

УДК 612.81 + 577.352.31

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗА
МИЕЛИНИЗИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН АМФИБИЙ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕТРАЭТИЛАММОНИЯ

Кузнецова И.В., *Евстигнеев Д.А., Глухова Н.В., **Глухов В.П.

*Ульяновский государственный педагогический университет***Ульяновское высшее авиационное училище гражданской авиации****Ульяновский институт повышения квалификации и переподготовки
работников образования*

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

Действие блокатора быстрых и медленных калиевых каналов тетраэтиламмония (ТЭА) изучалось при помощи метода внеклеточной регистрации электрической активности миелинизированных нервных волокон *Rana ridibunda* Pallas. ТЭА приводит к постоянному росту следовой деполяризации (СД) по мере увеличения времени действия блокатора, что отличается от трёхфазного характера изменения длительности СД под влиянием блокатора быстрых калиевых каналов 4-аминопиридина. Подавление натриевого тока блокаторами натриевых каналов приводит к уменьшению площади вызванного ТЭА многоспайкового ответа и уменьшению длительности СД, что противоположно эффекту совместного действия блокаторов натриевых каналов и 4-аминопиридина: подавление натриевого тока приводит к уменьшению площади вызванного 4-аминопиридина многоспайкового ответа, но длительность СД при этом увеличивается. СД под влиянием ТЭА в начальной части ритмической стимуляции слегка возрастает от спайка к спайку, что отличается от эффекта блокатора быстрых калиевых каналов 4-АП, в присутствии которого СД в начальной части ритмической стимуляции от спайка к спайку уменьшается. Выявленные различия в эффектах ТЭА и 4-аминопиридина определяются различным вкладом быстрых и медленных калиевых токов в реполяризацию мембраны.

ВВЕДЕНИЕ

Первой работой, вышедшей после 1952 года (года создания ионной теории возбуждения Ходжкина-Хаксли) и посвящённой изучению действия тетраэтиламмония (ТЭА) на электрическую активность нервных волокон, стала статья В. Бурке с соавторами [8]. В немиелинизированных нервных волокнах краба, избранных авторами для исследования, ТЭА приводил к продлению потенциала действия (ПД), что связывалось авторами с уменьшением выхода ионов калия из аксона. В экспериментах на гигантских аксонах кальмара [19] показано, что внутриаксональное введение ТЭА вызывает значительное расширение нисходящей фазы ПД с образованием дли-

тельного (10–30 мс) плато, в то время как применение ТЭА с наружной стороны мембраны не сказывается на параметрах ПД. В дальнейшем факт продления ПД под действием ТЭА был установлен и для миелинизированных нервных волокон амфибий [1, 6, 17, 18]. Как выяснилось, степень продления ПД под влиянием ТЭА зависит от того, является ли нервное волокно сенсорным или моторным. В сенсорных нервных волокнах ПД расширялся в 2 раза, а в моторных – более чем в 3 раза [18]. В отличие от гигантских аксонов кальмара, в миелинизированных нервных волокнах амфибий ТЭА подавляет калиевый ток как при наружном, так и при внутриаксональном применении [14].

Исключительно важным для понимания механизма действия ТЭА стало разделение калиевой проводимости нодалльной мембраны миелинизированных нервных волокон амфибий на две составляющие, быструю и медленную [2, 10, 13], и установление факта, что блокаторы калиевых каналов 4-аминопиридин (4-АП) и ТЭА различаются по способности блокировать данные два вида калиевой проводимости [10]. ТЭА блокирует как быструю, так и медленную компоненты калиевой проводимости [10, 13], а 4-АП – только быструю [10]. С этого времени блокаторы калиевых каналов 4-АП и ТЭА стали использоваться как инструмент для разделения быстрой и медленной калиевой проводимости и установления их роли в генерации электрических ответов различных нервных мембран [11, 15]. Это позволило не только эффективно идентифицировать быстрые и медленные калиевые каналы, но также определять характер их распределения в различных (нодалльных, пара- и интернодалльных) участках мембраны в норме и при де- и ремиелинизации [9, 12, 16].

