общий характер зависимости объема клетки от величины входного потока катионов по тракту NaK2Cl-симпорта Q и проницаемости хлорных каналов P_{Cl} у клеток 1-го и 2-го типов. В выбранной области значений Q и P_{Cl} доля симпортного компонента в потоках натрия, калия и хлора изменяется от нуля до значений, превышающих те, что наблюдаются в опытах на реальных клетках. Таким образом, покрывается вся область значений P_{Cl} и Q , имеющая физический смысл. Нетрудно видеть, что Q и P_{Cl} существенно влияют на объем клетки лишь в области средних значений этих параметров, вне которой изменения объема и других показателей, за исключением величины потоков, ограничены пределами, зависящими от типа клетки.

Таблица 3

Влияние симпорта NaK_2Cl (Q) и проницаемости хлорных каналов (P_{Cl}) на содержание в клетках воды и распределение и потоки главных однозарядных ионов между внутриклеточной и внешней средой. Клетки 1-го типа ($P_{\text{Na}} : P_{\text{K}} : \beta = 0.07 : 1 : 1$)

Параметры	Значения параметров						
	0	>10	1	10	50	1	10
Q	0	>10	1	10	50	1	10
P_{Cl}	>0	0	>0.6	>7	>22	.0075	.08
V	-68.5	-66.7	-67.1	-56.4	-37.1	-66.7	-62.1
K/Na	5.4	5.1	5.3	4.4	3.2	5.2	4.8
Vol	8.7 ^a	14.1 ^b	8.8 ^a	9.2 ^a	10.8 ^a	12	12
ContNaK	1.60	2.44	1.62	1.68	1.93	2.11	2.11
ContCl	0.10	0.94	0.12	0.18	0.43	0.61	0.61
$\Delta\mu\text{Na}^+$	-113	-111	-110	-96.4	-70.7	-111	-105
$\Delta\mu\text{K}^+$	23.1	23.1	24.4	34.2	50.9	23.7	28.0
$\Delta\mu\text{Cl}^-$	0	44.1	<2.4	1.5	<0.82	37.0	32.3
Na^+	28.8	28.1	29.2	33.5	42.7	28.5	30.2
K^+	155	145	154	149	135	147	146
Cl^-	11.9	66.6	13.7 ^a	19.8 ^a	39.8 ^a	51.1	50.9
Потоки:							
Na^+ , общий	29.2	>38.6	29.7	35.2	69.4	29.6	37.1
PEN	.985	<.729	.983	.950	.615	.964	.815
GEN	.015	<.011	.015	.019	.020	.015	.014
SEN	0	>.259	<.002	.031	.365	.021	.171
GIN	1	<.741	.966	.716	.280	.966	.730
SIN	0	>.259	.034	.284	.720	.034	.270
K^+ , общий	33.1	>41.4	34.1	44.3	87.6	33.6	43.0
GEK	1	<.764	.999	.976	.711	.982	.853
SEK	0	>.236	.001	.024	.289	.018	.147
PIK	.580	<.443	.570	.503	.324	.565	.468
SIK	0	>.236	.029	.226	.570	.030	.232
GIK	.420	<.303	.400	.271	.106	.405	.299
Cl^- , общий	^a	>20.0	>22.6 ^a	>.335 ^a	>1621 ^a	2.3	23.1
GEC	1	0	>.996	>.994	>.970	.461	.454
SEC	0	1	<.004	<.006	<.030	.539	.546
GIC	1	0	>.911	>.940	>.940	.115	.135
SIC	0	1	<.089	<.060	<.060	.885	.863

^a Нижний предел изменения Vol при указанных значениях Q . ^b Верхний предел изменения Vol при указанных значениях Q . ^c Значения зависят от P_{Cl} .

