

И.В. Кузнецова, Д.А. Евстигнеев, Н.В. Глухова

Длительные следовые потенциалы миелинизированных нервных волокон амфибий при блокировании калиевых каналов 4-аминопиридином

*Динамика длительности следовой деполяризации под влиянием блокатора быстрых калиевых каналов 4-аминопиридина (4-АП) изучалась методом внеклеточной регистрации электрической активности миелинизированных нервных волокон амфибий *Rana ridibunda* Pallas. Эти изменения зависят от времени действия блокатора и связанного с ним роста деполяризации мембраны, оцениваемой по площади потенциала действия. Обнаружено три сменяющих друг друга фазы изменений длительности следовой деполяризации: её первоначальное увеличение, дальнейшее прекращение роста и уменьшение с переходом в следовую гиперполяризацию. Переход одной фазы в другую сопровождается статистически достоверным увеличением площади потенциала действия (с $189,201 \pm 28,437$ в нормальном растворе до $489,945$ мВЧмс $\pm 41,75$ мВЧмс через 5 мин действия 4-АП). Смена обнаруженных фаз обусловлена увеличивающейся активацией медленных калиевых каналов по мере всё уменьшающейся роли быстрых калиевых каналов в осуществлении реполяризации мембраны. Происходящие под влиянием 4-АП уменьшение длительности посттетанической деполяризации, появление посттетанической гиперполяризации при низкочастотной стимуляции и её усиление при высокочастотной стимуляции связаны с активацией медленных калиевых каналов.*

ВСТУПЛЕНИЕ

Существенно продвинуться в понимании происходящих под влиянием 4-аминопиридина (4-АП) изменений электрической активности возбудимых мембран удалось после разделения калиевой проводимости на быструю и медленную [1, 5, 10] и установления факта, что 4-АП блокирует только быстрые калиевые каналы [5, 6]. Данные о существовании в миелинизированных нервных волокнах двух компонент калиевой проводимости не раз использовались для объяснения происходящих под влиянием 4-АП изменений амплитудно-временных характеристик следовых потенциалов. В частности, появление следовой гиперполяризации после приложения к миелинизированным нервным волокнам крыс 4-АП связывается с возникновением медленного

калиевого тока: после блокирования 4-АП быстрых калиевых каналов нарастающая деполяризация мембраны (связанная с расширением потенциала действия ПД и многоспайковыми ответами) может вести к увеличивающейся активации медленных (тетраэтиламмонийчувствительных) калиевых каналов [11]. Некоторые из эффектов 4-АП (увеличение амплитуды и длительности следовой деполяризации (СД)) воспроизведены на модели миелинизированного нервного волокна млекопитающих посредством уменьшения быстрой калиевой проводимости [13].

В нашей предыдущей работе [3] описаны эффекты 4-АП на спайковую и следовую часть ПД миелинизированных нервных волокон амфибий. Обнаружено два основных типа реакции нервных волокон на воздействие 4-АП: расширение ПД и возникновение многоспайкового ответа, которые

© И.В. Кузнецова, Д.А. Евстигнеев, Н.В. Глухова

приводили к значительному увеличению амплитуды СД, в то время как изменения её длительности носили более сложный, фазный, характер.

Целью этой работы было описание поэтапных изменений длительности СД, происходящих по мере увеличения времени действия 4-АП, и интерпретации их с точки зрения наличия в мембране миелинизированных нервных волокон быстрых и медленных калиевых каналов.

МЕТОДИКА

Эксперименты ($n = 62$) проводили на одиночных миелинизированных волокнах седалищного нерва озёрной лягушки *Rana ridibunda* Pallas. Принадлежность волокон к моторному или сенсорному типу не устанавливалась. Препаровку нервного волокна производили так, что изолировали лишь интернодальную часть, а перехват, от которого в последующем отводили ПД, оставляли интактным в нервном стволе [2]. Схема расположения нервного волокна в экспериментальной камере приведена ранее [3]. Раздражение перехвата осуществляли через серебряные электроды, находящиеся на проксимальном конце нерва, а отведение ПД производили неполяризующимися каломельными электродами, расположенными по обе стороны от изолированного участка нервного волокна. Раздражение нервного волокна производили надпороговыми (20 мВ) одиночными (длительностью 0,1 мс) и ритмическими (частотой 10, 50, 100 и 300 Гц) прямоугольными стимулами от двухканального электронного стимулятора ЭСТ-10 с радиочастотным выходом. Ритмическое раздражение нервного волокна осуществлялось в течение 1 с. Его ПД подавали на усилитель постоянного тока УУ-2М и регистрировали с помощью платы аналого-цифрового преобразователя, встроенного в персональный компьютер. В экспериментах исполь-