Проведённые нами эксперименты показали, что далеко не все эффекты ТЭА известны и интерпретированы с позиции наличия в миелинизированных нервных волокнах двух (быстрой и медленной) калиевых проводимостей. Целью настоящей работы явилось описание эффектов ТЭА на спайковую и следовую часть ПД миелинизированных нервных волокон амфибий. Результаты настоящей работы представлены ранее в виде краткого сообщения [5].

МЕТОДИКА

Эксперименты (всего 42) проводили на одиночных миелинизированных нервных волокнах озёрной лягушки *Rana ridibunda* Pallas. Препаровку нервного волокна проводили таким образом, что изолировали лишь интернодалльную часть волокна, а перехват Ранвье, от которого в последующем отводили ПД, оставляли интактным в нервном стволе. Схема расположения нервного волокна в экспериментальной камере приведена ранее [3].

Раздражение нервного волокна производили одиночными (длительностью 0.1 мс) и ритмическими (частотой 10, 50, 100 и 300 Гц) прямоугольными стимулами. Используемый в экспериментах раствор Рингера имел следующий состав (в ммоль/л): NaCl – 111; KCl – 2.5; CaCl₂ – 1.95; NaHCO₃ – 1.2. Эксперименты проводили при температуре 17–22° С. Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ответ на приложение к нервному волокну одиночного деполяризующего стимула возникал ПД (рис. 1), амплитуда которого в среднем составила 74.79 ± 9.78 мВ. Спайковая часть ПД переходила в хорошо выраженную следовую деполяризацию (СД), амплитуда и длительность которой составили в среднем 2.18 ± 0.54 мВ и 176.47 ± 37 мс соответственно.

Добавление к раствору Рингера, омывающему исследуемый перехват Ранвье, ТЭА в концентрации 10 ммоль/л вызывает расширение ПД (рис. 1, А). Длительность ПД, измеренная на уровне 1/3 амплитуды спайки, на 7 минуте действия ТЭА увеличилась по сравнению с исходной в 1.5–1.7 раза. По мере выдерживания нервного волокна в растворе Рингера с ТЭА происходило дальнейшее увеличение длительности ПД (вплоть до 3-кратного увеличения по сравнению с нормой), что сопровождалось ростом амплитуды и длительности СД.

Появление повторной активности под влиянием ТЭА отмечалось в сравнительно небольшом (20%) количестве случаев. Увеличение концентрации блокатора с 10 до 20 ммоль/л вело к возрастанию вероятности появления повторных ответов. На рис. 1, Б представлена типичная осциллограмма ответа нервного волокна в случае возникновения под действием ТЭА повторной активности. При увеличении времени действия блокатора количество повторных ответов возрастает и наблюдается рост амплитуды и длительности СД.