Рассмотрим эти пределы. Первый из них, естественно, имеет место при уменьшении симпорта до нуля. Этот предел не зависит от P_{Cl} . Увеличение симпорта, если оно значительно, приводит систему в другое предельное состояние, которое у клеток с высоким мембранным потенциалом соответствует наибольшему значению объема, а у клеток с низким мембранным потенциалом — наоборот. Указанные пределы ограничивают размах вызываемых симпортом изменений клеточного объема. В выбранных числовых примерах у клеток с мембранным потенциалом порядка 70 мВ симпорт NaK_2Cl не может увеличить объем более чем в 1.6 раза, а у клеток с мембранным потенциалом порядка 10 мВ не может уменьшить объем более чем в 1.8 раза.

Уменьшение P_{Cl} влияет на систему так же, как увеличение симпорта, и когда P_{Cl} стремится к нулю, объем клетки также стремится к пределу, который зависит от величины симпорта. В табл. 3 и 4 приведены значения рассматриваемого предела для некоторых сочетаний Q и P_{Cl} , покрывающих область, имеющую

Таблица 4

Влияние симпорта NaK_2Cl (Q) и проницаемости хлорных каналов (P_{Cl}) на содержание в клетках воды и распределение и потоки главных однозарядных ионов между внутриклеточной и внешней средой. Клетки 2-го типа ($P_{\text{Na}} : P_{\text{K}} : \beta = 0.13 : 0.12 : 1$)

Параметры	Значения параметров							
Q P_{Cl}	0 >0	10 0	10 >10	100 >10	1000 >10	0.1 0.0049	1 0.07	3 1.5
V	-8.9	-10.0	-16.4	>-19 ^a	>-19 ^a	-9.6	-10.8	-13.4
K/Na	6.9	7.1	6.8	6.8	6.7	7.0	7.0	6.9
Vol	28.5 ^b	15.7 ^a	17.5 ^b	15.7	15.4 ^a	20.0	20.0	20.0
ContNaK	4.67	2.68	2.96	2.68	2.64	3.35	3.35	3.34
ContCl	3.17	1.19	1.46	1.18	1.14	1.85	1.85	1.84
$\Delta\mu\text{Na}^+$	-61.8	-62.4	-68.1	-70.4	-70.4	-62.2	-63.2	-65.6
$\Delta\mu\text{K}^+$	80.7	80.7	74.0	71.3	71.1	80.6	79.4	76.7
$\Delta\mu\text{Cl}^-$	0	-9.2	-0.11 ^a	"	"	4.2	3.0	-0.4
Na^+	20.6	21.1	21.6	22	22	20.9	21.0	21.2
K^+	143	150	148	149	149	146	146	146
Cl^-	111	75.4	93.6	75	74	92.5	92.6	92.4
Потоки:								
Na^+ , общий	22.9	>33.4	36.1	127	1027	23.3	24.7	27.8
PEN	.901	<.633	.600	.173	.022	.897	.851	.765
GEN	.099	<.068	.057	.015	.002	.097	.090	.077
SEN	0	>.299	.344	.81 ^a	.977	.006	.059	.159
GIN	1	>.701	.723	.21 ^a	.027	.996	.960	.892
SIN	0	>.299	.277	.78 ^a	.973	.004	.040	.108
K^+ , общий	14.5	>24.8	25.2	115	1015	14.7	15.7	17.9
GEK	1	<.597	.509	.11	.012	.990	.907	.754
SEK	0	>.403	.491	.89	.988	.010	.093	.246
PIK	.951	<.568	.572	.125	.014	.945	.890	.790
SIK	0	>.403	.396	.86	.985	.007	.064	.167
GIK	.049	>.029	.032	.007	.001	.048	.046	.043
Cl^- , общий	"	>20.0	"	"	>3000	0.831	10.8	185
GEC	1	0	>.98	"	>.34	.650	.729	.952
SEC	0	1	<.02	"	<.66	.350	.271	.048
GIC	1	0	>.98	"	>.34	.759	.815	.968
SIC	0	1	<.02	"	<.66	.241	.185	.032

^a Нижний предел изменения Vol при указанных значениях Q . ^b Верхний предел изменения Vol при указанных значениях Q . ^c Значения зависят от P_{Cl} .

