

А. В. ЛОНСКИЙ, В. И. ИЛЬИН, И. Е. КАТИНА, З. И. КРУТЕЦКАЯ
**ТОКИ, СВЯЗАННЫЕ С АКТИВАЦИЕЙ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ
МЕМБРАНЫ ПЕРЕХВАТА РАНЬЕ**

(Представлено академиком П. Г. Костюком 3 II 1975)

По современным представлениям изменение ионной проницаемости мембран при возбуждении является результатом конформационных перестроек заряженных структур ионных каналов в ответ на сдвиг мембранного потенциала.

С помощью современных методик фиксации потенциала и выделения сигнала из шума зарегистрирован (¹⁻³) на гигантском аксоне кальмара ток, связанный, по мнению авторов, с конформационными перестройками, обеспечивающими открывание и закрывание натриевых каналов. Этот ток предшествует току натрия, примерно в 100 раз меньше его по величине и имеет длительность несколько сот микросекунд. Авторы назвали этот ток воротным.

Подтверждение этого открытия для других объектов имеет принципиальную важность. В связи с этим нами было проведено исследование по обнаружению и изучению свойств воротного тока на миелинизированном волокне лягушки.

Эксперименты проводились на одиночных миелинизированных волокнах седалищного нерва лягушки *Rana ridibunda* (диаметр 13–16 мкм). В экспериментальной камере исследуемый перехват Ранье, помещенный в прорезь перфузионной трубочки, омывался раствором Рингера (118 мМ, рН 7,5), интернодиумы перерезались на расстоянии 600–700 мкм от центрального перехвата, а концы их находились в каплях изотонического раствора КСl. Температура перфузионного раствора 16–18°.

Фиксация потенциала на мембране осуществлялась с помощью установки, описанной нами ранее (⁴), которая позволяет регистрировать протекающие через мембрану токи в ответ на скачок напряжения с временем установления 7–10 мсек.

Методика регистрации воротных токов принципиально сходна с описанной в (^{2, 3}). На мембрану с периодом 100 мсек подавались поочередно деполяризующие и гиперполяризующие импульсы строго одинаковой величины и длительности. При подавленных токах натрия и калия получаемые на такие импульсы ответы почти симметричны, но при многократном их суммировании обнаруживается асимметричная составляющая — воротный ток. Для выделения воротного тока напряжение, пропорциональное протекающему через мембрану току, подавалось на устройство, позволяющее устранить емкостной ток и компенсировать ток утечки, затем оно преобразовывалось в цифровую форму при помощи аналог-код преобразователя и обрабатывалось анализатором «Нейрон-1» в режиме выделения сигнала из шумов. Результат усреднения ответов на равные количества импульсов разной полярности выводился на индикатор и регистрировался фотокамерой (см. примеры регистраций на рис. 2).

Для регистрации воротного тока необходимо устранить ионные токи натрия и калия, величина которых известно много больше величины воротного тока. Калиевый ток подавлялся введением в перфузионный раствор тетраэтиламмония в концентрации 15 мМ, при этом есть полная уверенность, что натриевая система не затрагивается.

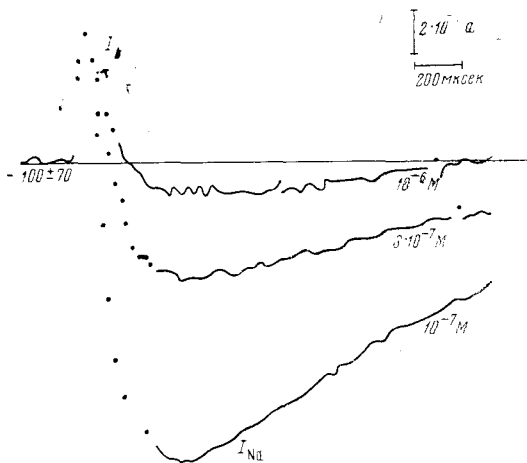


Рис. 1

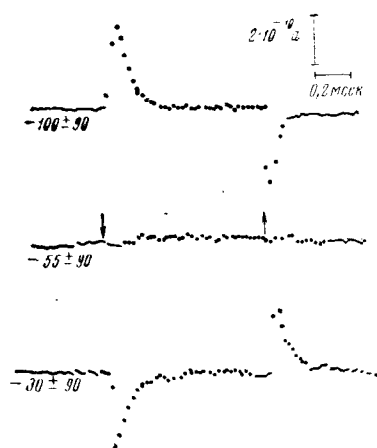


Рис. 2

Рис. 1. Регистрации воротного тока (I_b) и тока натрия (I_{Na}) при различных концентрациях ТТХ в наружной среде. Исходный потенциал -100 мв, прямоугольные импульсы ± 70 мв. Усреднены ответы на 50 положительных и 50 отрицательных импульсов

Рис. 2. Регистрации воротных токов на передний и задний фронт прямоугольных импульсов ± 90 мв от различных исходных потенциалов (значения исходного потенциала указаны на рисунке для каждой регистрации). Усреднение по 100 импульсам

Предыдущие исследователи (^{2, 3}) показали, что специфический ингибитор натриевого тока — тетрадотоксин (ТТХ) — не оказывает влияния на воротные токи в аксоне кальмара. В связи с этим нами была проведена проверка этого факта применительно к нашему объекту.