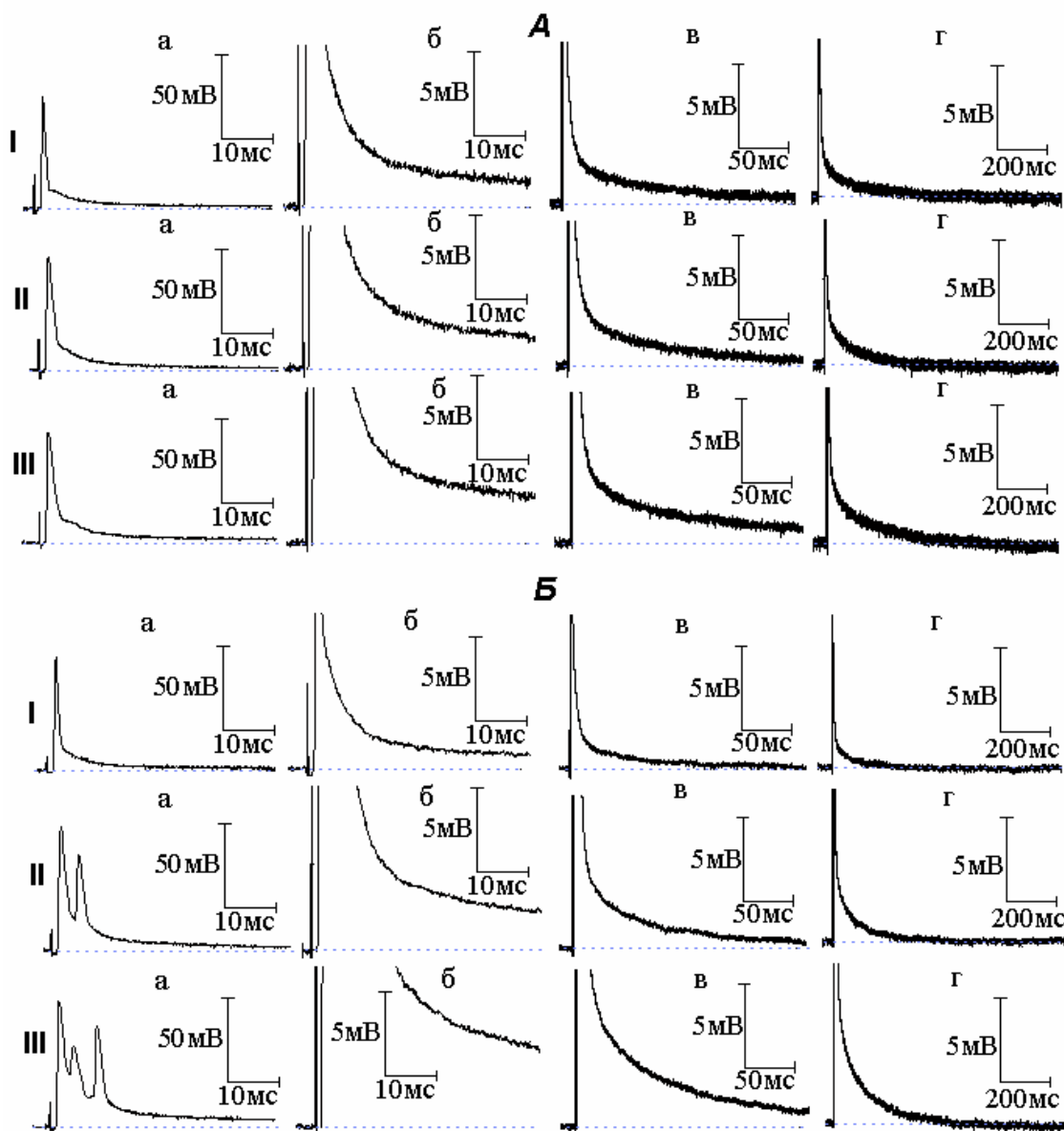


Рис. 1. Изменение электрической активности миелинизированных нервных волокон амфибий под влиянием тетраэтиламмония (ТЭА). А – вызванное ТЭА расширение потенциала действия (ПД): I – ПД (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера; II и III – то же через 6 (II) и 15 (III) минут действия ТЭА (10 момль/л). Б – возникновение под действием ТЭА повторной активности: I – ПД (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера; II и III – то же после 5 (II) и 10 (III) минут действия ТЭА

Вызванные ТЭА изменения длительности СД резко отличаются от изменений СД, наблюдаемых в опытах с другим блокатором калиевых каналов – 4-аминопиридином [4]. Если при блокировании 4-АП быстрых калиевых каналов длительность СД изменяется в три фазы (первоначальное увеличение, дальнейшее прекращение роста и, наконец, уменьшение

длительности СД с переходом последней в следовую гиперполяризацию), то блокирование ТЭА быстрых и медленных калиевых каналов приводит лишь к однофазному изменению длительности СД – её постоянному росту по мере действия блокатора. Итак, изменения СД в присутствии 4-АП определяются различным вкладом быстрых и медленных калиевых каналов в

реполяризацию мембраны: по мере всё большего блокирования 4-АП быстрых калиевых каналов и увеличения деполяризации мембраны (оцениваемой по росту площади ПД) их вклад в реполяризацию уменьшается, а активность медленных калиевых каналов увеличивается, что и приводит к характерному трёхфазному изменению длительности СД. В присутствии ТЭА такая ситуация не наблюдается вследствие блокирования обоих типов калиевых каналов, что и ведёт к однофазному изменению длительности СД. Необходимо отметить, что ТЭА, подавляя активность обоих типов калиевых каналов, более эффективно блокирует быстрые кана-

