

Посвящается памяти Л. М. Чайлахяна

РАСЧЕТ ПОТОКОВ K^+ , Na^+ И Cl^- ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ С Na^+/K^+ -НАСОСОМ, КОТРАНСПОРТЕРАМИ НКСС И NC И ИОННЫМИ КАНАЛАМИ С УЧЕТОМ НЕГОЛЬДМАНОВСКОГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ В K^+ -КАНАЛАХ. НОРМА И АПОПТОЗ

© А. А. Рубашкин, В. Е. Юринская, А. А. Веренинов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: verenino@mail.ru

В связи с исследованием механизма дегидратационного уменьшения объема клеток при апоптозе проведен расчет баланса потоков K^+ , Na^+ и Cl^- через плазматическую мембрану, в которой имеются ионные каналы, Na^+/K^+ -насос и котранспорт $Na^+K^+2Cl^-$ (НКСС) и Na^+Cl^- (NC). Показано, что, располагая данными о стационарных внутриклеточных концентрациях K^+ , Na^+ , Cl^- , полном входном потоке $Rb^+(K^+)$, ингибируемом убаином потоке $Rb^+(K^+)$ и потоке Cl^- , можно решением уравнений баланса потоков получить значения всех однонаправленных потоков, проницаемостей ионных каналов, мембранного потенциала. Это позволяет оценить изменение состояния трактов, в том числе тех, потоки через которые малы и не могут быть исследованы с помощью ингибиторов. Проведен расчет изменения ионного баланса у клеток U937, основанный на экспериментальных данных, полученных в предыдущей нашей работе (Юринская и др., 2010). Сделан вывод о том, что уменьшение объема клеток U937 при апоптозе, вызванном стауроспорином в концентрации 1 мкМ, обусловлено преимущественно снижением активности Na^+/K^+ -насоса в сочетании со снижением интегральной проницаемости Na^+ -каналов без существенного увеличения проницаемости K^+ - и Cl^- -каналов. Показано, что котранспорт НКСС и NC, обеспечивающий неравновесное стационарное распределение Cl^- , составляет небольшую часть общего потока Cl^- через мембрану и не может быть выделен с помощью ингибиторов.

Ключевые слова: поток Cl^- , ионные каналы, ионные транспортеры, ионный и водный баланс клетки, апоптоз.

В настоящее время число исследований, связанных с системным анализом ионного и водного баланса в клетке в целом, несопоставимо мало по сравнению с огромным количеством работ, посвященных исследованию систем переноса ионов через клеточную мембрану в отдельности. Между тем без системного анализа нельзя разобраться во многих случаях, когда речь идет о влиянии тех или иных транспортеров или каналов на процессы, развертывающиеся в целой клетке. К числу таких явлений относится, в частности, апоптоз, к ионной регуляции которого сейчас привлечено внимание многих исследователей (Yu, 2003; Burg et al., 2006; Okada et al., 2006; Bortner, Cidlowski, 2007; Lang et al., 2008; Hoffmann et al., 2009).

Основы расчета ионного и водного баланса клетки заложены давно (Jakobsson, 1980; Lew, Bookchin, 1986; Novotny, Jakobsson, 1996). В работах Веренинова с сотрудниками этот расчет был применен при исследовании механизма апоптозного сокращения объема клетки (Веренинов и др., 2004, 2006; Vereninov et al., 2007). Основная проблема здесь в привязке расчетных параметров к реально определяемым показателям и в построении системы уравнений, в которой используются только те параметры, которые могут быть определены в эксперименте. В предыдущей работе были проведены комплексные исследования потоков и распределения трех главных моновалентных ионов: K^+ , Na^+ и Cl^- у клеток U937,

апоптоз которых вызывали стауроспорином (Юринская и др., 2010). Было установлено, что скорость перераспределения моновалентных ионов в процессе апоптоза мала по сравнению со скоростью установления баланса входных и выходных потоков, и изменение ионного и водного баланса при апоптозе следует рассматривать как дрейф «квазисбалансированного» состояния. Это позволяет использовать уравнения материального баланса при исследовании распределения потоков по отдельным трактам. Изменение ионного и водного баланса при апоптозе — хорошая модель естественной регуляции ионного гомеостаза клетки. Подход, использованный при расчете баланса потоков в связи с изучением апоптоза, представляет общий интерес и может быть применен и в других случаях, например при изучении изменения ионного и водного баланса при переходе клеток к пролиферации.