физический смысл. Как показывает расчет, при достаточно большом симпорте компенсировать вызванное увеличением симпорта изменение объема клетки путем увеличения проницаемости хлорных каналов уже невозможно. Более того, у клеток 2-го типа при очень больших значениях симпорта, возможно реально и не встречающихся, объем может стать меньше, чем при $P_{\text{Cl}} = 0$. В этой области, по крайней мере у модельных клеток 2-го типа, имеет место инверсия знака влияния P_{Cl} на объем клетки. При большом симпорте в области малых и средних значений P_{Cl} увеличение проницаемости хлорных каналов у клеток 2-го типа приводит к увеличению их объема, а в области больших значений P_{Cl} , наоборот, к уменьшению.

Рассмотрим область средних значений Q и P_{Cl} . Как показывают данные табл. 3 и 4, изменения Q и P_{Cl} , вызывающие весьма существенные изменения объема клетки, практически не изменяют величины трансмембранной разности электрических потенциалов, отношения K/Na, концентраций K^+ , Na^+ и Cl^- во внутрикле-

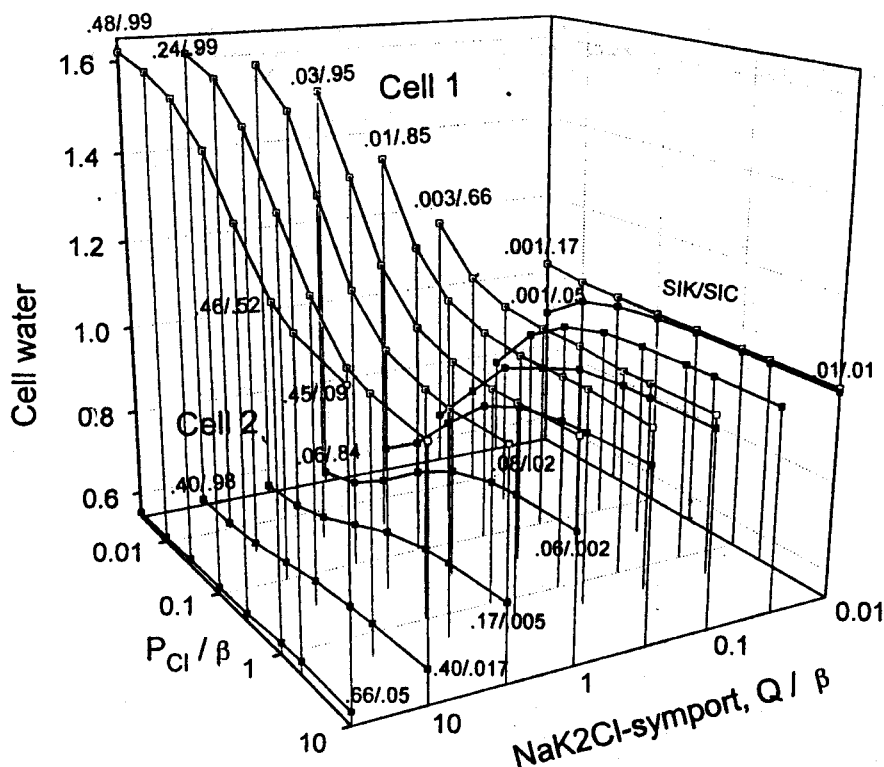


Рис. 1. Влияние симпорта NaK_2Cl и проницаемости хлорных каналов на стационарное содержание воды у клеток с высоким (*Cell 1*) и низким (*Cell 2*) мембранными потенциалами в среде нормальной осмотической активности.

По оси X — проницаемость хлорных каналов по Гольдману (P_{Cl}), отн. ед. (P_{Cl}/β); по оси Y — входной поток калия (или натрия) по тракту NaK_2Cl , отн. ед. (Q/β); по оси Z — стационарное содержание воды в клетке (объем клетки), мл на 1 мосмоль не проникающих через мембрану внутриклеточных осмотиков. Числа у кривых — доля симпортного компонента во входном потоке калия (S/K) или хлора (S/C). Приведены результаты компьютерного расчета для среды нормальной осмотической активности (310 мосмоль на 1 л).