лы [10, 11, 13]. Согласно данным J.M. Dubois [10], ТЭА в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ моль уменьшает быстрый калиевый ток до 34.0 ± 2.2 % от исходного значения, а медленный – до 47.7 ± 3.3 % от исходного, то есть в этих условиях можно говорить о некотором преобладании медленного тока над быстрым (как видно, оно составляет всего 13.7 %). Это преобладание, разумеется, ни в какое сравнение не идёт с ситуацией блокирования калиевых каналов только 4-АП, когда быстрый калиевый ток блокируется почти полностью, а медленный калиевый ток вообще не затрагивается.

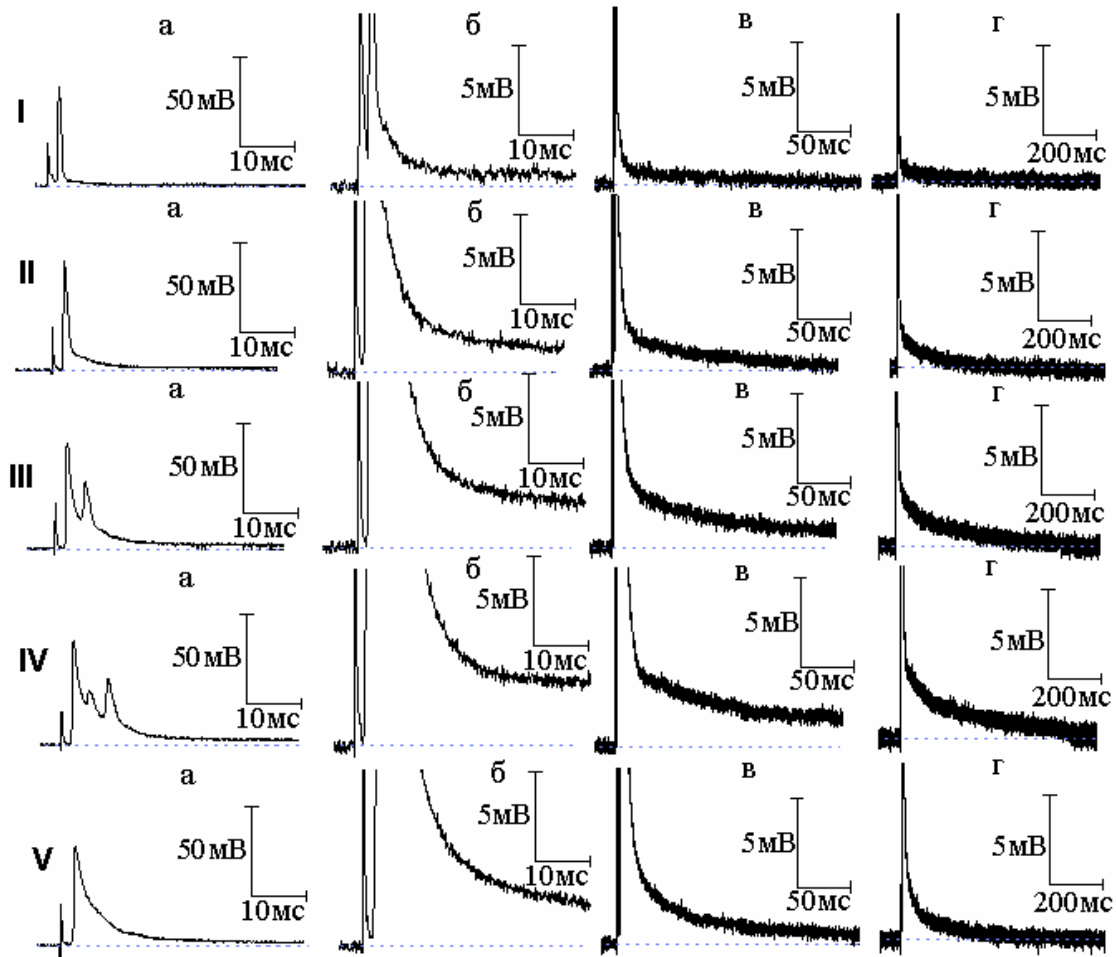


Рис. 2. Эффект совместного действия тетраэтиламмония (ТЭА) и новокаина: I – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера; II, III, IV – то же после 7 (II), 10 (III) и 11 (IV) минут действия 10 ммоль/л ТЭА; V – то же после добавления к раствору Рингера, содержащему ТЭА, новокаина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл

