

В. Л. ДУНИН-БАРКОВСКИЙ, Л. М. ЧАЙЛАХЯН,
Л. И. ЧУДАКОВ

**О ВЛИЯНИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА
НА АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЙ ШУМ КОНЦЕВОЙ ПЛАСТИНКИ**

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 5 IX 1973)

Количественный анализ характеристик шума, связанного с действием ацетилхолина (АХ) на холинорецепторы (х.р.) концевой пластиинки (к.п.) скелетной мышцы лягушки⁽¹⁾ позволил оценить эффективность одиночной реакции АХ с х.р. и исследовать время жизни активированного комплекса х.р. в разных условиях. Для объяснения факта К-чувствительности синаптической реакции (потенциал реверсии синаптических потенциалов к.п. сдвигается на 20–30 мв при выводе К из наружного раствора) ранее было выдвинуто предположение о раздельности Na- и K-каналов к.п.⁽²⁾. На основании гипотетической оценки расстояний между Na- и K-каналами⁽²⁾ и данных о плотности х.р. в концевой пластиинке было высказано предположение⁽³⁾, что активация одной молекулы х.р. должна вызывать изменение проницаемости мембраны лишь для ионов одного типа — либо Na, либо K (в дальнейшем эту возможность мы будем называть гипотезой Р). Альтернатива состоит в том, что работа каждого х.р. стимулирует изменение проницаемости для обоих ионов (гипотеза С).

Основываясь на простейших соображениях о характере шумовых процессов в данном случае (каждая молекула изменяет проводимость соответствующего канала на некоторое конечное время, моменты начала действия отдельных молекул АХ независимы и случайны), нетрудно теоретически рассчитать зависимость мощности шума от мембранныго потенциала (м.п.) для гипотез Р и С. Оказывается, что в том случае, когда потенциал на мембране равен потенциалу реверсии АХ-реакции, шум по гипотезе С должен исчезать, а по гипотезе Р — падать не более чем в два раза по мощности (в $\sqrt{2}$ раз по амплитуде). Дело в том, что по гипотезе С потенциал реверсии суммарной АХ реакции равен потенциалу реверсии элементарных реакций. По гипотезе Р при потенциале реверсии суммарной реакции реакция на АХ нулевая за счет статистического равновесия между вкладами в реакцию Na- и K-каналов, имеющих существенно разные потенциалы реверсии. Эти теоретические оценки определили экспериментальную задачу. Настоящее сообщение носит предварительный характер. Мы ограничились лишь качественной оценкой результатов опытов и анализом условий, в которых можно было бы получить полезную количественную информацию.

Опыты ставились на портняжной мышце зимних (январь) лягушек *R. temporaria*. Малый уровень собственных шумов усилителя обеспечивался применением на входном каскаде полевого транзистора с малым собственным шумом (японский 3SK23) в режиме истокового повторителя. Собственный шум установки при сопротивлении внутриклеточного электрода 8–10 Мом (стеклянные микропипетки, заполненные 2,5 M KCl) обычно не превышал 50 мв при полосе 1 кгц. АХ-реакция вызывалась электрофоретической микроаппликацией АХ через микропипетку, подведенную к к.п. Для изменения м.п. использовались два приема: а) поляризация мышечного волокна через второй (токовый) внутриклеточный электрод; б) нормальный раствор Рингера для лягушек заменялся на раствор, где ионы Cl⁻ заменились ионами SO₄²⁻. pH растворов 7,2; температура 18–20°.