точной воде, а также трансмембранной разности электрохимических потенциалов калия и натрия. Таким образом, путем вариации рассматриваемого симпорта и проницаемости хлорных каналов клетка может регулировать внутриклеточное содержание главных однозарядных ионов и воды, а также электрохимический потенциал ионов хлора, оставляя практически неизменными все другие показатели, характеризующие распределение ионов между цитоплазмой и средой. Это позволяет называть два рассматриваемых тракта «регуляторами клеточного объема».

Поскольку одно и то же значение объема клетки может быть получено при разных сочетаниях Q и P_{Cl} , возникает вопрос, как при этом изменяются другие характеристики ионного баланса. В последних двух колонках табл. 3 и трех колонках табл. 4 показано, как ведет себя модель при таком одновременном увеличении симпорта и проницаемости хлорных каналов, когда объем клетки остается в точности прежним. Видно, что в этом случае и все другие «статические» характеристики распределения ионов практически не изменяются. Изменяются только показатели, характеризующие кинетику движения ионов через мембрану. Отсюда следует, что получить ответ на вопрос, по какой причине изменился объем

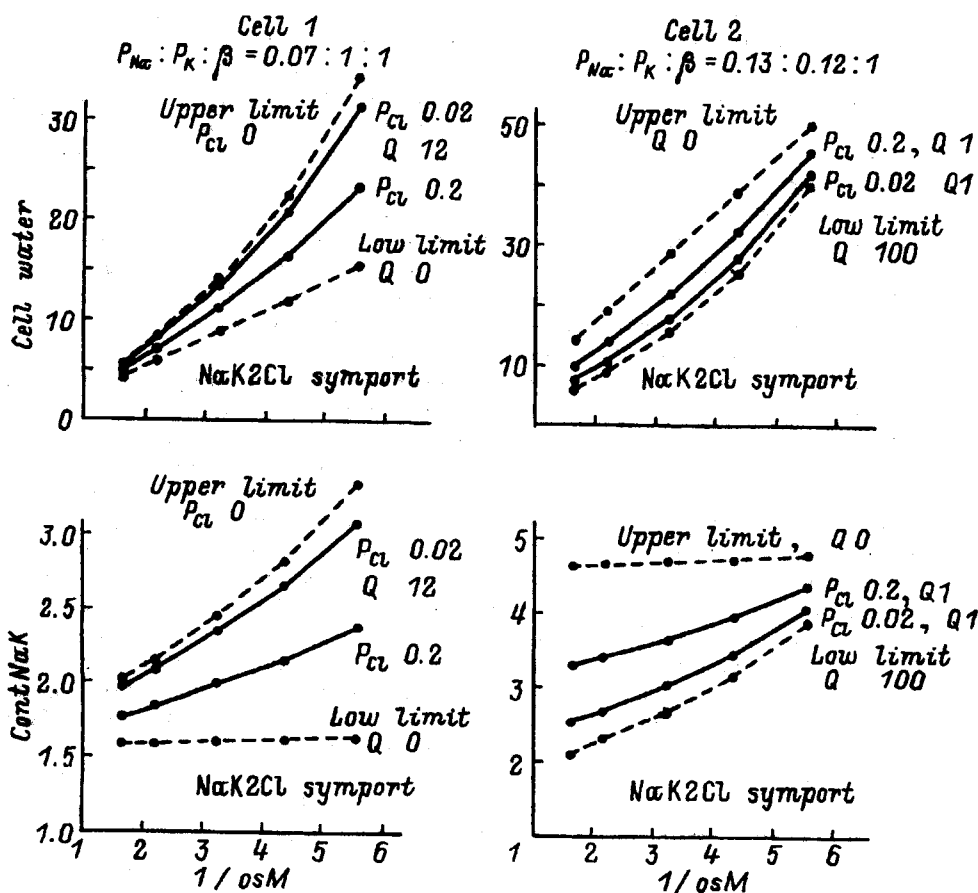


Рис. 2. Влияние симпорта $NaK2Cl$ и проницаемости хлорных каналов на стационарное содержание воды у клеток с высоким (Cell 1) и низким (Cell 2) мембранным потенциалом в средах различной осмотической активности.