Базовые уравнения

В рассматриваемой математической модели Na^+ и K^+ перемещаются через клеточную мембрану по ионным каналам, через Na^+/K^+ -насос и котранспортеры NC и НКСС, а Cl^- — через каналы и котранспортеры NC и НКСС. Такой набор трактов отражает основные механизмы переноса

са моновалентных ионов, достаточные для поддержания характерного для животных клеток стационарного распределения этих ионов между цитоплазмой и средой. Нетто-поток по каждому из этих трактов не равен нулю. Сумма же потоков по всем трактам для каждого вида ионов при стационарном их распределении равна нулю. Уравнения баланса потоков K^+ , Na^+ и Cl^- имеют следующий вид:

$$p_{Na} u \frac{[Na^+]_i \exp(u) - [Na^+]_o}{1 - \exp(u)} + J_{Na}^p + I_{NC}(1 - f_{NC}) + I_{NKCC}(1 - f_{NKCC}) = 0, \quad (1)$$

$$p_K u \frac{[K^+]_o \{\exp[n(u - \phi_K)] - 1\}}{1 - \exp(u)} + I_K^p + I_{NKCC}(1 - f_{NKCC}) = 0, \quad (2)$$

$$p_{Cl} u \frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_o \exp(u)}{1 - \exp(u)} + I_{NC}(1 - f_{NC}) + 2I_{NKCC}(1 - f_{NKCC}) = 0. \quad (3)$$

Первые члены в этих уравнениях представляют собой полные потоки через каналы, где p_{Na} , p_K и p_{Cl} являются проницаемостями каналов по Гольдману (Goldman, 1943; Jakobsson, 1980; Lew, Bookchin, 1986; Novotny, Jakobsson, 1996; Веренинов и др., 2004, 2006; Vereninov et al., 2007). Безразмерный потенциал u связан с мембранным потенциалом U в мВ соотношением $U = uRT/F$. Равновесный потенциал для K^+ в уравнении (2) связан с его концентрациями соотношением $\phi_K = \ln([K^+]_o/[K^+]_i)$. Параметр n введен в первый член уравнения (2) для учета эффекта невольмановского выпрямления в K^+ -каналах (Hodgkin, Keynes, 1955). В случае если $n = 1$, справедлива обычная формула Гольдмана для потока K^+ через каналы. Члены J_{Na}^p и I_K^p в уравнениях (1) и (2) отражают выходной поток Na^+ и входной поток K^+ через Na^+/K^+ -насос. Принято, что $J_{Na}^p = -1.5I_K^p$. Входной поток Na^+ и входной поток Cl^- со стехиометрией 1 : 1 через котранспортер NC в уравнениях (1) и (3) представлены членом I_{NC} . Член I_{NKCC} — это входной поток Na^+ , равный ему входной поток K^+ и половина входного потока Cl^- через котранспортер NKCC, переносящий эти ионы в соотношении 1 : 1 : 2 (Novotny, Jakobsson, 1996; Russell, 2000; Gamba, 2005). Выходные потоки ионов через котранспортеры NC и NKCC равны $J_{NC} = f_{NC} \cdot I_{NC}$ и $J_{NKCC} = f_{NKCC} \cdot I_{NKCC}$. Коэффициенты f_{NC} и f_{NKCC} , отражающие соотношение концентраций K^+ , Na^+ и Cl^- в клетке и среде, определяются выражениями

$$f_{NC} = [Na]_i [Cl]_i / ([Na]_o [Cl]_o),$$

$$f_{NKCC} = [Na]_i [K]_i [Cl]_i [Cl]_i / ([Na]_o [K]_o [Cl]_o [Cl]_o).$$

Котранспорт NC может осуществляться либо одним переносчиком типа TSC (по генной номенклатуре SLC12A3) (Mount et al., 1998; Gamba, 2005), либо двумя функционально связанными обменниками, такими как NHE (SLC9A) и Cl^-/HCO_3^- (SLC4) (Hoffmann, 1982; Russell, 2000). Котранспорт NKCC осуществляется переносчиками семейства SLC12A1, A2 (Mount et al., 1998; Russell, 2000; Gamba, 2005).

Системы переноса, в которых имеет место эквивалентный обмен ионов одного вида с нулевым нетто-поток, в анализируемой модели не рассматриваются. Балансовые уравнения (1) и (3) не включают в себя такие потоки. Следует, однако, помнить, что их вклад в экспериментально измеряемые однонаправленные потоки может быть значительным (Hoffmann, 1982; Vereninov et al., 2007) и это может создавать трудности в определении потоков по другим трактам.