зовали раствор Рингера следующего состава (ммоль/л): NaCl – 111, KCl – 2,5, CaCl₂ – 1,95, NaHCO₃ – 1,2, буфер НЕРЕС (“Sigma”, США) – 10 (рН раствора поддерживали на уровне 7,3). Замену растворов в камере осуществляли при помощи пипетки (процедура замены одного раствора на другой занимала 10 – 15 с). Блокатор калиевых каналов 4-АП (“Sigma”, США) применяли в концентрации 2 ммоль/л; продолжительность действия составляла от 5 до 40 мин. Объём омывающего нервное волокно раствора поддерживали постоянным. Новокаин (“Органика”, г. Новокузнецк) использовали в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Эксперименты проводили при 18–22 °С в обычной воздушной среде, без использования каких-либо искусственных газовых смесей.

Площадь ПД вычисляли как численный интеграл от функции зависимости потенциала от времени в интервале длительностью 75 мс с шагом интегрирования 0,1 мс при помощи программы Mathcad 2000. Выбор длины отрезка интегрирования обусловлен максимальной продолжительностью регистрируемых многоспайковых и платообразных ответов, возникающих под влиянием 4-АП. Таким образом, измерялась площадь ПД вместе с начальной, наиболее значительной по амплитуде частью СД. Увеличение длительности отрезка интегрирования было нецелесообразным по двум причинам. Во-первых, выбор более длительного отрезка интегрирования ведёт к увеличению погрешности измерений. Во-вторых, на более поздних этапах более высока вероятность включения медленных калиевых проводимостей [7, 14], которые будут уменьшать площадь ПД, что осложняет анализ (в отдельных экспериментах уже через 200 мс после начала ПД под воздействием 4-АП наблюдалась следовая гиперполяризация, то есть мембранный потенциал принимал отрицательные значения и площадь фигуры, находящейся ниже

линии потенциала покоя, автоматически вычиталась из общей площади ПД). Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием критерия t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ответ на приложение к нервному волокну одиночного деполяризующего стимула возникал ПД с хорошо выраженной СД, динамика амплитуды которой под воздействием 4-АП описана в предыдущей работе [3]. Настоящая работа направлена на изучение происходящих под влиянием 4-АП изменений длительности СД в зависимости от степени расширения ПД и увеличения амплитуды СД. В качестве меры суммарной деполяризации, создаваемой на мембране во время генерации спайковой части ПД и начальной части СД, подвергающихся наиболее разительным изменениям под влиянием 4-АП, была выбрана площадь ПД. Ранее [12] данный показатель был с успехом использован для оценки степени действия 4-АП на спайковую и следовую часть ПД крыс в процессе взросления (наиболее значительное увеличение площади ПД под влиянием 4-АП отмечается у молодых животных; эффект истощается по мере взросления).

В нормальном растворе Рингера площадь ПД составила в среднем $189,20 \text{ мВ} \cdot \text{мс} \pm 28,44 \text{ мВ} \cdot \text{мс}$. Добавление к раствору Рингера, омывающему исследуемый перехват Ранвье, 4-АП в концентрации 2 ммоль/л в течение 5 мин приводило либо к расширению ПД, либо к возникновению многоспайкового ответа. При этом наблюдалось достоверное ($P < 0,05$) увеличение площади ПД (в среднем до $489,95 \text{ мВ} \cdot \text{мс} \pm 41,75 \text{ мВ} \cdot \text{мс}$, $n = 30$). Более длительное воздействие 4-АП на нервные волокна приводило к ещё более значительному приросту площади ПД.