По оси абсцисс — обратная величина концентрации осмотиков в среде, л/моль; по оси ординат — содержание воды (Cell water) или суммарное содержание калия и натрия (ContNaK). Пределы изменения содержания воды и катионов показаны штриховыми линиями. У кривых указаны значения P_{Cl} и Q (P_{Cl}/β , Q/β).

клетки — из-за изменения симпорта или из-за изменения проницаемости хлорных каналов (при условии работы симпорта), — можно, только располагая данными, характеризующими ионные потоки. На рис. 1 численные значения симпортного компонента потока калия SIK и хлора SIC представлены в координатах Q и P_{Cl} . Нетрудно видеть, что при изменении Q сильно изменяется SIK и слабо — SIC . При изменении P_{Cl} , наоборот, сильнее изменяется SIC . Таким образом, по соотношению SIK и SIC можно определить, в области каких значений Q и P_{Cl} получено то или иное значение объема клетки. Вместо кинетических показателей SIK и SIC могут быть с той же целью использованы и другие кинетические показатели: отношение потоков ионов разного вида, отношение констант и т. п. Выбор показателей определяется тем, какие из них экспериментатору удобнее определять.

Другое важное положение, к которому приводит расчет потоков по основным трактам переноса Na^+ , K^+ и Cl^- , состоит в следующем. При низкой проницаемости хлорных каналов влияние $NaK2Cl$ -симпорта на ионный баланс может быть весьма значительным, несмотря на очень небольшую долю симпортного компонента в

потоке калия и натрия через клеточную мембрану, в частности и тогда, когда она не превышает 5 %. В таких случаях роль симпорта и хлорных каналов в регуляции объема клеток, как и ионного баланса в целом, не может быть выявлена путем ингибиторного анализа отдельных составляющих потока того или иного катиона, даже если эта роль и велика. Более продуктивным, как показывают данные табл. 3 и 4, может быть анализ потока хлора, симпортный компонент в котором в подобном случае как раз оказывается значительным.

Выше рассматривалось влияние симпорта NaK_2Cl и проницаемости хлорных каналов на ионный и водный баланс клетки в условиях нормальной, «изотонической» физиологической среды. Описанные выше закономерности сохраняют силу и в условиях изменения осмотичности окружающей клетку среды. Каковы возможности клетки регулировать свой объем путем изменения внутриклеточного содержания главных однозарядных ионов в результате изменения симпорта NaK_2Cl и проницаемости хлорных каналов после изменения осмотичности внешней среды? На рис. 2 показаны пределы изменения содержания воды при вариациях симпорта и проницаемости хлорных каналов в средах разной осмотичности для клеток 1-го и 2-го типов. Ясно, что после попадания в гипо- или гипертоническую среду клетки способны вернуть свой объем к «нормальному» значению, характерному для физиологической среды 310 мосМ, только в области, ограниченной пределами, показанными *штриховыми линиями*. Для того чтобы возросший в гипотонической среде объем клетки уменьшился в результате уменьшения симпорта или увеличения хлорной проницаемости, исходный симпорт у клеток 1-го типа должен быть достаточно велик, а проницаемость низка. У клеток 2-го типа для регулирования объема в гипотонической среде, напротив, исходный симпорт должен быть мал, а хлорная проницаемость велика. Соответствующие условия необходимы и для успешной регуляции клеточного объема в гипертонической среде. Интересно было бы под этим углом зрения провести сравнительно-физиологические исследования роли рассматриваемого симпорта и хлорной проницаемости в регуляции объема клеток различного типа в анизосмотических условиях. К сожалению, имеющиеся в литературе данные разрозненны и, как правило, недостаточны для полного анализа системы.