В настоящей работе принято, что I_{Cl} — экспериментально измеренный поток Cl^- , величина которого используется в расчетах как одна из базовых характеристик, содержит только компоненты, входящие в балансовые уравнения (1)—(3). Это означает, что поток I_{Cl} не содержит компонента, относящегося к эквивалентному обмену Cl^-/Cl^- , и может быть представлен как сумма входных потоков через каналный и котранспортерные тракты:

$$I_{Cl} = -p_{Cl} u \frac{[Cl^-]_o e^u}{1 - e^u} + 2I_{NKCC} + I_{NC}. \quad (4)$$

Из уравнений (3) и (4) выводится выражение, которое позволяет связать поток I_{NKCC} с мембранным потенциалом u :

$$I_{NKCC}(u) = I_{Cl} \frac{b}{2(1+b)} \left(\frac{1 - \exp(u - \phi_{Cl})}{1 - f \exp(u - \phi_{Cl})} \right), \quad (5)$$

где $\phi_{Cl} = \ln([Cl^-]_i/[Cl^-]_o)$. Параметр f вводится по формуле $f = (f_{NC} + b f_{NKCC}) / (1 + b)$, а параметр b характеризует соотношение входных потоков Cl^- через котранспортеры NKCC и NC:

$$b = 2I_{NKCC}/I_{NC}. \quad (6)$$

Мембранный потенциал u может быть связан также с отношением входного и выходного потоков K^+ через каналы, если использовать известную формулу Уссинга (Ussing, 1949) или ее более общий вариант, предусматривающий возможность эффекта выпрямления в K^+ -каналах (Hodgkin, Keynes, 1955):

$$\frac{J_K^G}{I_K^G} = -\exp[n(u - \phi_K)]. \quad (7)$$

Входной поток калия I_K^G и выходной поток J_K^G через каналы могут быть найдены вычитанием из полного потока K^+ потоков через насос и котранспортер NKCC:

$$I_K^G = \{I_K - I_K^p - I_{NKCC}\}, \quad J_K^G = \{-I_K + f_{NKCC} I_{NKCC}\}.$$

Подстановка этих потоков в соотношение (7) приводит к уравнению, связывающему мембранный потенциал u с полным входным потоком K^+ , насосным калиевым потоком I_K^p , входным потоком I_{NKCC} и соотношением концентраций K^+ , Na^+ и Cl^- в клетке и среде (коэффициентом f_{NKCC}):

$$\{I_K - I_K^p - I_{NKCC}(u)\} \exp[n(u - \phi_K)] - \{-I_K + f_{NKCC} I_{NKCC}(u)\} = 0. \quad (8)$$

Комбинация уравнений (8) и (5) приводит к трансцендентному уравнению для u , которое решали численно

при различных значениях параметров b и n с использованием данных табл. 1. Проницаемости каналов и потоки ионов определяли после этого по приведенным выше формулам подстановкой в них найденного значения потенциала.

Анализ баланса потоков в реальном случае

В табл. 1 представлены экспериментальные данные, по которым был проведен расчет баланса парциальных потоков K^+ , Na^+ и Cl^- через плазматическую мембрану клеток U937 в норме и при апоптозе, вызванном 1 мкМ стауропоорином (Юринская и др., 2010). Данные табл. 1 не позволяют определить, каково соотношение потоков Cl^- по трактам NC и NKCC, т. е. параметр b , и имеет ли место эффект выпрямления в K^+ -каналах, т. е. каково значение параметра n . Поэтому расчет проводили для разных b и n . Необходимо отметить, что в соответствии с уравнением (1) баланс потоков возможен при выполнении условий $I_{NKCC} + I_{NC} \leq (1.5I_K^p)$ и $I_{NC}^{max} < (-J_{Na}^p)/(1 - f_{NC})$. Минимально возможное значение параметра b , определяемого как $b_{min} = (2I_{NKCC}^{min}/I_{NC}^{max})$, соответствует случаю $p_{Na} = 0$. Баланс потоков возможен только в области $(2I_{NKCC}/I_{NC}) > b_{min}$. Существование ограничения со стороны малых значений b свидетельствует о том, что без NKCC баланс потоков K^+ , Na^+ и Cl^- в клетках с рассматриваемыми свойствами не может быть достигнут, хотя величина этого котранспорта, как будет показано ниже, может быть малой. Например, для случая нормальных клеток без выпрямления в K^+ -каналах I_{NKCC}^{min} составляет менее 2 % от полного входного потока калия.

