

Б. А. ГЕР

## К МЕХАНИЗМАМ ПОСТСИНАПТИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОГЕНЕЗА

(Представлено академиком Е. М. Крепом 5 V 1974)

В настоящей работе рассмотрено значение точечной (дискретной) активации постсинаптической мембраны (п.с.м.) отдельным квантом ацетилхолина (АХ) <sup>(1)</sup> для процесса возникновения постсинаптического тока (п.с.т.) в целом на примере синапса быстрого фазного волокна портняжной мышцы лягушки.

1. Площадь участка п.с.м., которая еще может химически возбуждаться единичным квантом АХ, оценивается следующим образом. Спад миниатюрного постсинаптического тока (м.п.с.т.) по экспоненте <sup>(2)</sup>, показывает, что рост числа возбужденных холинорецепторов (ХР) после впрыскивания АХ ограничен во времени продолжительностью восходящего фронта м.п.с.т. Следовательно, минимальный радиус кругового участка химически возбуждаемой п.с.м. не может превышать среднего расстояния ( $l$ ), на которое смещаются молекулы АХ за время наименьшей продолжительности восходящего фронта п.с.т. ( $\tau$ ), полученной в эксперименте (120 мксек <sup>(2)</sup>, рис. 2):  $l = (D\tau)^{1/2} = (7,6 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{сек}^{-1} \cdot 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ сек.})^{1/2} \approx 3 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ , где  $D$  — коэффициент диффузии АХ. Если концентрация медиатора на периферии этой области еще сохраняет свою физиологическую активность, то площадь зоны химического возбуждения (з.х.в.) п.с.м. составит  $l^2 = 2,8 \cdot 10^7 \text{ \AA}^2$  (случай впрыскивания АХ в горловину складки здесь не рассмотрен). Легко показать, что оценка остается справедливой и при наличии временной задержки между моментом присоединения молекулы медиатора к ХР и возникновением ионного тока.

2. Максимальное число ХР, находящихся в з.х.в. и, следовательно, доступных медиатору единичного кванта, можно оценить следующим образом. Мономер ХР с мол. вес. 88 000 займет минимум поверхности п.с.м. в том случае, если его молекулу представить в виде цилиндра высотой 100  $\text{\AA}$  и радиусом основания 18,5  $\text{\AA}$ , встроеного в мембрану перпендикулярно ее плоскости. Тогда при плотной упаковке в з.х.в. могло бы разместиться около  $8,2 \cdot 10^4$  ХР. С учетом площади, занимаемой мономером холинэстеразы (ХЭ) (мол. вес. 60 000 — шар с радиусом около 37  $\text{\AA}$ , тетрамер энзима и тетрамер ХР без ионофоров займут площадь около  $3 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$ . При плотной упаковке в з.х.в. могло бы находиться около  $3,5 \cdot 10^3$  таких макромолекулярных комплексов, а на всей поверхности п.с.м. ( $8 \cdot 10^{11} \text{ \AA}^2$  — собственный расчет)  $1 \cdot 10^8$  ХР (см. <sup>(3)</sup>, стр. 603).

3. Число активированных ХР на пике м.п.с.т. легко оценить, если известно количество проходящих через одну «пору» ионов в единицу времени ( $5 \cdot 10^4 \text{ мсек}^{-1}$  <sup>(4)</sup>). Ток в 4,5 на продолжительность 100 мксек. (<sup>(2)</sup>, рис. 2) соответствует чистому входящему потоку  $2,8 \cdot 10^6 \text{ Na}^+$ . Значит, общий вход натрия с учетом той его части, которая компенсирует выход калия, составит  $5 \cdot 10^6$  ионов. Отсюда, общее количество возбужденных на пике м.п.с.т. ХР  $5 \cdot 10^6 / 5 \cdot 10^3 = 1 \cdot 10^3$ , что ниже не только теоретического предела для з.х.в. (см. <sup>(2)</sup>), но и фактически найденных значений для всего синапса <sup>(4)</sup>, ср. с п. 2). Таким образом, возникновение полноценного м.п.с.т. на точечном участке химически активированной п.с.м. как будто бы не исключено.