Обсуждение

Тракты-регуляторы клеточного объема и тракты-регуляторы электрохимического градиента ионов. Проведенный анализ показывает, что хотя движение ионов по разным трактам, в тех случаях когда оно сопровождается изменением содержания ионов в клетке, теснейшим образом взаимосвязано, изменение потоков по одним трактам сказывается преимущественно на изменении водного баланса и суммарного содержания ионов в клетке, тогда как в других случаях изменения внутриклеточного содержания ионов и клеточного объема малы, а изменения разности электрических и электрохимических потенциалов, наоборот, велики. Симпортер NaK_2Cl и хлорные ионные каналы могут служить примером трактов 1-го типа, в то время как Na,K-ATF азный насос и катионные ионные каналы электродиффузионного переноса должны быть отнесены к трактам 2-го типа. Изменение проницаемости калиевых и натриевых каналов, как и активности Na,K-ATF азного насоса, начинает сказываться на суммарном внутриклеточном содержании катионов, водном балансе клетки и соответственно ее объеме лишь после того, как произойдут весьма существенные изменения разности электрических потенциалов на мембране, изменения соотношения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ и соответственно трансмембранного градиента электрохимического потенциала этих катионов. В области относительно небольших изменений эти тракты являются преимущественно регуляторами градиента электрохимического потенциала ионов на мембране. Важный момент, который необходимо подчерк-

нута, состоит в том, что влияние рассматриваемых трактов на общий ионный и водный баланс клетки может существеннейшим образом различаться в зависимости от того, имеем ли мы дело с клетками типа эритроцитов, у которых при высоком отношении K/Na трансмембранная разность электрических потенциалов мала, а разность электрохимических потенциалов калия велика, или с клетками, для которых, подобно клеткам возбудимых тканей, разность электрических потенциалов на мембране велика, а разность электрохимических потенциалов калия мала. Второй важный момент состоит в том, что зависимость содержания ионов и воды в клетке от параметров, определяющих скорость переноса ионов по тем или иным трактам, как правило, имеет нелинейный характер. Поэтому даже и в том случае, когда речь идет о трактах-регуляторах водного баланса, они выполняют эту роль лишь в ограниченной области изменений соответствующих параметров.

Влияние на ионный и водный баланс разных трактов и парциальные потоки ионов по этим трактам. Можно ли судить о влиянии того или иного тракта на общий ионный и водный баланс клетки, ориентируясь на величину парциального потока ионов по данному тракту? Расчеты показывают, что это опасно. Выше приведены примеры сильного влияния $NaK2Cl$ -симпорта и проницаемости хлорных каналов на ионный и водный баланс клеток при такой небольшой доле переноса ионов по симпортному тракту, что соответствующий парциальный поток трудно выявить в эксперименте с помощью обычного ингибиторного анализа. С другой стороны, и при больших потоках по симпортному тракту изменение этого потока при определенных условиях может очень слабо влиять на общий ионный и водный баланс. Анализ парциальных потоков чрезвычайно важен в тех случаях, когда по статическим показателям, таким как внутриклеточный ионный состав, трансмембранная разность электрических или электрохимических потенциалов K , Na и Cl , не удастся определить, с изменением каких трактов связано то или иное изменение ионного баланса. Примером может служить случай, когда необходимо различить изменение проницаемости хлорных каналов и изменение симпорта.