В предельном случае, когда в системе нет тракта NC, в переносе K^+ , Na^+ и Cl^- принимают участие только ионные каналы, насос и котранспортер NKCC и нет эффекта выпрямления в K^+ -каналах ($n = 1$), решение указанных выше системы уравнений дает набор значений парциальных потоков, коэффициентов проницаемости и мембранного потенциала, представленный в табл. 2.

Если принять, что в K^+ -каналах имеет место эффект выпрямления и $n = 3$, значения потоков K^+ через каналы и тракт NKCC и соответственно коэффициент проницаемости K^+ -каналов получаются иными, чем при $n = 1$, тогда как другие параметры и мембранный потенциал практи-

чески не изменяются. Существенно, однако, что изменения при апоптозе основных трактов переноса, кроме K^+ -каналов, в сравниваемых случаях качественно одинаковы.

Таблица 2

Входные (I) и выходные (J) потоки ионов по различным трактам, проницаемости ионных каналов (p) и мембранный потенциал (U) у клеток U937 в норме и при апоптозе

Показатель	Без выпрямления, $n = 1$		С выпрямлением, $n = 3$	
	норма	апоптоз	норма	апоптоз
Модель NKCC				
I_{NKCC}	0.148*	0.334	0.682	0.772
J_{NKCC}	-0.114	-0.179	-0.523	-0.414
J_{Na}^p	-5.51	-2.43	-5.51	-2.43
I_{Na}^g	6.06	2.55	5.92	2.32
J	-0.59	-0.27	-0.57	-0.24
I_K^p	3.67	1.62	3.67	1.62
I_K^g	0.54	0.46	0.01	0.02
J_K^g	-4.25	-2.23	-3.84	-2.00
I_{Cl}^g	32.20	26.83	31.14	25.96
J_{Cl}^g	-32.27	-27.14	-31.45	-26.67
p_{Na}	0.027*	0.010	0.026	0.009
p_K	0.058*	0.042	0.001	0.002
p_{Cl}	0.484*	0.509	0.470	0.497
U	-27.4	-37.7	-27.6	-38.1
Модель NKCC+NC				
I_{NC}	0.287	0.645	1.361	1.538
J_{NC}	-0.028	-0.070	-0.133	-0.166
I_{NKCC}	0.143	0.323	0.681	0.769
J_{NKCC}	-0.110	-0.173	-0.522	-0.412
J_{Na}^p	-5.51	2.43	-5.51	-2.43
I_{Na}^g	5.77	1.90	4.54	0.78
J_{Na}^g	-0.56	-0.20	-0.42	-0.08
I_K^p	3.67	1.62	3.67	1.62
I_K^g	0.55	0.47	0.01	0.02
J_K^g	-4.25	-2.24	-3.84	-2.00
I_{Cl}^g	31.93	26.21	29.78	24.42
J_{Cl}^g	-32.25	-27.08	-31.32	-26.51
p_{Na}	0.026	0.007	0.020	0.003
p_K	0.059	0.043	0.001	0.002
p_{Cl}	0.482	0.503	0.461	0.484
U	-27.6	-38.3	-28.7	-39.6