На рис. 1 приведены регистрации усредненных токов при различных концентрациях ТТХ в наружной среде. Входящему натриевому току (I_{Na}) с характерной кинетикой предшествует короткий выходящий ток, амплитуда и длительность которого сопоставимы с таковыми для воротного тока аксона кальмара (^{2, 3}). При концентрации ТТХ 10^{-7} М I_{Na} уменьшается в 25 раз по сравнению с нормой. При увеличении концентрации ТТХ до 10^{-6} М I_{Na} уменьшается еще в 10 раз, амплитуда воротного тока (I_b) при этом остается неизменной. Приведенные данные позволяют утверждать, что и для мембраны перехвата Ранье воротный ток нечувствителен к ТТХ. Это позволило нам использовать ТТХ в концентрации 10^{-6} М для практически полного устранения I_{Na} во всех последующих экспериментах.

Максимальная амплитуда воротного тока несколько варьировала от волокна к волокну, но всегда была примерно в 50 раз меньше максимального I_{Na} .

Так же, как и для аксона кальмара, воротные токи возникают в мембране перехвата Ранье и на включение, и на выключение прямоугольного импульса (рис. 2), при этом токи близки по величине, но противоположны по направлению.

Величина и кинетика воротных токов существенно зависит от исходного потенциала на мембране. Этот факт наглядно демонстрируется на рис. 2, где приведены регистрации усредненных воротных токов, полученных при бросках потенциала ± 90 мв от различных исходных потенциалов (-100 мв, -55 мв, -30 мв).

При исходном потенциале -100 мв воротный ток на включение выходящий, а на выключение — входящий. Так как при этом потенциале существенно большая часть натриевых каналов находится в закрытом состоянии (⁵), то выходящее направление воротного тока следует связать с перестройками, сопровождающими их открывание, а входящее — с закрытием. Это предположение согласуется с обратной полярностью воротных

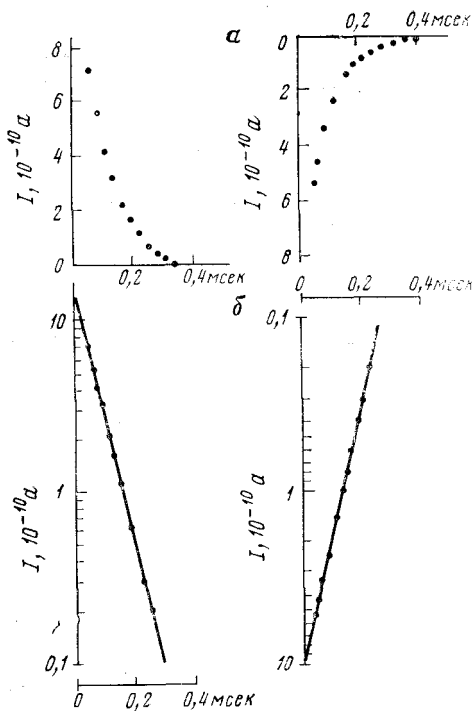


Рис. 3. Воротные токи при потенциалах -130 ± 105 мв в линейном (а) и полулогарифмическом масштабах (б)

прямую, которая дает величину постоянной времени воротного тока $\tau = 100$ мксек при данных условиях.

Изложенные результаты убедительно показывают, что зарегистрированный ток идентичен воротному току мембраны аксона гальмара (^{1, 2}). Некоторые количественные отличия касаются амплитуды I_g (по отношению к I_{Na}) и постоянной времени τ . При сходных условиях стимуляции относительная амплитуда воротного тока для перехвата Ранвье в 2 раза больше, в то время как постоянная времени примерно в 2 раза меньше соответствующих значений для аксона гальмара. Эти факты, по-видимому, могут быть объяснены тем, что наши эксперименты проводились при более высокой температуре. Это объяснение подтверждается и тем фактом, что количество переносимого заряда, отнесенное к единице натриевого тока, оказывается одинаковым для обоих объектов, так как заряд равен произведению амплитуды воротного тока на его постоянную времени. Таким образом эти различия только подчеркивают принципиальное сходство исследуемых токов для различных объектов.

Представленные данные являются лишь частью проведенного исследования, подробное изложение которого готовится к публикации.

Физиологический научно-исследовательский институт им. А. А. Ухтомского при Ленинградском государственном университете им. А. А. Жданова

Поступило
17 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. М. Armstrong, F. Bezanilla, Nature (London), v. 242, № 5398, 459 (1973). ² С. М. Armstrong, F. Bezanilla, J. Gen. Physiol., v. 63, № 5, 533 (1974). ³ R. D. Keynes, E. Rojas, J. Physiol., v. 233, № 3, 28 (1973). ⁴ А. В. Лонский, В. И. Ильин, А. М. Малов, Физiol. журн., № 1, 136 (1972). ⁵ F. Dodge, B. Frankenhaeuser, J. Physiol., v. 148, № 2, 188 (1959).