

УДК 612.014.423+612.815.2

ФИЗИОЛОГИЯ

Л. Г. МАГАЗАНИК, П. ИЛЛЕШ (Венгрия), В. А. СНЕТКОВ

**ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМОСТЬ ТОКА
КОНЦЕВОЙ ПЛАСТИНКИ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА***(Представлено академиком Е. М. Крепсом 1 VI 1975)*

Для понимания функциональных свойств постсинаптической мембраны большое значение имеет анализ механизма действия веществ, которые модифицируют постсинаптический электрогенез, в частности, изменяют кинетику тока концевой пластинки (т.к.п.). Среди таких веществ определенным интерес представляет серотонин (5-окситриптамиин, 5-ОТ). Ранее было показано, что 5-ОТ уменьшает чувствительность к ацетилхолину (АХ) ⁽¹⁾. При анализе этого феномена выявилась необычность такого угнетающего действия: 5-ОТ существенно меняет зависимость между уровнем мембранного потенциала и амплитудой постсинаптического ответа на естественный медиатор или ионофоретическую аппликацию АХ ⁽²⁾. Если в норме гиперполяризация приводит к увеличению этих ответов и зависимость амплитуды ответов от трансмембранной разности потенциалов приближается к линейной ⁽³⁾, то в присутствии 5-ОТ гиперполяризация вызывает уменьшение ответов.

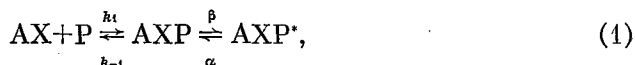
В настоящей работе исследовалось влияние 5-ОТ на временной ход, т.к.п. и его потенциалозависимость. Опыты ставились на изолированных нервно-мышечных препаратах: седалищный нерв — портняжная мышца травяной лягушки. Использовался метод фиксации напряжения в области концевой пластинки с помощью двух внутриклеточных микроэлектродов ⁽⁴⁾. Усиление в цепи обратной связи достигало 12 000, время установления нового уровня фиксации <30 мксек., ошибка фиксации <1%. Квантовый состав т.к.п. уменьшался путем добавления ионов Mg^{2+} к раствору 114 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,8 мМ $CaCl_2$, pH 7,9. Опыты по определению потенциала равновесия т.к.п. проведены на волокнах, у которых предварительно нарушалась мембранно-миофибриллярная связь (раствор Рингера+750 мМ этиленгликоль в течение 30 мин., затем 1 час в растворе, содержащем увеличенное количество ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} ⁽⁵⁾). Т.к.п. фотографировали с экрана осциллографа, вручную оцифровывали и обрабатывали с помощью ЭЦВМ «Наири-3».

В условиях фиксации напряжения подтвердились ранее полученные данные ⁽²⁾ о выраженной нелинейности зависимости амплитуды т.к.п. от мембранного потенциала. Как видно на рис. 1а, в контроле и после удаления 5-ОТ зависимость $I_{max}(V)$ приближается к линейной; в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М 5-ОТ (кривая 2) она переходит через минимум в области -90 мВ. Если в контроле отношение $I_{max}(-150 \text{ мВ})$ и $I_{max}(-70 \text{ мВ})$ составило $2,19 \pm 0,06$ ($n=13$), то в опыте $0,77 \pm 0,06$ ($n=14$). Прямое определение потенциала равновесия т.к.п. (V_{eq}) показало, что воздействие $2 \cdot 10^{-4}$ М 5-ОТ приводит к сдвигу V_{eq} в сторону калиевого равновесного потенциала на 9,5 мВ: в контроле $V_{eq}=3,8 \pm 1,6$ мВ, а в опыте $-5,7 \pm 2,0$ мВ ($n=6$).

Исследование временного хода т.к.п. и его изменений при смещении мембранного потенциала выявило важные проявления эффекта 5-ОТ. Фаза спада т.к.п. экспоненциальна на большей части своего протяжения как в норме, так и в присутствии 5-ОТ, но, как видно на рис. 1б, время полуспада ($T_{1/2}$) в присутствии 5-ОТ фактически не зависит от уровня

мембранного потенциала, в то время как в контроле и после удаления 5-ОТ эта величина существенно увеличивается по мере гиперполяризации. Так, отношение $T_{1/2}$ при -150 мВ и -70 мВ составило в контроле $1,54 \pm 0,04$ ($n=13$), а при действии 5-ОТ $0,90 \pm 0,03$ ($n=14$). Способность 5-ОТ менять потенциалозависимость временного хода т.к.п. наводила на мысль о том, что механизм его действия должен включать какое-то влияние на кинетику активации ионных каналов постсинаптической мембраны.