Если такие показатели, как ширина и

площадь ПД, амплитуда СД всё больше возрастали по мере выдерживания волокна в растворе с 4-АП, длительность СД изменялась в несколько этапов. На рис. 1 показан характерный опыт, в котором 4-АП вызвал возникновение многоспайкового ответа, после которого видна большая СД. Значительно увеличались как амплитуда (с $2,24$ до $5,76 \text{ мВ}$), так и длительность (с $73,31$ до $493,00 \text{ мс}$) СД (см. рис. 1, б). По мере выдерживания нервного волокна в растворе Рингера с 4-АП произошло увеличение количества повторных ответов (см. рис. 1, в). Длительность СД при этом уменьшилась (до $408,20 \text{ мс}$). Ещё более выраженная смена роста длительности СД её падением показана на рис. 3. Как можно видеть, 4-АП привёл к возникновению многоспайкового ответа (см. рис. 3, б) и увеличению амплитуды (с $3,86$ до $6,54 \text{ мВ}$) и длительности (с $213,38$ до $487,22 \text{ мс}$) СД. В дальнейшем, при увеличении количества дополнительных спайков многоспайкового ответа (см. рис. 3, в), длительность СД значительно уменьшилась (с $487,22$ до $147,23 \text{ мс}$). В части экспериментов (площадь ПД в которых составляла $901,54 \text{ мВ} \cdot \text{мс} \pm 111,90 \text{ мВ} \cdot \text{мс}$, $n = 8$) наблюдалось не только уменьшение длительности СД, но и возникновение после неё следовой гиперполяризации (СГ). Появление последней вслед за вызванным 4-АП многоспайковым ответом ранее было показано на миелинизированных нервных волокнах крыс [8, 9, 11, 12]. В тех исследованиях, в которых миелинизированные нервные волокна крыс обнаруживали СГ после одиночного ПД в исходном состоянии, 4-АП приводил к её увеличению [4]. Если блокатор вызывал лишь расширение ПД, без возникновения на его нисходящей фазе дополнительных спайков, характер изменения СД также зависел от степени продления ПД. В экспериментах, где 4-АП приводил к продлению ПД (но без возникновения длительных платообразных ПД), отмечалось типичное

первоначальное увеличение амплитуды и длительности СД. По мере того, как ПД всё более расширялся, происходил дальнейший рост амплитудно-временных характеристик СД с тенденцией отставания прироста длительности СД по сравнению с амплитудой. В одних опытах это заканчивалось прекращением роста длительности, в других – её уменьшением.

На рис. 2 можно проследить все перечисленные выше поэтапные изменения СД под влиянием 4-АП. В течение 5 мин действия 4-АП наблюдалось постепенное увеличение амплитуды и длительности СД, после чего (по мере всё большего растягивания ПД) рост длительности СД прекратился и она начала уменьшаться. Сокращение длительности СД сопровождалось ростом СГ, достигающей своих максимальных величин после платообразных ПД. Следует отметить, что нередко нервные волокна, отвечавшие продолжительное время на воздействие 4-АП расширением

ПД, в последующем генерировали многоспайковые ответы.

4-АП блокирует только быстрые калиевые каналы, активируемые при сравнительно небольшой деполяризации и ответственные за реполяризацию ПД [5–7, 14]. Закономерно, что по мере блокирования быстрых калиевых каналов их участие в реполяризации мембраны уменьшается и это приводит к расширению ПД (вплоть до платообразных ПД), появлению на его нисходящей фазе повторных ответов, что в итоге увеличивает степень деполяризации мембраны (оцениваемой по площади фигуры, занимаемой ПД). Рост деполяризации мембраны (площади ПД) в свою очередь активирует медленные калиевые каналы, что и приводит к более быстрой реполяризации мембраны (сокращению длительности СД и появлению СГ). Наиболее характерным признаком, позволяющим определить момент явного включения медленных калиевых каналов, является

