

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 пластинки (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 К-каналов к.п. (²). На основании гипотетической оценки расстояний между Na- и К-каналами (³) и данных о плотности х.р. в концевой пластинке было высказано предположение (³), что активация одной молекулы х.р. должна вызывать изменение проницаемости мембраны лишь для ионов одного типа — либо Na, либо К (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 мембранного 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 К-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 М 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 заменялись ионами SO₄. pH растворов 7,2; температура 18—20°.

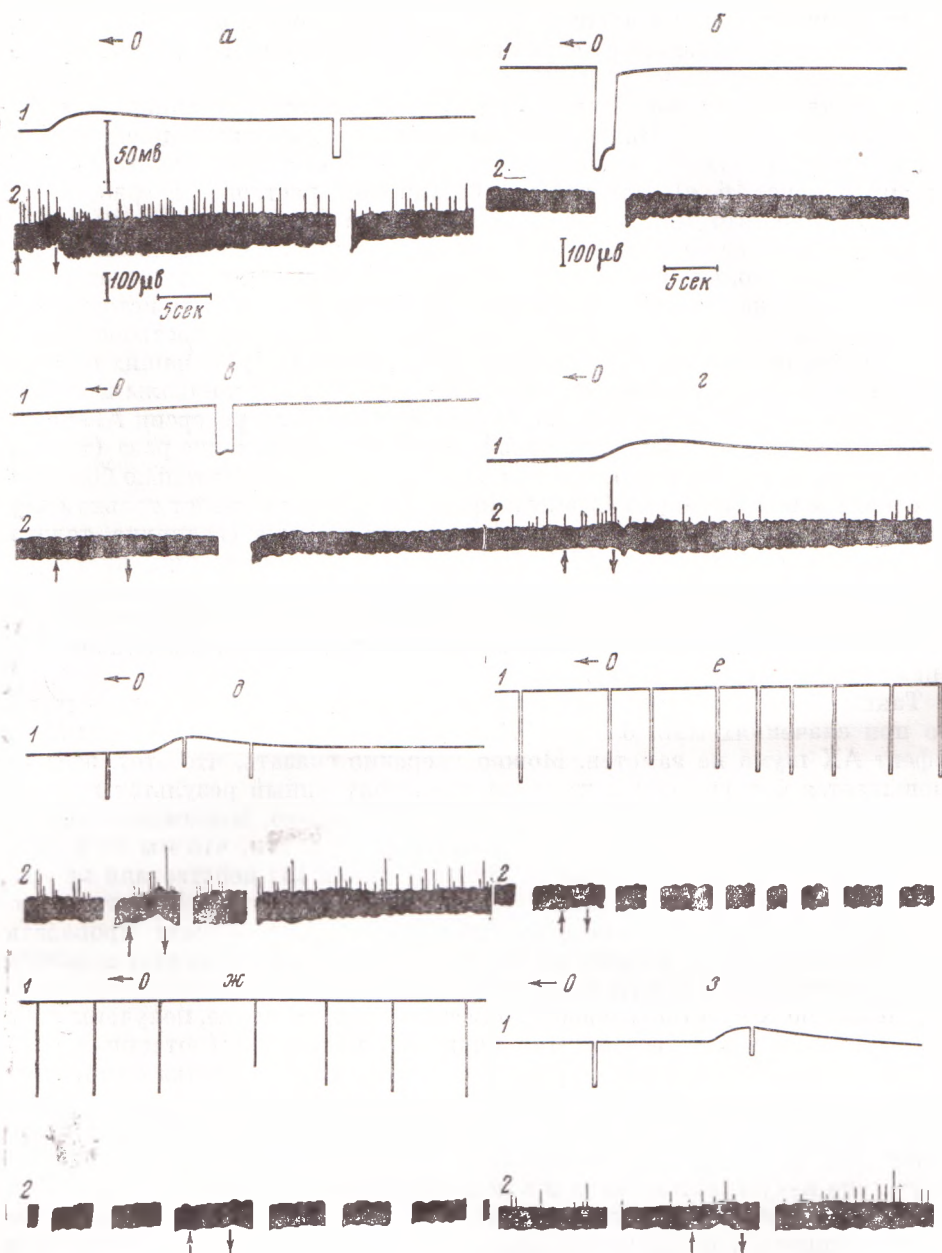


Рис. 1. Осциллограммы ацетилхолинового шума и мембранного потенциала мышечных волокон. 1 — с усилителя постоянного тока (калибровка 50 мв), 2 — с усилителя переменного тока (калибровка 100 мв). Вертикальными стрелками под 2 показаны моменты включения и выключения тока через микропипетку с АХ. а — г, б — з — два разных волокна. а, г, д, 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. 1а, г, б, з). На том же луче видны изменения мембранного потенциала волокна при пропускании через второй внутриклеточный 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 возрастает 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 потенциалу реверсии АХ-реакции. Существенно, что в этой форме опыта деполяризация достигается без пропуска 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 потенциалу 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 потенциалу равновесия 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 (по аналогии 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. кураре ⁽⁸⁾ (в этом случае велика концентрация АХ в примембранном 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 неперемешиваемого примембранного 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. Поскоповой, 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 В. 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, Пушкино, 1973. ⁴ В. 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).