На основании некоторых аналогий, почерпнутых из общей энзимологии, было предположено ⁽⁶⁾, что процесс активации ионных каналов постсинаптической мембраны идет в 2 этапа:



т. е. сначала образуется комплекс АХ с рецептором (Р), а затем этот комплекс активируется (AXP^*), что соответствует процессу открытия ионных каналов. В дальнейшем к этой схеме был добавлен ряд предположений, позволивший создать количественную модель кинетики ионных токов ⁽⁷⁾. В этой модели принимается, что $k_1, k_{-1} \ll \alpha, \beta$; что из общего числа рецепторов в каждый момент времени лишь незначительная часть образует комплекс с АХ и вероятность активации уже образовавшегося комплекса мала. Модель позволила объяснить ряд важных особенностей т.к.п.: 1) экспоненциальность спада т.к.п. на большей части его протяженности; 2) потенциалозависимость константы скорости спада; 3) спектр флуктуаций проводимости постсинаптической мембраны при действии на нее АХ ⁽⁷⁻⁹⁾.

Исходя из модели, было предложено выражение ⁽¹⁰⁾, хорошо описывающее весь временной ход т.к.п. и его потенциалозависимость

$$\frac{\partial g(V, t)}{\partial t} + \alpha(V)g(V, t) = \beta(V)W(t), \quad (2)$$

где g — проводимость мембраны, V — мембранный потенциал, α, β — константы схемы (1), а $W(t)$ — управляющая функция, определяющаяся выражением

$$W(t) = \frac{\gamma N c^n(t)}{K + c^n(t)}, \quad (3)$$

где γ — проводимость открытого ионного синаптического канала, N — число таких каналов, c — концентрация АХ в примембранном слое, K — константа равновесия 1-й стадии в схеме (1), n — степень кооперативности эффекта АХ. Учитывая экспоненциальность потенциалозависимости основных кинетических параметров α и β , удобно представить их в следующем виде:

$$\alpha(V) = e^{A_1 V + B_1}; \quad \beta(V) = e^{A_2 V + B_2}. \quad (4)$$

Константа α легко может быть найдена в эксперименте как константа скорости спада экспоненциальной части т.к.п. В рамках этой модели и принятых обозначений наблюдавшиеся нами изменения спада т.к.п. и его потенциалозависимости можно расценивать как значительное уменьшение коэффициента A_1 при действии 5-ОТ от нормальной величины практически до нуля. Это означает, что спад т.к.п., оставаясь экспоненциальным, перестает быть потенциалозависимым.

В отличие от фазы спада фаза нарастания т.к.п. до максимума гораздо более сложна для трактовки, поскольку ее временной ход определяется в основном взаимодействием двух процессов: изменением концентрации АХ в примембранном слое и открытием ионных каналов с константой скорости β . Следует подчеркнуть, что одновременность и тесная связь этих процессов не дают возможности прямо определить в эксперименте абсолютную величину константы β . Этот факт находит свое формальное выражение в

том, что $\beta(V)$ и $W(t)$ входят в уравнение (2) только в виде произведения. Так как $W(t)$ — функция, зависящая только от времени, то при измерении потенциалозависимости ее можно рассматривать как постоянный множитель, а это, в свою очередь, делает реальным экспериментальное определение β с точностью до этого множителя.

Как было показано (¹⁰), величина β непосредственно влияет на характер зависимости амплитуды т.к.п. от мембранного потенциала в соответствии с выражением

$$I_{\max}(V) = \frac{\beta(V)}{K} N(V - V_{\text{eq}}) \int_0^{\infty} c^n(t) dt. \quad (5)$$

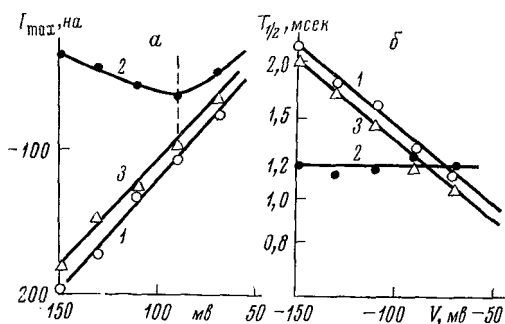


Рис 1

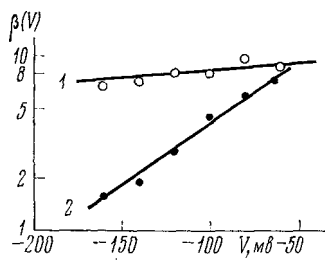


Рис 2

Рис. 1. Влияние серотонина на зависимость амплитуды (а) и времени полуспада (б) т.к.п. от уровня мембранного потенциала. 1 — контроль, 2 — в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М серотонина, 3 — после отмывки серотонина. Пунктиром обозначено рассчитанное положение минимума функции $I_{\max}(V)$. Все измерения проведены на одной и той же концевой пластинке.