4. Плотность тока в ионной «поре», которую для наглядности можно привести к привычной единице площади ( $\text{см}^2$ ), составит слишком большую

величину. Если площадь «поры» ( $S$ ) с радиусом ( $r$ )  $2 \text{ \AA}$  равна  $S = \pi r^2 = 12,6 \text{ \AA}^2$ , то суммарный заряд, прошедший через  $1 \text{ см}^2$  этого проводника второго рода в 1 сек. составит  $(1 \cdot 10^8 \text{ \AA})^2 \cdot 5 \cdot 10^7 / 12,6 \text{ \AA}^2 = 4 \cdot 10^{22}$  ионов или  $4 \cdot 10^{22} / 6,24 \cdot 10^{18} = 6,4 \cdot 10^3 \text{ а/см}^2$ . Условность этого расчета очевидна, однако результат дает основание поставить вопрос о физическом пределе проницаемости единичной «поры» для ионов.

5. Общая длина «цепочки», состоящей из  $5 \cdot 10^3$  ионов  $\text{Na}^+$ , больше, чем среднее расстояние диффузии  $\text{Na}$  за то время, в течение которого длится пик м.п.с.т. Если диаметр гидратированного иона  $\text{Na}^+$  принять равным  $5 \text{ \AA}$ , общая протяженность «цепочки» из  $5 \cdot 10^3$  ионов составит  $2,5 \cdot 10^4 \text{ \AA}$ , а ее среднее смещение ( $l$ ) через «пору» за время ( $\tau$ ) 100 мксек при коэффициенте диффузии ( $D$ )  $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$  будет ограничено  $l = \sqrt{D\tau} = \sqrt{15 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2} \approx 4 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ . Следовательно, диффузионный предел проницаемости ионного канала (дырки в мембране, заполненной водой) ограничен  $8 \cdot 10^3$  ионами натрия в  $1 \text{ мсек}^{-1}$ . Интересно, что количество поставляемых в устье «поры» броуновским движением ионов согласно формуле  $Z = nS\sqrt{kT/2\pi m}$  (<sup>5</sup>), справедливой для идеального газа, составит  $4,2 \cdot 10^5 \text{ мсек}^{-1}$  (при  $137 \text{ mM NaCl}$ ).

6. Уменьшать физический предел проницаемости ионного канала могут другие причины: а) прохождение иона через «пору» с отрицательным ускорением, что не противоречит факту начальной положительной теплопродукции во время нервного импульса ((<sup>6</sup>) стр. 86—87); б) участие в переходе ионов через мембрану специализированных макромолекул-переносчиков; в) более низкое значение коэффициента диффузии ионов в веществе, заполняющем полость синапса; г) открытие «поры» только при одно-временном соударении с ней сразу трех ионов натрия (<sup>7</sup>). Например, при максимальной скорости конформационных переходов переносчика, работающего по принципу «коромысла», равной  $10 \text{ мсек}^{-1}$  (<sup>8</sup>), число перенесенных в одном направлении ионов не может превысить  $5 \text{ мсек}^{-1}$  (ср. с (<sup>9</sup>), см. (<sup>4</sup>), стр. 695).