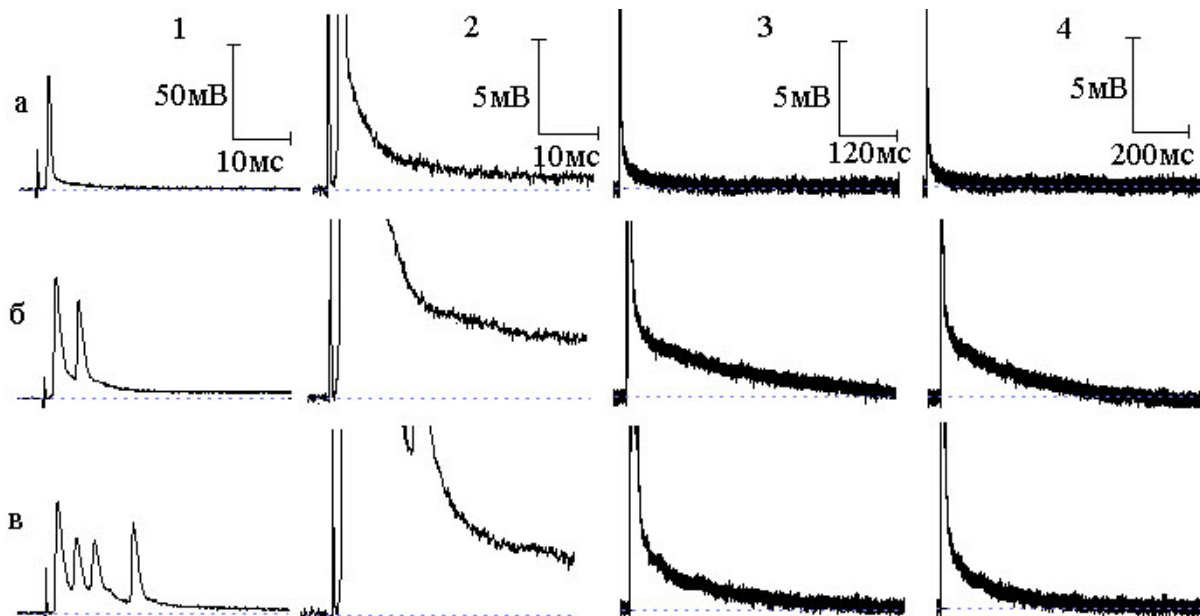


Рис. 1. Динамика следовых потенциалов при возникновении под влиянием 4-аминопиридина (4-АП) многоспайкового ответа: а – потенциал действия (1) и следовая деполяризация (СД) при различной скорости развёртки (2, 3, 4) в нормальном растворе Рингера; б, в – потенциал действия и СД через 13 и 16 мин соответственно действия на нервное волокно

увеличение скорости спада СД, измеряемой как отношение амплитуды СД к её продолжительности. Статистический анализ показал, что площадь ПД достоверно коррелирует

($r = 0,95$, $n = 30$, $P < 0,05$) со скоростью спада СД. Итак, именно разная степень активации медленных калиевых каналов по мере блокирования 4-АП