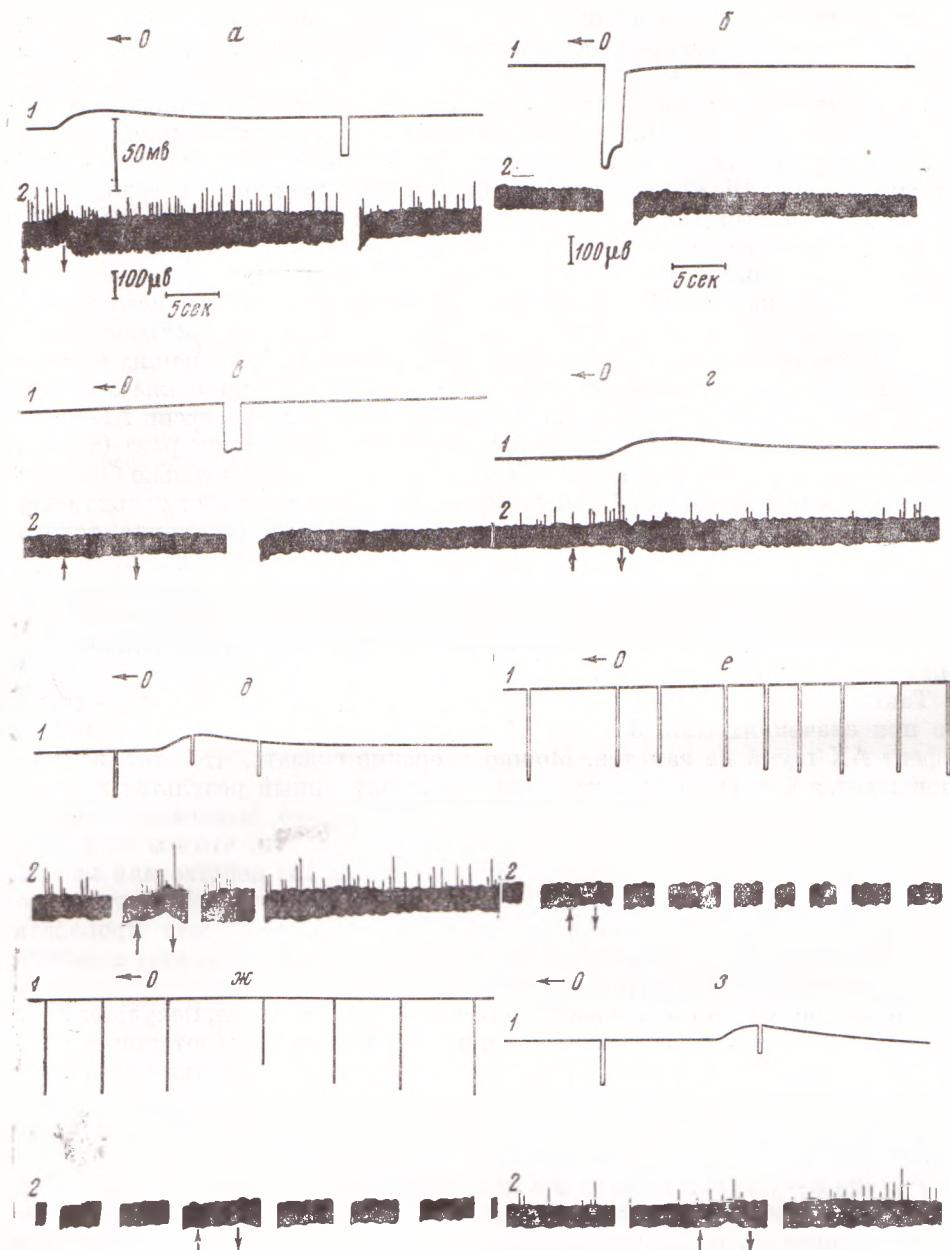


Рис. 1. Осциллограммы ацетилхолинового шума и мембранных потенциалов мышечных волокон. 1 — с усилителя постоянного тока (калибровка 50 мв), 2 — с усилителем переменного тока (калибровка 100 мв). Вертикальными стрелками под 2 показаны моменты включения и выключения тока через микропипетку с АХ. а — г, б — з — два разных волокна. а, г, б, з — в нормальном растворе Рингера; б, в, е, ж — в растворе без ионов Cl. Горизонтальная стрелка с цифрой 0 отвечает нулевому потенциалу. Полоса пропускания усилителя сверху 1 кгц, снизу (для переменного тока) 10 гц, отметка времени 5 сек.

На рис. 1 представлены осциллограммы опытов. На верхнем луче видна деполяризация под действием АХ (рис. 1 α , γ , δ , τ). На том же луче видны изменения мембранных потенциала волокна при пропускании через второй внутристекловодный электрод гиперполяризующих прямоугольных толчков тока ($\sim 1-2 \cdot 10^{-7}$ а). На нижнем луче толщина нулевой линии пока-

зывает амплитуду шума (записи ретушированы по огибающей шума на глаз), тонкие вертикальные штрихи над нулевой линией — миниатюрные потенциалы.