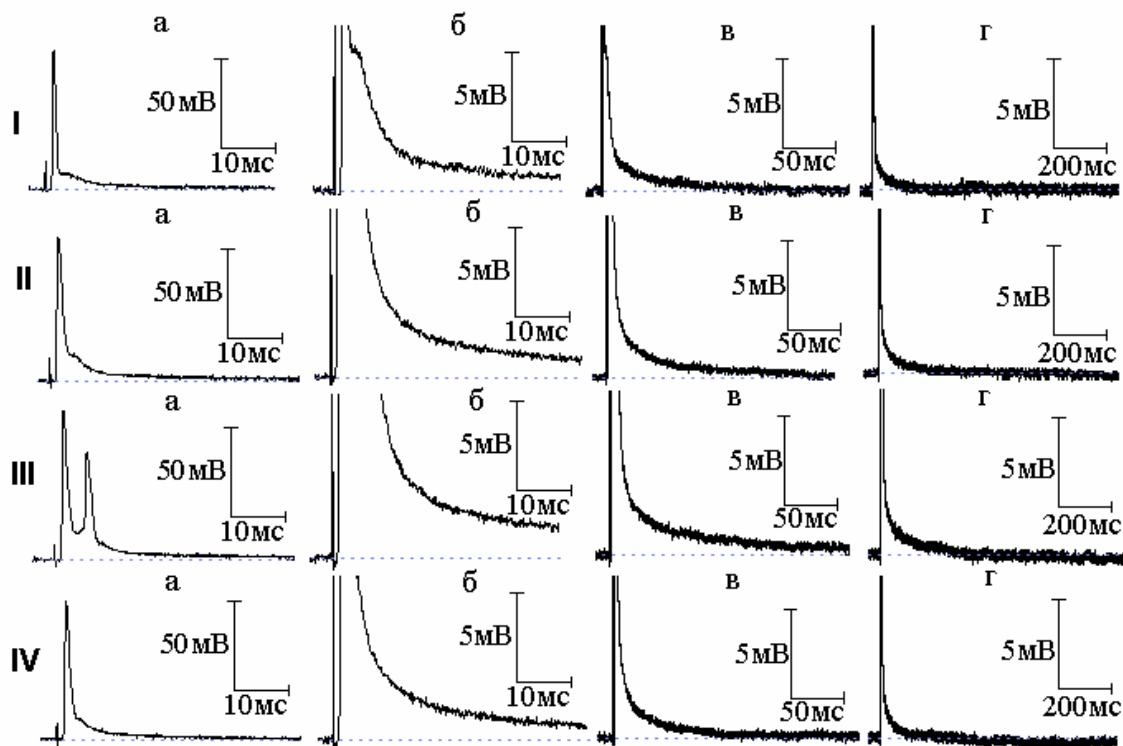


Рис. 3. Эффект совместного действия тетраэтиламмония (ТЭА) и тетродотоксина: I – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера; II, III – то же после 8 (II) и 10 (III) минут действия 10 ммоль/л ТЭА; IV – то же после добавления к раствору Рингера, содержащему ТЭА, тетродотоксина в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ ммоль/л

В нашей предыдущей работе [4] показано, что подавление натриевого тока новокаином приводит к уменьшению площади вызванного 4-АП многоспайкового ответа, но длительность СД после этого многоспайкового ответа увеличивается. Это явилось ещё одним подтверждением, что именно преобладание активности медленных калиевых каналов над быстрыми определяет временную динамику изменений СД в присутствии 4-АП. Возник вопрос, какие же изменения длительности СД будут наблюдаться в аналогичных условиях, но уже при действии ТЭА – когда не будет явного преобладания активности медленных каналов над быстрыми. Типичные осциллограммы данной серии экспериментов показаны на рис. 2 и 3. И в том, и в другом случае ТЭА привёл к возникновению многоспайковых ответов. После воздействия новокаина (рис. 2) и тетродотоксина (рис. 3) произошло уменьшение площади вызванного ТЭА многоспайкового ответа, что сопровождалось сокращением