Зависимость выводов от гипотез, положенных в основу уравнений ионных потоков по рассматриваемым трактам. Уравнения потоков в наших расчетах аналогичны использованным другими исследователями (Jakobsson, 1980; Lew, Bookchin, 1986; Strieter et al., 1990). Возникает вопрос, насколько существенно выводы настоящей работы зависят от гипотез, положенных в основу соответствующих уравнений потоков. Нами были испытаны кроме основного два дополнительных варианта расчета ионного баланса клетки, в одном из которых поток натрия по Na,K -АТФазному тракту считался фиксированным, а в другом отвечал следующему уравнению (Garay, Garrahan, 1973):

$$M = \frac{M_{\max}}{(1 + K'_{Na}/[Na]_i)^3 (1 + K'_K/[K]_o)^2}$$

где M — поток натрия через насос, $M_{\max}$ — максимальный поток при насыщающих концентрациях натрия в клетке $[Na]_i$ и калия в среде $[K]_o$, $K'_{Na} = 0.19(1 + 0.11 [Na]_i)$, $K'_K = 0.1 (1 + 0.054 [Na]_o)$.

Результаты, полученные в обоих случаях, показали, что наши выводы относительно влияния на ионный и водный баланс клетки $NaK2Cl$ -симпорта и проницаемости хлорных каналов остаются в силе. Что касается уравнения симпорта и гольдмановского уравнения, использованного для описания потока ионов по ионным каналам, то в настоящее время достаточно очевидно, что параметры, входящие в эти уравнения, могут быть переменными, зависящими и от ионных потенциалов, и от объема клетки, и от трансмембранной разности электрических потенциалов, если речь идет о ионных каналах. Рассматривая влияние на ионный и водный баланс клетки проницаемости хлорных каналов или кинетического параметра Q , характеризующего симпортный тракт, мы оставляем в стороне вопрос

об истинном физическом механизме движения ионов по рассматриваемым трактам. Можно полагать, что сопоставление поведения модели, в которой соответствующие параметры условно приняты постоянными, с поведением реальных клеток покажет, нужно ли, а если нужно, то как именно, корректировать параметры, и это может быть одним из подходов к анализу физического механизма движения ионов по рассматриваемым трактам. Главное же состоит в том, что без подобного моделирования, как бы несовершенно оно ни было, невозможно вычленить роль того или иного тракта в интегральных явлениях, разыгрывающихся на уровне целой клетки. Причина тому в сильной взаимосвязанности перемещения через мембрану ионов разного вида, обусловленной электрическими силами, взаимовлияниями вследствие изменений водно-осмотического равновесия, а для некоторых трактов также и сдвигами кислотно-щелочного равновесия.