Рис. 2. Влияние серотонина на потенциалозависимость константы β . 1 — контроль, 2 — в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М серотонина. β определяли с точностью до потенциалонезависимого множителя $W(t)$ (см. (2)) и откладывали в условных единицах (полулогарифмическая шкала). Все измерения проведены на одной и той же концевой пластинке.

Из уравнения (5) следует, что зависимость амплитуды т.к.п. от мембранного потенциала должна отличаться от линейной в области гиперполяризации тем больше, чем больше потенциалозависимость β , т. е. коэффициент A_2 в (4).

Основываясь на изложенной выше теории, мы предположили, что наблюдаемая в эксперименте нелинейность зависимости амплитуды т.к.п. от мембранного потенциала может объясняться способностью 5-ОТ увеличивать потенциалозависимость β , т. е. коэффициент A_2 в (4). Анализ уравнения (5) показывает, что при достаточно сильной зависимости β от V (большой коэффициент A_2 в (4)) функция $I_{\max}(V)$ становится немонотонной уже в доступной области значений мембранного потенциала.

Для определения потенциалозависимости β были поставлены специальные опыты, во время которых одновременно фотографировалась фаза подъема т.к.п. до максимума при большой скорости развертки и весь временной ход т.к.п. при меньшей скорости развертки. Фазу нарастания т.к.п. оцифровывали с шагом 100 мсек., а по экспоненциальному участку спада определяли константу α . По уравнению (2) вычисляли произведение $\beta(V)W(t)$ и откладывали его зависимость от мембранного потенциала в полулогарифмических координатах. Наклон полученных прямых в соответствии с (4) давал численное значение коэффициента A_2 . Как видно на рис. 2, воздействие 5-ОТ действительно приводит к значительному увеличению коэффициента A_2 , т. е. потенциалозависимости β . В эксперименте

($n=4$) средняя величина A_2 составила $0,0050 \text{ мВ}^{-1}$ в контроле и $0,0163 \text{ мВ}^{-1}$ в присутствии $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ 5-ОТ, т. е. A_2 увеличивается в 3,3 раза.

Важно было проверить, достаточно ли найденное в опыте увеличение A_2 для объяснения наблюдаемой в том же опыте немонотонности функции $I_{\max}(V)$. При анализе уравнения (5) нами было найдено, что функция $I_{\max}(V)$ имеет минимум в точке $V_{\min}=V_{\text{eq}}-1/A_2$. Подстановка найденной в эксперименте величины A_2 дала значение $V_{\min}=-86 \text{ мВ}$ в присутствии 5-ОТ. Таким образом, вычисленное и определенное в прямом эксперименте положения минимума на кривой хорошо совпадают (см., например, кривую 2 рис. 1а).

Очевидно, что 5-ОТ в данном случае выступает в роли модификатора постсинаптического электрогенеза в концевой пластинке мышечного волокна. 5-ОТ сам не вызывает изменения проводимости постсинаптической мембраны, но способен влиять на кинетику ионных каналов, активируемых АХ. Возникает вопрос о молекулярном механизме этого влияния. В наших опытах эффект 5-ОТ мог быть предупрежден его специфическим антагонистом — метизергидом ($3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$). Это позволяет предполагать существование в постсинаптической мембране молекулярной структуры, сходной с серотониновым рецептором, причем этот «серотониновый рецептор» тесно связан с молекулярным механизмом активации синаптических ионных каналов (холинорецептором?).

Если следовать предложенной гипотезе о потенциалозависимости конформационных переходов полярной воротной молекулы (⁷), то можно предполагать, что 5-ОТ способен менять дипольные моменты этой воротной молекулы в каком-то из ее состояний, влияя тем самым на константы скоростей ее превращений и их потенциалозависимость.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
27 VII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Colomo, R. Rahamimoff, E. Stefani, *Europ. J. Pharmacol.*, v. 3, 272 (1968).
² Л. Г. Магазаник, В кн.: Биофизика мембран, Каунас, 1973, стр. 430. ³ P. Fatt, B. Katz, *J. Physiol. (London)*, v. 115, 320 (1951). ⁴ A. Takeuchi, N. Takeuchi, *J. Neurophysiol.*, v. 22, 395 (1959). ⁵ P. W. Gage, R. S. Eisenberg, *Science*, v. 158, 1702 (1967).
⁶ J. Del Castillo, B. Katz, *Proc. Roy. Soc. B*, v. 146, 369 (1957). ⁷ K. L. Magleby, C. F. Stevens, *J. Physiol. (London)*, v. 223, 173 (1972). ⁸ B. Katz, R. Miledi, *ibid.*, v. 224, 665 (1972). ⁹ C. R. Anderson, C. F. Stevens, *ibid.*, v. 235, 655 (1973). ¹⁰ V. E. Dionne, C. F. Stevens, *ibid.*, in press.