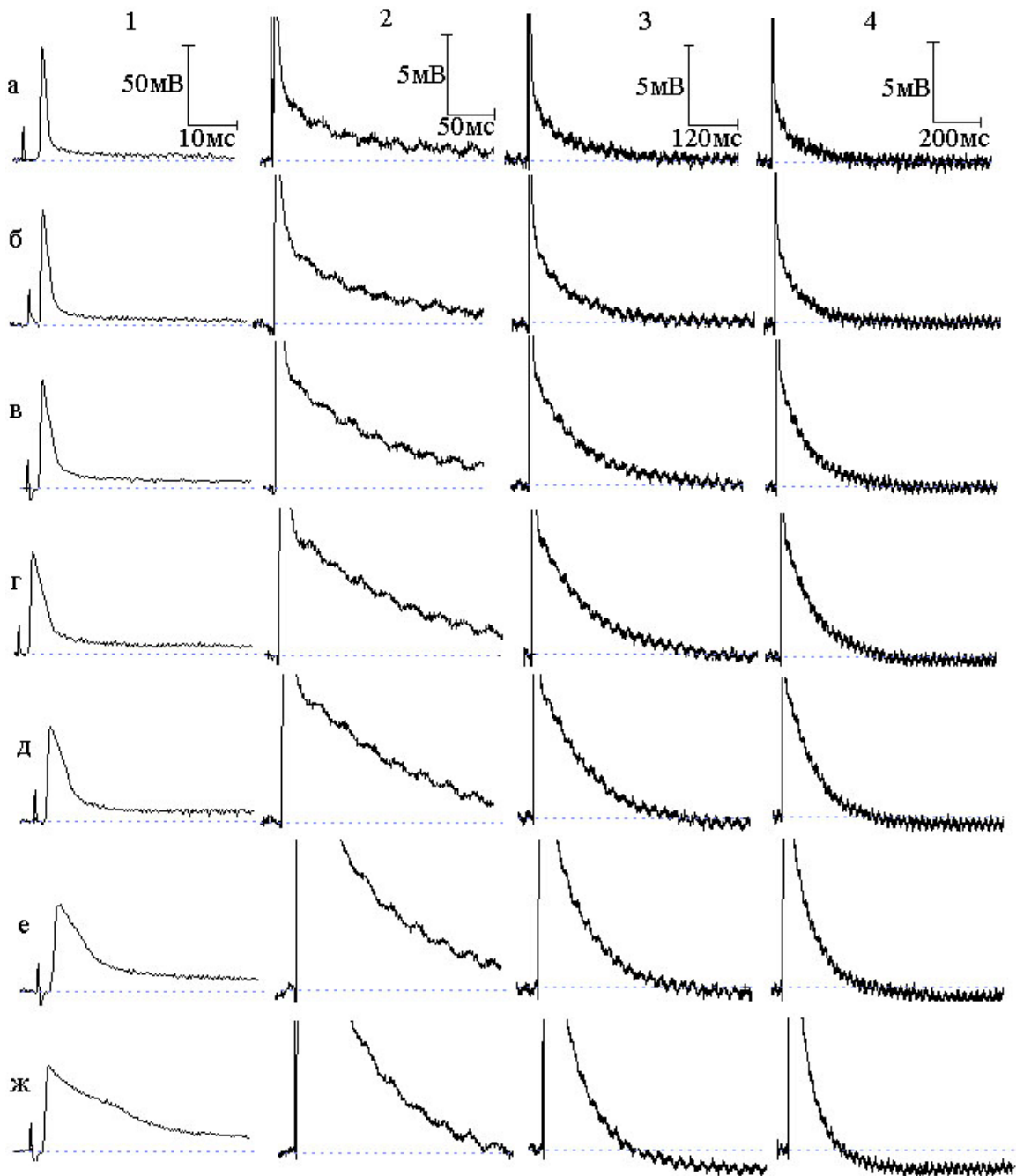


Рис. 2. Динамика следовых потенциалов при продлении потенциала действия (ПД) и генерации платообразных потенциалов под влиянием 4-аминопиридина (4-АП): а – ПД (1) и следовая деполяризация (СД) при различной скорости развёртки (2, 3, 4) в нормальном растворе Рингера; б, в, г, д, е, ж – ПД и СД через 3, 5, 6, 8, 9 и 13 мин соответственно

быстрых каналов и лежит в основе смены первоначального роста СД её падением и переходом в СГ.

Наша интерпретация эффектов 4-АП на СД перекликается с данными, полученными на миелинизированных нервных волокнах крыс [11]. Авторы полагают, что блокирование 4-АП быстрых калиевых каналов, приводя к увеличению деполяризации мембраны (расширению ПД и многоспайковым ответам), может способствовать возрастанию активации медленных калиевых каналов и генерации СГ. В качестве доказательства связи СГ с активацией медленного калиевого тока у этого типа волокон авторы использовали факт устранения данного следового потенциала

тетраэтиламмонием, являющегося блокатором как быстрых, так и медленных калиевых каналов [5, 10].

В следующей серии опытов мы попытались снизить деполяризацию мембраны, вызванную большим по своей площади многоспайковым ответом, и установить, как это скажется на временном ходе длительной СД. С этой целью к раствору Рингера, содержащему 2 ммоль/л 4-АП, добавили новокаин ($1 \cdot 10^{-4}$ г/мл). Добавление новокаина в той же концентрации к нервному волокну, находящемуся в нормальном растворе Рингера (без 4-АП), приводило к достоверному снижению как амплитуды ПД, так и амплитуды и длительности СД, которые уменьшались про-