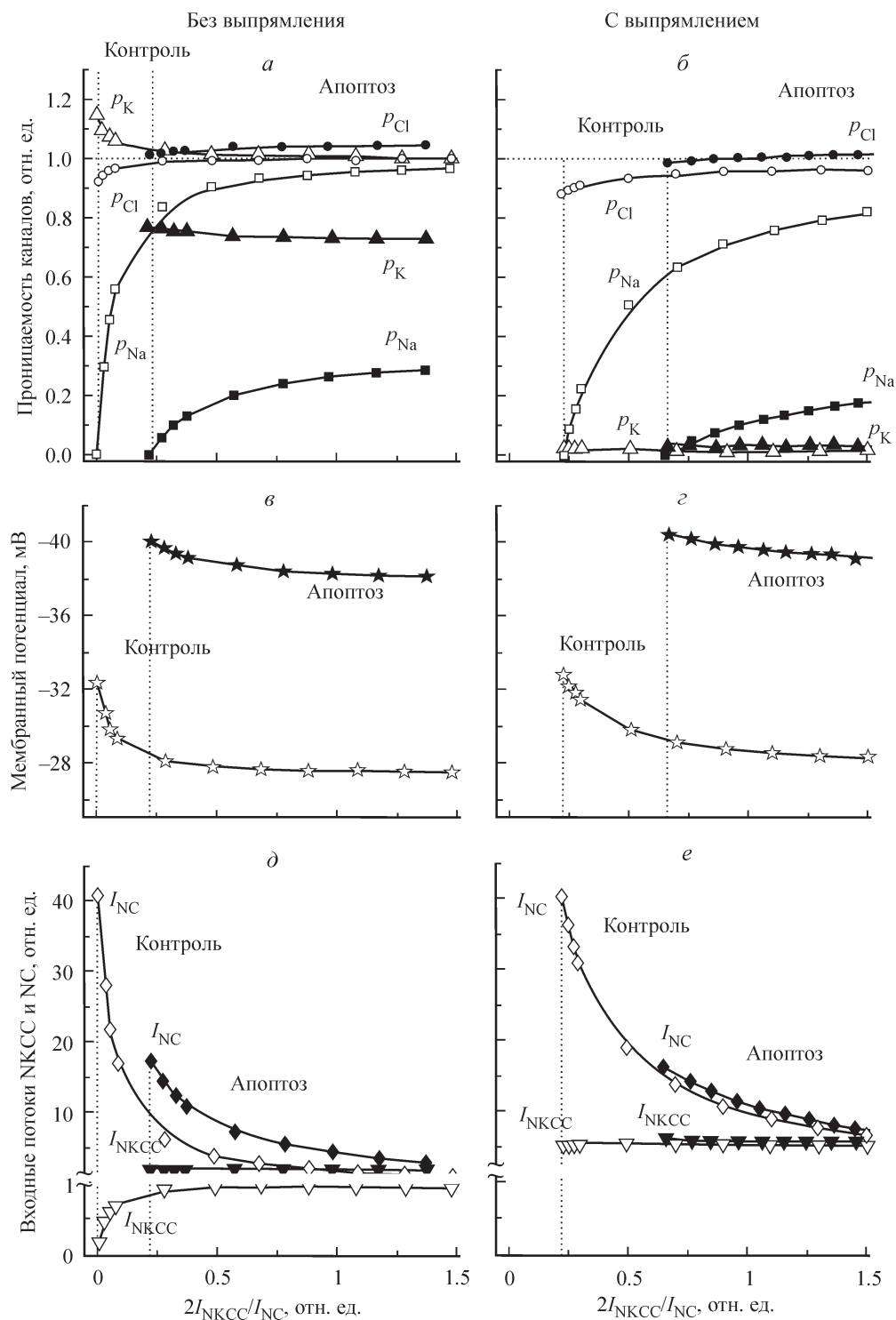
Таблица 1

Экспериментальные значения входных потоков ионов и их концентраций в клетках U937 в норме и при апоптозе, по которым рассчитаны потоки ионов по различным трактам и коэффициенты проницаемости каналов, приведенные в табл. 2 и на рисунке

Условие	I_K	I_K^p	I_{Cl}	$[Na^+]_i$	$[K^+]_i$	$[Cl^-]_i$	$[Na^+]_o$	$[K^+]_o$	$[Cl^-]_o$
	мкмоль · г ⁻¹ · мин ⁻¹			концентрация, мМ					
Норма	4.36	3.67	32.5	39	126	41	140	5.8	116
Апоптоз	2.41	1.62	27.5	62	116	29	140	5.8	116

Примечание. $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ и $[Cl^-]_i$ — концентрации ионов в клетке (с подстрочным индексом о — в среде); I_K — полный входной поток K^+ , I_K^p — поток K^+ , ингибируемый 0.1 мМ убаиноном (насос); I_{Cl} — полный входной поток Cl^- . Данные получены, как описано в нашей предыдущей работе, и относятся к клеткам U937-160B2, апоптоз которых вызывали стауропоорином в концентрации 1 мкМ (Юринская и др., 2010).

Примечание. Подстрочными и надстрочными индексами показаны ионы и тракты, к которым относятся потоки: системы котранспорта NKCC, NC, каналы — G и насос — P. I_{NKCC} — это входной поток Na^+ , равный ему входной поток K^+ и половина входного потока Cl^- через котранспортер NKCC. Вычисленные значения соответствуют экспериментальным значениям, приведенным в табл. 1. Расчет проведен с учетом и без учета эффекта выпрямления в калиевых каналах для двух случаев, когда в клетке имеется лишь один котранспортер NKCC или когда одновременно присутствуют NCKK и NC с одинаковыми потоками Cl^- через них ($I_{NKCC} = 0.5 \cdot I_{NC}$). Размерность потоков I , J — мкмоль · г⁻¹ · мин⁻¹, коэффициентов проницаемости p_{Na} , p_K , p_{Cl} мембранного потенциала U — мВ. Принято, что измеренный поток Cl^- не содержит компонента, относящегося к системе эквивалентного обмена. Звездочками отмечены реперные значения для приведенных на рисунке безразмерных величин.