7. Общий фонд ионов натрия, часть которого тратится на заряд, переносимый во время пика м.п.с.т., заключен в объеме ( $v$ ) синапса (без учета емкости вторичных складок) равном  $v = \pi(r+R)^2 h = 3,14(4 \cdot 10^3 \text{ \AA} + 3 \cdot 10^3 \text{ \AA})^2 \cdot 5 \cdot 10^2 \text{ \AA} = 7,7 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^3$ , где  $r$  — среднее расстояние диффузии  $\text{Na}^+$  за 100 мксек,  $R$  — радиус з.х.в.,  $h$  — ширина синаптической щели. При  $175 \text{ mM NaCl}$  в наружном растворе ((<sup>2</sup>), методика) объем  $v$  содержит  $7,7 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^3 \cdot 1,05 \cdot 10^{23} / 4 \cdot 10^{27} \text{ \AA}^3 = 8 \cdot 10^6$  ионов, в то время как на пике м.п.с.т. общий поток  $\text{Na}^+$  составляет  $5 \cdot 10^9$  ионов (см. п. 3). Это значит, что уже при  $100 \text{ mM NaCl}$  в растворе Рингера на пике м.п.с.т. ( $4,5 \text{ на}$ ,  $100 \text{ мксек}$ ) общий входящий поток натрия превысил бы еще доступный его запас для з.х.в. Далее, во время п.с.т. чистый входящий поток  $\text{Na}^+$  достигает  $1,82 \cdot 10^{10}$  ((<sup>10</sup>), рис. 11),  $6,2 \cdot 10^{11}$  ((<sup>11</sup>), стр. 153), что с учетом компенсации выходящего  $\text{K}^+$  составит от  $3,3 \cdot 10^{10}$  до  $1,1 \cdot 10^{12}$  ионов, в то время как при  $115 \text{ mM NaCl}$  снаружи общий запас  $\text{Na}^+$  в объеме синапса ( $2,83 \cdot 10^{14} \text{ \AA}^3$ ) примерно равен  $2 \cdot 10^{10}$  ионов. Таким образом, наличие ультраонкого межклеточника позволяет пренебречь реальными проницаемостями мембран при отыскании физического предела плотностей импульсных локальных токов, поскольку этот предел, помимо прочего, ограничен и количеством ионов в парном растворе.

8. Критические противоречия между квантовой гипотезой и теорией химической передачи становятся очевидными и могут быть сформулированы теперь отчетливо. Во-первых, считается, что усиление нервного сигнала в синапсе обусловлено химическим возбуждением большей части площади п.с.м. медиатором. Теоретический анализ обнаруживает, однако, что в условиях ультралокального выпрыскивания АХ этому основному требованию химической теории противоречат: а) второй закон термодинамики (<sup>1</sup>); б) малые времена релаксации физико-биохимической системы синапса как

целого; в) низкая плотность выброса квант (<sup>12</sup>); г) наличие ХЭ на п.с.м. (<sup>13</sup>). Поскольку каждая из этих причин должна сужать з.х.в., медиатор способен активировать во время нервного импульса малую долю площади п.с.м. (вероятно, не более 1—6%). Во-вторых, возникновение фактически регистрируемого п.с.т. только в пределах этой площади становится теоретически невероятным (п. 1—7), даже при наличии у п.с.м. «шунтирующих» свойств (<sup>14</sup>). Иначе, если медиатор выделяется квантами, п.с.т. не может возникать только в пределах з.х.в.

9. Следовательно, должен существовать механизм, с помощью которого точечная активация, первично возникающая в з.х.в., распространяется на соседние участки мембраны мышечного волокна со скоростью большей, чем диффузионный перенос молекул АХ. Известно, что: а) мышечная мембрана синаптической области неоднородна (<sup>15</sup>, <sup>16</sup>); б) между плотностью внесинаптических ХР и величиной АХ — потенциала отсутствует линейная зависимость ((<sup>25</sup>), рис. 2); в) кривая восходящего фронта м.п.с.т. иногда состоит из двух участков, имеющих разную крутизну ((<sup>2</sup>), рис. 2). Совокупность этих фактов дает основание полагать, что существо механизма, с помощью которого процесс активации п.с.м. выходит за пределы з.х.в., состоит в возникновении распространяющихся по хемочувствительной мембране кооперативных изменений, захватывающих значительную часть площади, на которой располагаются внесинаптические ХР. Другими словами, анализ последствий ультралокальности впрыскивания АХ (<sup>1</sup>), (п. 1—8) и экспериментальные факты заставляют постулировать двойственную природу п.с.т.