длительности СД. Полученный результат может быть объяснён следующим образом. Если при подавлении быстрого калиевого тока 4-АП продолжительность СД становится тем меньше, чем больше величина медленного калиевого тока (активирующегося тем сильнее, чем более растянут ПД, а значит более деполяризована мембрана), подавление натриевого тока, уменьшающего площадь ПД, а вследствие этого и величину медленного калиевого тока, приводит к увеличению длительности СД. В случае же действия ТЭА преобладание медленного калиевого тока не будет столь существенным (часть медленных каналов заблокирована), а раз так, уменьшение деполяризации мембраны в результате уменьшения площади ПД при подавлении натриевого тока уже не приведёт к заметному уменьшению величины медленного калиевого тока, и увеличения длительности СД не произойдёт. Таким образом, разница в изменениях длительности СД в присутствии 4-АП и ТЭА определя-

ется различным соотношением быстрых и медленных калиевых токов во время реполяризации мембраны.

Ещё одним подтверждением этого стали эксперименты с ритмической стимуляцией нервных волокон при блокировании калиевых каналов. Как можно видеть на рис. 4, следовая деполяризация под действием ТЭА в начальной части ритмической стимуляции слегка возрастает от спайка к спайку. Совершенно иная картина наблюдается при блокировании быстрых калиевых каналов 4-АП [3]: наибольшая следовая деполяризация наблюдается вслед за первым спайком, после чего она начинает уменьшаться, пока не достигнет стационарного уровня (рис. 4). Различия в действии ТЭА и 4-АП на СД в начальной

части ритмической стимуляции определяются разным относительным вкладом быстрых и медленных калиевых каналов в реполяризацию мембраны. В случае 4-АП блокирование быстрого калиевого тока приводит к увеличению общей деполяризации мембраны и активации медленного калиевого тока, который, всё более возрастая во время ритмической стимуляции (увеличения деполяризации мембраны), вызывает ускорение реполяризации мембраны, приводя к уменьшению СД в ритмическом ряду. В случае ТЭА, когда блокированы и быстрые, и медленные калиевые каналы, совершенно естественно не наблюдается столь сильного преобладания одного тока над другим, и поэтому СД в ритмическом ряду не уменьшается.