Зависимость расчетного значения проницаемостей для каналов Na^+ , K^+ и Cl^- (а, б), мембранного потенциала U (в, з) и входных потоков через котранспортеры НКСС и NC (д, е) от соотношения входных потоков Cl^- по тракту НКСС и NC.

Черные значки соответствуют апоптозным, а светлые — нормальным клеткам. а, в, д — калиевые каналы «без выпрямления» ($n = 1$); б, з, е — калиевые каналы «с выпрямлением» ($n = 3$). Изменения p_{Na} , p_K , p_{Cl} , I_{NKCC} показаны по отношению к соответствующим значениям у нормальных клеток, отмеченным в табл. 2 звездочкой. Поток I_{NC} приведен по отношению к потоку I_{NKCC} , отмеченному в табл. 2 звездочкой.

Когда в системе есть два котранспортера, НКСС и NC, решение системы уравнений (5) и (8) зависит от соотношения потоков по этим трактам, которое характеризуется параметром b . В табл. 2 приведены результаты для частного случая $b = 1$, а на рисунке показано, как вычисляемые значения коэффициентов проницаемости, парциальные потоки и мембранный потенциал изменяются при вариации соотношения потоков по трактам НКСС и NC в широком интервале. Можно видеть (см. рисунок, *a*, *б*), что при уменьшении b наступает момент, когда поток Na^+ через каналы становится исчезающе малым, p_{Na} приближается к нулю и далее переходит в запрещенную область отрицательных значений. Существование предела, как уже отмечалось выше, означает невозможность баланса потоков при произвольном соотношении потоков по трактам НКСС и NC. Как показывают представленные данные, у нормальных и апоптозных клеток предельно допустимые значения b различаются. Это связано с разными значениями исходных экспериментальных данных для нормальных и апоптозных клеток (табл. 1). Предельное значение b изменяется и в том случае, когда вводится эффект выпрямления в K^+ -каналах.

Существенно ли сказывается неопределенность в выборе b на получаемых расчетом значениях коэффициентов проницаемости и мембранного потенциала? Нетрудно видеть, что значения p_{K} и p_{Cl} при широких вариациях b изменяются всего на 10–20 %, а значение мембранного потенциала — на 2–5 мВ. Только p_{Na} изменяется существенно в области малых значений b .

При введении эффекта выпрямления в K^+ -каналах, естественно, изменяется соотношение между прямым и обратным потоками K^+ через каналы, изменяются значения p_{K} и потока K^+ по тракту НКСС. Расчетные значения коэффициентов проницаемости p_{Na} , p_{Cl} и мембранного потенциала изменяются при этом незначительно.

Значение параметра b наиболее существенно отражается на соотношении парциальных потоков по трактам НКСС и NC. Следует отметить, что поток Cl^- через НКСС оказывается малым по сравнению с общим потоком Cl^- во всей области значений b . Так например, при $b = 10$ он составляет только 1 % от I_{Cl} , и это максимально возможная величина при отсутствии эффекта выпрямления в Ca^{2+} -каналах. В противоположном случае, если, например, I_{NC} в 40 раз больше, чем I_{NKCC} , абсолютное значение I_{NC} составляет 5.9 мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$ ($40 \cdot 0.148 = 5.9$), т. е. 18 % полного входного потока Cl^- , равного 32.5 мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$ (табл. 1). Таким образом, при $I_{\text{NC}} \gg I_{\text{NKCC}}$ парциальный поток I_{NC} может быть выделен ингибиторным анализом, тогда как при $I_{\text{NKCC}} \gg I_{\text{NC}}$ поток I_{NKCC} слишком мал, чтобы его можно было заметить на фоне большого общего потока Cl^- .