10. Максимальное число ХР, которое могло бы быть возбуждено во время п.с.т., можно оценить, предположив, что с помощью кооперативного процесса активируется весь цилиндрический участок хемочувствительной мембраны, расположенный в синаптической области волокна длиной 1,5 мм (<sup>18</sup>, <sup>19</sup>) и общей площадью  $6,6 \cdot 10^{13} \text{ \AA}^2$ . Число внесинаптических ХР этой зоны достигнет  $9 \cdot 10^8$  (если усредненная их плотность в 10 раз меньше, чем синаптических), а общее количество ХР составит  $1 \cdot 10^9$  (см. п. 2 (<sup>3</sup>)). Тогда минимальная проницаемость единичной «поры» (расчет на всю длительность п.с.т.) будет находиться в пределах 300—8 ионов  $\text{Na}^+$  мсек<sup>-1</sup> (см. п. 7, ср. с (<sup>9</sup>)). Если кооперативный процесс захватывает в 10 раз меньшую площадь (для этого достаточно, чтобы из з.х.в. возбуждение распространилось со скоростью 33 см/сек за пределы собственно п.с.м. на 33 мкм по всему длиннику концевых веточек), количество ионов  $\text{Na}^+$ , имеющих в межклеточнике все-таки будет гораздо больше, чем необходимо для п.с.т. (см. п. 7). В этом случае максимальная проницаемость «поры» составит  $1/_{16} - 1/_{625}$  от рассчитанной на основании эксперимента (<sup>9</sup>).

Таким образом, в рамках химической теории квантованно секреторный медиатор может быть эффективным только при условии сопряженности химического механизма активации п.с.м. с обусловленным им процессом нехимического распространяющегося возбуждения. Двойственный характер постсинаптического электрогенеза предполагает, что в возникновении п.с.т. (м.п.с.т.) существенную роль играет внесинаптическая хемочувствительная зона, которая анатомически и функционально занимает промежуточное положение между синаптической и электрогенной мембранами и может иметь некоторое сходство с мембраной гигантских нейронов моллюсков. Предельно высокое значение проницаемости единичной «поры» (<sup>4</sup>), большая чувствительность (а, возможно, и «протяженность» (<sup>18</sup>)) холиноцептивной зоны фазного волокна в сравнении с тоническим (<sup>19</sup>, <sup>20</sup>), по-видимому, объясняются способностью ХР этой мембраны к кооперативным ответам.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. А. Гер, И. Янку и др., ДАН, т. 213, 1221 (1973). <sup>2</sup> P. W. Gage, R. N. McBurney, J. Physiol., v. 226, 79 (1972). <sup>3</sup> R. Miledi, L. T. Potter, Nature, v. 233, 599 (1971). <sup>4</sup> B. Katz, R. Miledi, J. Physiol., v. 230, 707 (1973). <sup>5</sup> E. A. Moelwyn-Hughes, The Kinetics of Reactions in Solutions, Oxford, 1947. <sup>6</sup> А. Ходжкин, Нервный импульс, М., 1965. <sup>7</sup> A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol., v. 117, 500 (1952). <sup>8</sup> G. G. Hammes, J. Simplificio, Biochim. et biophys. acta, v. 212, 428 (1970). <sup>9</sup> M. Kasai, J.-P. Changeux, J. Membr. Biol., v. 6, 58 (1971). <sup>10</sup> A. Takeuchi, N. Takeuchi, J. Neurophysiol., v. 22, 395 (1960). <sup>11</sup> Б. Кару, Нерв, мышца и синапс, М., 1968. <sup>12</sup> J. C. Eccles, J. C. Jaeger, Proc. Roy. Soc. B, v. 148, 38 (1958). <sup>13</sup> Б. А. Гер, П. П. Филатов, ДАН, т. 213, 486 (1973). <sup>14</sup> P. Fatt, B. Katz, J. Physiol., v. 115, 320 (1951). <sup>15</sup> A. Feltz, A. Mallart, J. Physiol., v. 218, 85 (1971). <sup>16</sup> R. Beranek, F. Vyskočil, J. Physiol., v. 195, 493 (1968). <sup>17</sup> H. C. Hartzell, D. M. Fambrough, J. Gen. Physiol., v. 60, 248 (1972). <sup>18</sup> R. Miledi, In: Ciba Foundation Symposium of Enzymes and Drug Action, London, 1962, p. 220. <sup>19</sup> Г. А. Наследов, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., т. 5, 398 (1969). <sup>20</sup> A. Kiessling, Pflugers Arch., v. 280, 189 (1964).