В нормальном растворе Рингера на концевую пластинку апплицируется ацетилхолин (рис. 1а). Видно, как параллельно с деполяризацией возрастают амплитуда шума и уменьшаются миниатюрные потенциалы. Осциллограммы (рис. 1б, в) получены в бесхлорном растворе. В работе (⁴) было показано, что м.п. мышечных волокон в этих условиях на некоторое время падает до 20 мв, т. е. близок к потенциальному реверсии АХ-реакции. Существенно, что в этой форме опыта деполяризация достигается без пропускания тока (она ведь и сама по себе может иногда быть источником шума); кроме того, входное сопротивление волокна в этом растворе выше, чем сопротивление в нормальном растворе Рингера (^{4, 5}). В наших опытах (рис. 1б, в) м.п. уменьшился до 18 мв. Миниатюрные потенциалы исчезли, что свидетельствует о том, что м.п. близок к потенциальному реверсии АХ-реакции. Входное сопротивление волокна выросло более чем в два раза (толчок тока на рис. 1б той же силы, что на рис. 1а, вызывает значительно большее изменение м.п.). Подача АХ на этом фоне (рис. 1в) вызывает только одну реакцию: уменьшение входного сопротивления волокна (величина толчка уменьшается при действии АХ). Не видно ни деполяризации, ни возрастания шума. Возвращение в нормальный раствор Рингера восстанавливает и реакцию на АХ (деполяризация, шум), и миниатюрные потенциалы (рис. 1г). Аналогичные изменения видны в серии опытов, представленной осциллограммами (рис. 1д, з).

Таким образом, визуальная оценка толщины нулевой линии показывает, что при значениях м.п., близких к потенциальному равновесию АХ-реакции, эффект АХ шума не заметен. Можно уверенно сказать, что этот эффект уменьшается больше, чем в два раза, т. е. полученный результат говорит в пользу гипотезы С (см. выше). Существует, однако, возражение против однозначной интерпретации наших опытов. Дело в том, что мы не проверяли наличие К-чувствительности. В то же время мы действовали на к.п. большими концентрациями АХ в течение десятков секунд. При этом (не аналогично с тем, что показано в других работах (^{6, 7})) может пропадать К-чувствительность (в рамках наших представлений (²) — за счет сильного сдвига концентраций К и Na в примембранных слоях).

Данные по К-чувствительности, описанные в литературе, получены либо при активации к.п. естественными порциями медиатора (потенциал к.п.) при частичной блокаде х.р. курабе (⁸) (в этом случае велика концентрация АХ в примембранным слое, но мала плотность активных х.р.), либо при микроаппликации (⁹) очень небольших по длительности (100 мсек.) и эффекту (<10 мв) доз АХ и холиномиметиков. Таким образом, не исключено отсутствие К-чувствительности и в наших условиях. Расчет, основанный на учете неперемещаемого примембранных слоя, показывает, что такие изменения примембранных концентраций К и Na, которые приводят к потере К-чувствительности, могут вызывать уменьшение электродвижущих сил К- и Na-каналов примерно в 1,5 раза. Таким образом, общая амплитуда шума в условиях потенциала реверсии в случае справедливости гипотезы Р и при отсутствии К-чувствительности должна упасть примерно в два раза ($\sqrt{2}$ раз — за счет изменения м.п. (см. выше) и в 1,5 раза за счет изменений концентрации ионов в примембранных слоях). В наших условиях исходный (не вызванный АХ) шум таков, что под действием АХ наблюдается увеличение толщины нулевой линии не более чем в 1,5 раза. В этом случае можно показать, что при уменьшении амплитуды шума в 2 раза, наблюдаемый эффект шума (изменение при действии АХ толщины нулевой линии) должен уменьшаться в 4 раза. Точность наших измерений позволяет уверенно сказать, что эффект шума при поляризации уменьшился более чем вдвое, но не позволяет судить о том, упал ли эффект шума до нуля (что отвечало бы гипотезе С) или уменьшился в 4 раза. Таким образом, для окончатель-

ного решения вопроса о справедливости Р- или С-гипотезы в отношении к.п.
необходимы дополнительные эксперименты.

Авторы выражают искреннюю признательность Н. Е. Бабской,
Н. М. Жуковской, С. А. Ковалеву, М. А. Посконовой, Т. В. Потаповой и
И. Ф. Прудниковой за помощь и обсуждение.

Институт проблем передачи информации
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Katz, R. Miledi, J. Physiol., **224**, 665 (1972). ² С. А. Ковалев, Л. М. Чайлахян, В. Л. Дунин-Барковский, ДАН, **201**, 972 (1971). ³ В. Л. Дунин-Барковский, В кн. Структура и функция холинорецептора, Пущино, 1973.
⁴ B. Nakajima et al., J. Gen. Physiol., **46**, 97 (1962). ⁵ O. F. Hutter, D. Noble, J. Physiol., **151**, 89 (1960). ⁶ В. Л. Дунин-Барковский, С. А. Ковалев и др., Биофизика, **14**, 485 (1969). ⁷ P. D. Bregestovsky, L. M. Chailakhian et al., Nature, **238**, 934 (1972). ⁸ A. Takeuchi, N. Takeuchi, J. Physiol., **154**, 52 (1960). ⁹ N. Takeuchi, J. Physiol., **167**, 128 (1963).