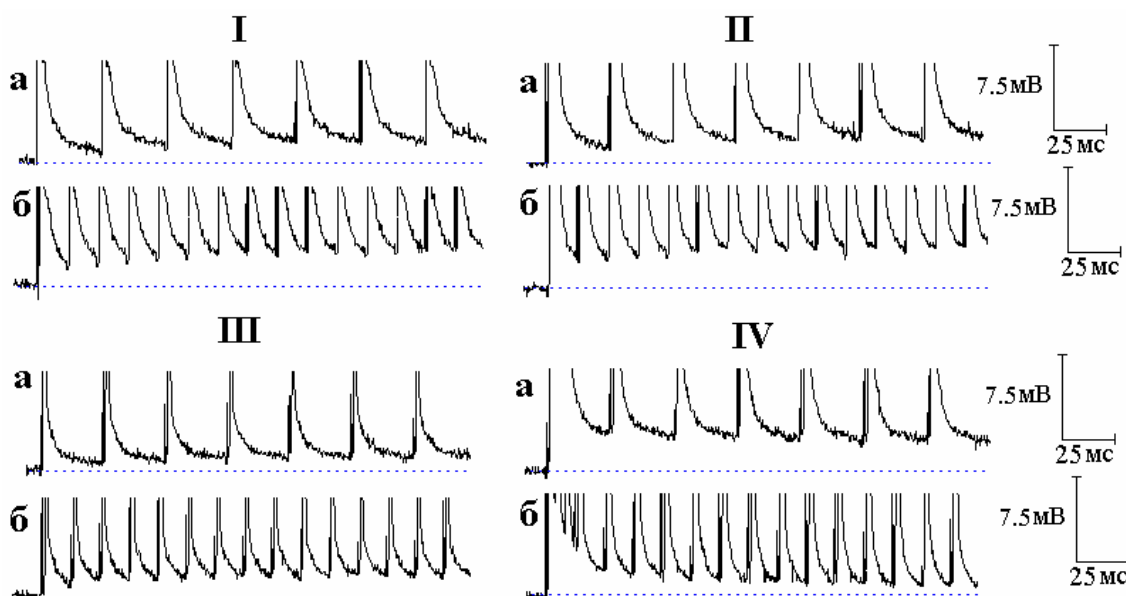


Рис. 4. Влияние тетраэтиламмония (ТЭА) и 4-аминопиридина (4-АП) на следовые потенциалы при ритмическом раздражении нервных волокон (показана начальная часть ритмической стимуляции). I – следовые потенциалы при ритмической стимуляции нервного волокна частотой 50 (а) и 100 Гц (б) в нормальном растворе Рингера. II – то же после 9 минут действия ТЭА. III – следовые потенциалы при ритмической стимуляции нервного волокна частотой 50 (а) и 100 Гц (б) в нормальном растворе Рингера. IV – то же после 12 минут действия 4-АП. Эксперименты с ТЭА и 4-АП проводились на разных волокнах.

Различный временной ход СД во время ритмической стимуляции в присутствии 4-АП и ТЭА ранее был показан на миелинизированных нервных волокнах крысы [7, рис. 11]: 4-АП приводил к снижению СД в ритмическом ряду, а последующее добавление ТЭА к раствору, содержащему 4-АП, вело к противополож-

ному эффекту – увеличению СД от спайка к спайку. Авторы [7] указанную закономерность никаким образом не обсуждали. По всей видимости, обнаруженный данными авторами факт изменения хода увеличенной 4-АП следовой деполяризации под воздействием ТЭА также может быть объяснён тем, что наблюдаемое в присут-

ствии 4-АП уменьшение величины СД в начальной части ритмической стимуляции определяется активированием медленного калиевого тока, который, будучи заблокированным ТЭА, вызывает смену уменьшения СД в ритмическом ряду её увеличением. Важно заметить, что наблюдаемое авторами [7] под действием ТЭА увеличение СД в ритмическом ряду зарегистрировано в присутствии 4-АП, тогда как в наших экспериментах эффекты действия ТЭА и 4-АП изучались по отдельности, и увеличение СД под влиянием ТЭА наблюдалось в отсутствие 4-АП.

Представленные в работе экспериментальные данные дополняют сведения относительно разницы в действии ТЭА и 4-АП, подтверждая информацию о различном вкладе быстрых и медленных калиевых токов в развитие электрических процессов в мембране. Подтверждается информация, что активация медленных калиевых каналов происходит тем сильнее, чем больше была деполяризована мембрана.

ВЫВОДЫ

1. Применение к миелинизированным нервным волокнам амфибий ТЭА в концентрации 10 и 20 ммоль/л вызывает расширение ПД, а также увеличение амплитуды и длительности СД. В 20 % случаев ТЭА приводит к возникновению многоспайковых ответов.

2. Блокирование ТЭА быстрых и медленных калиевых каналов ведёт к однофазному изменению длительности СД – её постоянному росту по мере действия блокатора, что отличается от трёхфазного характера изменения длительности СД под влиянием блокатора быстрых калиевых каналов 4-АП.

3. Подавление натриевого тока блокаторами натриевых каналов приводит к уменьшению площади вызванного ТЭА многоспайкового ответа и уменьшению длительности СД, что противоположно эффекту совместного действия блокаторов натриевых каналов и 4-АП: подавление натриевого тока приводит к уменьшению площади вызванного 4-АП многоспайкового ответа, но длительность СД при этом увеличивается.

4. СД под влиянием ТЭА в начальной части ритмической стимуляции слегка возрастает от спайка к спайку, что отличается от эффекта блокатора быстрых калиевых каналов 4-АП, в присутствии которого СД в начальной части ритмической стимуляции от спайка к спайку уменьшается.