Изменения в основных трактах переноса K^+ , Na^+ и Cl^- при апоптозе клеток U937, вызванном 1 мкМ стауроспорином

Полученные экспериментальные и расчетные данные позволяют определить, с изменениями каких трактов могут быть связаны изменения ионного и водного баланса у рассматриваемых клеток. В предшествующей работе (Юринская и др., 2010) показано, что изменение при апоптозе водного баланса клетки, содержания моновалентных ионов и их потоков обусловлено не только изменением проницаемости клеточной мембраны, но и изме-

нением содержания в клетке не проникающих через мембрану внутриклеточных осмолитов. На уменьшение при апоптозе активности Na^+/K^+ -насоса достаточно определенно указывает уменьшение ингибируемого убаином входного потока I_{K}^{P} (Vereninov et al., 2008; Юринская и др., 2010). Судить об изменении свойств других трактов, в частности ионных каналов и систем котранспорта, можно по параметрам, полученным в результате расчета. Наиболее интересным и новым здесь является уменьшение интегральной проницаемости Na^+ -каналов (p_{Na}), которое имеет место во всех рассмотренных случаях (см. рисунок, *a*, *б*) и которое является главной причиной отсутствия набухания клетки и даже ее дегидратации, несмотря на снижение активности Na^+/K^+ -насоса. Этот вывод остается в силе независимо от принимаемых допущений относительно соотношения потоков по трактам НКСС и NC и эффекта выпрямления в K^+ -каналах. Расчет показывает, что интегральная проницаемость K^+ -каналов в рассматриваемом случае несколько уменьшается, если отсутствует выпрямление в K^+ -каналах, и увеличивается при наличии эффекта выпрямления (табл. 2). Интегральная проницаемость Cl^- -каналов, оцениваемая по p_{Cl} , в исследованном случае существенно не изменяется. Изменение при апоптозе внутриклеточного содержания Cl^- следует связывать с гиперполяризацией клетки примерно на 10 мВ (см. рисунок, *в*, *г*). Согласно литературным данным, при апоптозе происходит деполяризация плазматической мембраны клетки (Bortner et al., 2001; Düssmann et al., 2003; Franco et al., 2006). Это расхождение может быть обусловлено особенностями клеток или разными стадиями апоптоза, но может быть обусловлено и неадекватностью использованной нами модели. Специальный анализ показал, что деполяризацию клетки можно получить при тех же исходных экспериментальных данных, если ввести в модель котранспортер KCC и предположение, что при апоптозе котранспорт K^+/Cl^- уменьшается. Из выражения (7) можно вывести формулу для мембранного потенциала U в случае при наличии в системе трех котранспортеров:

$$U = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{K}]_o}{[\text{K}]_i} - \frac{1}{n} \ln \frac{I_{\text{K}} - I_{\text{NKCC}} f_{\text{NKCC}} - I_{\text{KCC}} f_{\text{KCC}}}{I_{\text{K}} - I_{\text{K}}^{\text{P}} - I_{\text{NKCC}} - I_{\text{KCC}}}, \quad (9)$$

где I_{KCC} — входной поток K^+ и Cl^- через котранспортер KCC, а f_{KCC} определяется как $f_{\text{KCC}} = [\text{K}]_i [\text{Cl}]_i / ([\text{K}]_o [\text{Cl}]_o)$. Уменьшение I_{KCC} при апоптозе согласно формуле (9) приводит к деполяризации плазматической мембраны клетки.

Ранее высказывалось предположение о том, что важную роль в апоптозной дегидратации клетки играют изменения в системах котранспорта НКСС и NC (Веренинов и др., 2004, 2006; Vereninov et al., 2007). Представленные выше расчеты подтверждают, что без этих систем реально наблюдаемые баланс потоков K^+ , Na^+ и Cl^- и неравновесное стационарное распределение Cl^- невозможны. Вместе с тем выясняется, что потоки по этим трактам могут быть небольшими. Эти потоки трудно выявить и исследовать с помощью ингибиторного анализа. Как показывают приведенные расчеты, при апоптозе эти потоки не изменяются или несколько возрастают, но изменяется ли при этом соотношение между потоками по трактам НКСС и NC, в настоящее время сказать невозможно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

09-04-00301a) и того же фонда совместно с Германией (фонд DFG, проект 436 RUS 113/488/0-2R и РФФИ 06-04-04000).