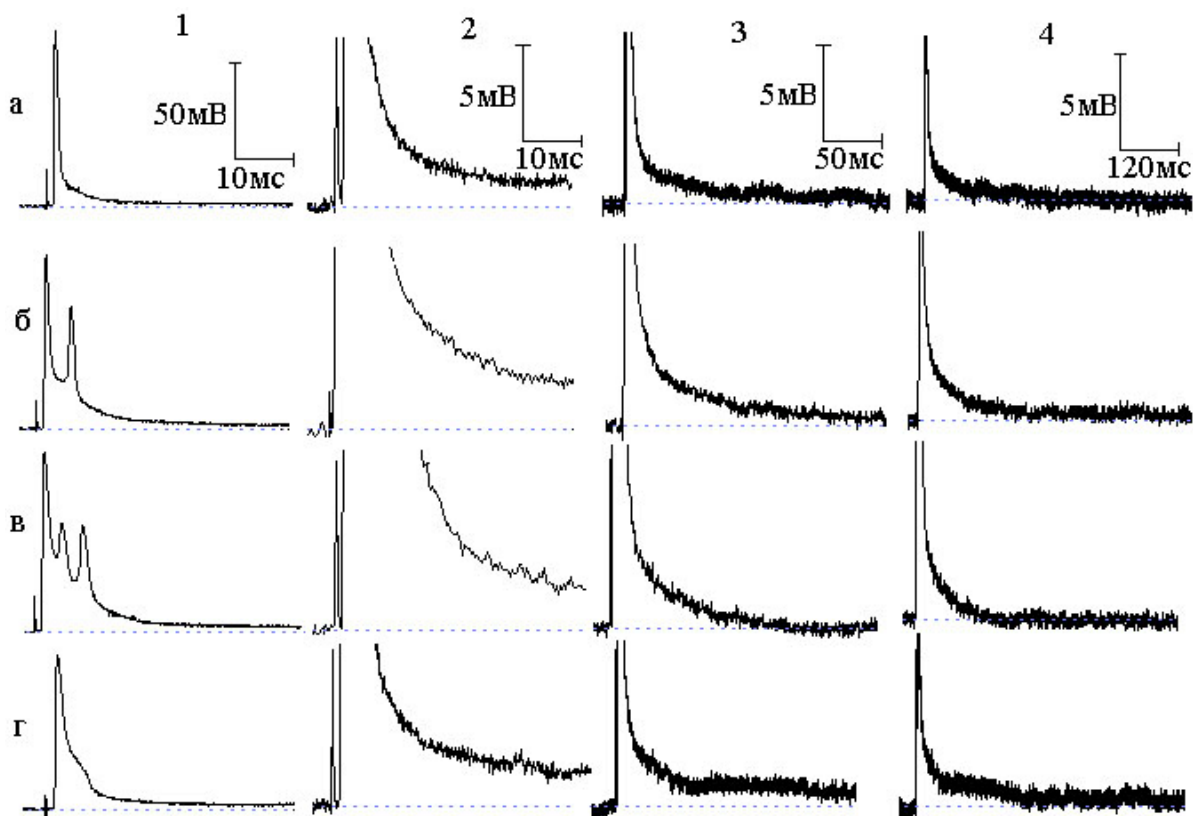


Рис. 3. Влияние 4-аминопиридина (4-АП) на спайковую и следовую часть потенциала действия (ПД) миелинизированного нервного волокна в присутствии новокаина: а – ПД (1) и следовая деполяризация (СД) при различной скорости развёртки (2, 3, 4) в нормальном растворе Рингера; б, в – ПД и СД через 11 и 19 мин соответственно действия на нервное волокно; г – ПД и СД после добавления на 24-й минуте к раствору Рингера 4-АП новокаина

порционально снижению амплитуды ПД. Для исследования совместного действия 4-АП и новокаина были выбраны те экспери-

менты, в которых амплитуда ПД успела снизиться не более чем на 20 %. Уже к первой минуте действия новокаин уменьшил