5. Разница в изменениях длительности СД под действием ТЭА и 4-АП определяется различным вкладом быстрых и медленных калиевых токов в реполяризацию мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Беляев В.И. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1964. - № 12. С. 13.
2. Ильин В.И., Катина И.Е., Лонский А.В., Маковский В.С., Полищук Е.В. // Биофизика мембран. - Материалы конференции 21–23 сентября 1973 г. - Каунас, 1973. - С. 286.
3. Кузнецова И.В., Евстигнеев Д.А., Глухова Н.В. // Фізіологічний журнал (Київ). - 2005. - Т. 51. - № 2. С. 96.
4. Кузнецова И.В., Евстигнеев Д.А., Глухова Н.В. // Фізіологічний журнал (Київ). - 2007. - Т. 53. - № 3. С. 61.
5. Кузнецова И.В., Евстигнеев Д.А., Глухова Н.В. // Фундаментальные исследования. - 2007. - № 8. С. 56.
6. Ходоров Б.И., Беляев В.И. // Биофизика клетки. - М., 1965. - С. 159.
7. Baker M., Bostock H., Grafe P., Martius P. // J. Physiol. - 1987. - Vol. 383. P. 45.
8. Burcke W., Katz B., Machne X. // J. Physiol. - 1953. - Vol. 122. P. 588.
9. Chui S.Y., Ritchie J.M. // J. Physiol. - 1982. - Vol. 322. P. 485.
10. Dubois J.M. // J. Physiol. - 1981. - Vol. 318. P. 279.
11. Dubois J.M. // Aminopyridines and similarly acting drugs. - 1982. - New York: Pergamon press. - P. 43.
12. Grissmer S. // J. Physiol. - 1986. - Vol. 381. P. 119.
13. Ilyin V.I., Katina I.E., Lonskii A.V., Makovsky V.S., Polishchuk E.V. // J. Membrane Biol. - 1980. - Vol. 57. P. 179.
14. Koppenhöfer E. // Pflügers Archiv. - 1967. - Vol. 293. P. 34.

15. Poulter M.P., Padjen A.L. // *Neuroscience*. - 1995. - Vol. 68. - № 2. P. 497.
16. Rasband M.N., Trimmer J.S., Schwarz T.L., Levinson S.R., Ellisman M.N., Schachner M., Shrager P. // *J. Neuroscience*. - 1998. - Vol. 18. - № 1. P. 36.
17. Schmidt H., Stämpfli R. // *Pflügers Archiv*. - 1964. - Vol. 279. P. R. 36.
18. Schmidt H., Stämpfli R. // *Pflügers Archiv*. - 1966. - Vol. 287. P. 311.
19. Tasaki I., Hagiwara S. // *J. Gen. Physiol.* - 1957. - Vol. 40. - № 6. P. 859.

AMPHIBIAN MYELINATED NERVE FIBER ELECTROGENESIS ALTERATION AS AFFECTED BY TETRAETHYLAMMONIUM

Kuznetsova I.V., Yevstigneyev D.A., Glukhova N.V., Glukhov V.P.

Ulyanovsk state pedagogical university

** Ulyanovsk higher aviation school of civil aircraft*

*** Ulyanovsk institute of educators' professional skill raising and retraining*

The influence of the tetraethylammonium (TEA), that blocks fast and slow potassium channels, on the electrical activity of myelinated nervous fibres of *Rana ridibunda* Pallas is studied with the help of extracellular recording technique. The duration of the depolarizing after-potential (DAP) is increasing during the whole period of TEA-treatment, that differs from DAP changes in 3 phases under the influence of 4-aminopyridine, that blocks only fast potassium channels. The inhibition of sodium current by sodium channels blockers decreases the area of multi-spike action potential produced by TEA treatment and decreases DAP duration. This action is different from that seen after combined treatment by sodium channels blockers and 4-aminopyridine: the inhibition of sodium current decreases the area of multi-spike action potential produced by 4-aminopyridine but increases the duration of DAP. Repetitive stimulation shows that DAP increases from spike to spike at the beginning of stimulation, this effect is also differ from the effect of fast channels blocker, 4-aminopyridine, which decreases DAP at the beginning of the repetitive stimulation. All these differences in the effects of TEA and 4-aminopyridine are the result of different contribution of fast and slow potassium channels in membrane repolarization.