Список литературы

- Веренинов А. А., *ст.*, Веренинов А. А., *мл.* Ионный, электрический и водный баланс в животной клетке. Система с активным транспортом катионов, гольдмановскими каналами и симпортом типа $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ // Цитология. 1991. Т. 33, № 11. С. 4—17.
- Веренинов А. А., Глушанкова Л. Н., Рубашкин А. А. Роль ионных транспортеров в долговременной регуляции содержания воды в животных клетках. Математическая модель и реальные лимфоидные клетки // Цитология. 1995. Т. 37, № 12. С. 1151—1166.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 292 с.
- Chipperfield A. R. The $(\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-)$ cotransport system // Clinical Science. 1986. Vol. 71. P. 465—476.
- Duhm J., Göbel B. O. Role of the furosemide-sensitive Na^+K^+ transport system in determining the steady-state Na^+ and K^+ content and volume of human erythrocytes in vitro and in vivo // J. Membr. Biol. 1984. Vol. 77. P. 243—254.
- Garay R. P., Garrahan P. J. The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells // J. Physiol. 1973. Vol. 231. P. 297—325.
- Geck P., Heinz E. The Na-K-2Cl cotransport system // J. Membr. Biol. 1986. Vol. 91. P. 97—105.
- Geck P., Pietrzyk C., Burkhardt B. C., Pfeiffer B., Heinz E. Electrically silent cotransport of Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells // Biochim. biophys. acta. 1980. Vol. 600. P. 432—447.
- Gillen C. M., Brill S., Payne J. A., Forbush B., III. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 16 237—16 244.
- Gilles R., Hoffmann E. K., Bolis L. (Eds.). Volume and osmolality control in animal cells // Adv. Comp. Environ. Physiol. 1991. Vol. 9.
- Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters // Annu. Rev. Physiol. 1989. Vol. 51. P. 443—457.
- Haas M. The Na-K-Cl cotransporters // Amer. J. Physiol. 1994. Vol. 267. P. C869—C885.
- Haas M., Schmidt W. F., III, McManus T. J. Catecholamine-stimulated ion transport in duck red cells. Gradient effects in electrically neutral (Na+K+2Cl) co-transport // J. Gen. Physiol. 1982. Vol. 80. P. 125—147.
- Hoffmann E. K. Volume regulation in cultured cells // Curr. Top. Membranes and Transport. 1987. Vol. 30. P. 125—180.
- Hoffmann E. K., Dunham P. B. Membrane mechanism and intracellular signalling in cell volume regulation // Int. Rev. Cytol. 1995. Vol. 161. P. 173—262.
- Jakobsson E. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238. P. C196—C206.
- Jentsch T. J. Molecular physiology of anion channels // Curr. Opin. Cell Biol. 1994. Vol. 6. P. 600—606.
- Lew V. L., Bookchin R. M. Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model // J. Membr. Biol. 1986. Vol. 96. P. 57—74.
- Mac Knight A. D. C., Gordon L. G. M., Purves R. D. Problems in the understanding of cell volume regulation // J. Exp. Zool. 1994. Vol. 268. P. 80—89.
- Payne J. A., Forbush B., III. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms // Curr. Opin. Cell Biol. 1995. Vol. 7. P. 493—503.
- Payne J. A., Stevenson T. J., Donaldson L. F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 16 245—16 252.
- Rothstein A., Bear C. Cell volume changes and the activity of the chloride conductance path // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989. Vol. 574. P. 294—308.
- Sarkadi B., Parker J. C. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume // Biochim. biophys. acta. 1991. Vol. 1071. P. 407—427.
- Strange K., Francesco E., Jackson P. S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels // Amer. J. Physiol. 1996. Vol. 270. P. C711—C730.
- Strieter J., Stephenson J. L., Palmer L. G., Weinstein A. M. Volume-activated chloride permeability can mediate cell volume regulation in a mathematical model of a tight epithelium // J. Gen. Physiol. 1990. Vol. 96. P. 319—344.

Поступила 3 XII 1996

[REDACTED]

THE INFLUENCE OF NaK2Cl SYMPORT AND CHLORIDE CHANNEL PERMEABILITY ON THE ION FLUX BALANCE AND ION DISTRIBUTION IN ANIMAL CELLS OF DIFFERENT TYPES

A. A. Vereninov, L. N. Glushankova, A. A. Rubashkin

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

The relationships between monovalent ion fluxes via major cell membrane pathways (Na/K pump, NaK2Cl symporter, electroconductive sodium, potassium and chloride channels) and steady state transmembrane ion distribution, membrane potential and cell water content were calculated for the high potassium animal cells with high and low membrane potential. It is found that variation in NaK2Cl symport or chloride electroconductive permeability causing changes in cell water content of high magnitude do not lead to significant changes in the intracellular Na/K ratio or membrane potential, in contrast to the effects caused by variation in the Na/K pump fluxes or permeability of the Na and K channels. It is shown that water content in cells with a high membrane potential, e. g. of about 70 mV, cannot be increased due to an increase in NaK2Cl symport by more than 1.6 times. In cells with a low membrane potential an increase in symport leads to a decrease in water content, which is also limited. In cells with membrane potential of about 10 mV the water content cannot be decreased more than by 1.8 times. When NaK2Cl symporter is operating, the effect of chloride channel permeability on the ion and water balance is quite opposite to the symport and is limited by the same boundaries. It is shown that effects caused by changes in symport and in chloride permeability can be differentiated only by the analysis of kinetic (fluxes, transport rate constants etc.) but not «static» characteristics of ion distribution. It is shown that under some circumstances the influence of NaK2Cl symport and chloride channel permeability on ion and water balance can be strong even at a very small symport share in the overall flux.