Список литературы

- Веренинов А. А., Юринская В. Е., Рубашкин А. А. 2004. Роль калия, калиевых каналов и симпортеров в апоптозном сокращении клеточного объема. Эксперимент и теория. Докл. РАН. 398 (4) : 555—559.
- Веренинов А. А., Юринская В. Е., Рубашкин А. А. 2006. Апоптозная дегидратация лимфоидных клеток: моделирование изменения баланса ионных потоков. Докл. АН. 411 (6) : 824—828.
- Юринская В. Е., Горячая Т. С., Рубашкин А. А., Широкова А. В., Веренинов А. А. 2010. Перераспределение K^+ , Na^+ и Cl^- и потоки Cl^- при апоптозе клеток U937, вызванном стауроспирином. К механизму апоптозной дегидратации клеток. Цитология. 52 (7) : 562—567.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 462 : 176—188.
- Bortner C. D., Gomez-Angelats M., Cidlowski J. A. 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 276 : 4304—4314.
- Burg E. D., Remillard C. V., Yuan J. X.-J. 2006. K^+ channels in apoptosis. J. Membr. Biol. 209 : 3—20.
- Düssmann H., Rehm M., Kögel D., Prehn J. H. M. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. J. Cell Sci. 116 : 525—536.
- Franco R., Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2006. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. J. Membr. Biol. 209 : 43—58.
- Gamba G. 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. Physiol. Rev. 85 : 423—493.
- Goldman D. E. 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. J. Gen. Physiol. 27 : 37—60.
- Hodgkin A. L., Keynes R. D. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre. J. Physiol. 128 : 61—88.
- Hoffmann E. K. 1982. Anion exchange and anion-cation co-transport systems in mammalian cells. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 299 : 519—535.
- Hoffmann E. K., Lambert I. H., Pedersen S. F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol. Rev. 89 : 193—277.
- Jakobsson E. 1980. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. Amer. J. Physiol. 238 : C196—C206.
- Lang F., Gulbins E., Szabo I., Vereninov A., Huber S. M. 2008. Ion channels, cell volume, cell proliferation and apoptotic cell death. In: Sensing with ion channels. Heidelberg: Springer-Verlag. 69—84.
- Lew V. L., Bookchin R. M. 1986. Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model. J. Membr. Biol. 92 : 57—74.
- Mount D. B., Delpire E., Gamba G., Hall A. E., Poch E., Hoover R. S., Hebert S. C. 1998. The electroneutral cation-chloride cotransporters. J. Exp. Biol. 201 : 2091—2102.
- Novotny J. A., Jakobsson E. 1996. Computational studies of ion-water flux coupling in the airway epithelium. II. Role of specific transport mechanisms. Amer. J. Physiol. 270 : C1751—C1772.
- Okada Y., Shimizu T., Maeno E., Tanabe S., Wang X., Takahashi N. 2006. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. J. Membr. Biol. 209 : 21—29.
- Russell J. M. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. Physiol. Rev. 80 : 211—276.
- Ussing H. H. 1949. The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. Acta Physiol. Scand. 19 : 43—56.
- Vereninov A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Vassilieva I. O., Yurinskaya V. E., Lang F., Rubashkin A. A. 2007. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. Cell Biol. Int. 31 : 382—394.
- Vereninov A. A., Rubashkin A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Strelkova E. G., Lang F., Yurinskaya V. E. 2008. Pump and channel K^+ (Rb^+) fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937. Cell. Physiol. Biochem. 22 : 187—194.
- Yu S. P. 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. Prog. Neurobiol. 70 : 363—386.

Поступила 10 XII 2009

COMPUTATION OF THE K^+ , Na^+ AND Cl^- FLUXES THROUGH PLASMA MEMBRANE OF ANIMAL CELL WITH Na^+/K^+ PUMP, NKCC, NC COTRANSPORTERS, AND IONIC CHANNELS WITH AND WITHOUT NON-GOLDMAN RECTIFICATION IN K^+ CHANNELS. NORMA AND APOPTOSIS

A. A. Rubashkin, V. E. Yurinskaya, A. A. Vereninov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: verenino@mail.ru

The balance of K^+ , Na^+ and Cl^- fluxes through cell membrane with the Na^+/K^+ pump, ion channels and NKCC and NC cotransporters is considered. It is shown that all unidirectional K^+ , Na^+ and Cl^- fluxes through cell membrane, permeability coefficients of ion channels and membrane potential can be computed for balanced ion distribution between cell and the medium if K^+ , Na^+ and Cl^- concentration in cell water and three fluxes are known: total Cl^- flux, total K^+ influx and ouabain-inhibitable «pump» component of the K^+ influx. Changes in the monovalent ion balance in lymphoid cells U937 induced to apoptosis by 1 μ M staurosporine are analyzed as an example. It is found that the apoptotic shift in ion and water balance in studied cells is caused by a decrease in the pump activity which is accompanied by a decrease in the integral permeability of Na^+ channels without significant increase in K^+ and Cl^- channel permeabilities. Computation shows that only a small part of the total fluxes of K^+ , Na^+ and Cl^- accounts for the fluxes via NKCC and NC cotransporters. Therefore, cotransport fluxes can not be studied using inhibitors.

Key words: cell ion and water balance, apoptosis, ion channels, ion transporters, Cl^- fluxes.