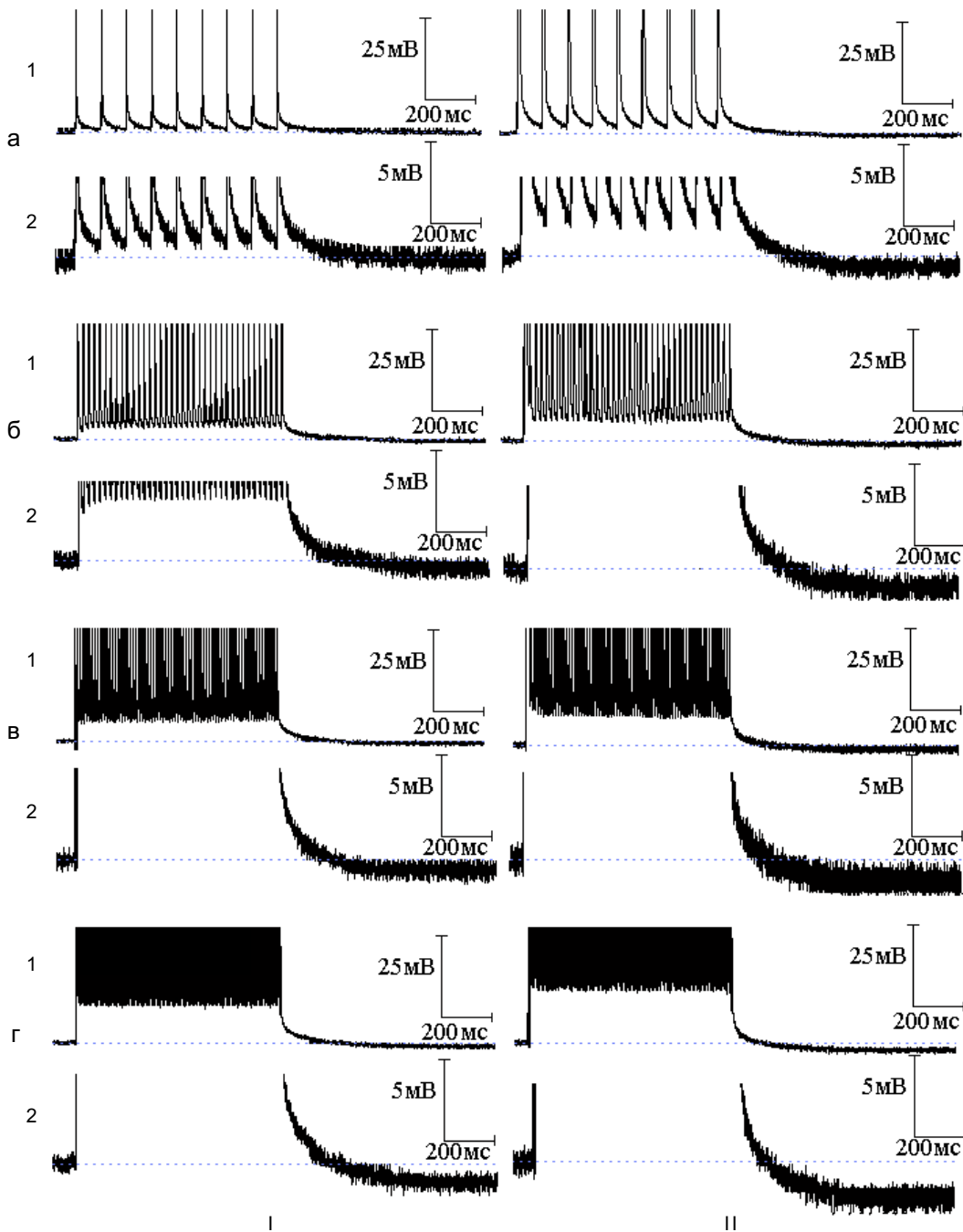


Рис. 4. Влияние 4-аминопиридина (4-АП) на следовые потенциалы (СП), регистрируемые при ритмической стимуляции миелинизированного нервного волокна: I – в нормальном растворе Рингера; II – через 5 мин действия 4-АП. Частота стимуляции нервного волокна 10 (а), 50 (б), 100 (в) и 300 (г) Гц. 1 и 2 – разные усиления

общую деполяризацию мембраны (площадь ПД уменьшилась на $55,13 \% \pm 12,77 \%$ по сравнению с действием 4-АП; $P < 0,05$), что выразилось в снижении амплитуды ПД и исчезновении на его нисходящей фазе дополнительных спайков (см. рис. 3, г). Оказалось, что длительность СД при этом не только не уменьшилась, но и возросла ($P < 0,05$, $n = 10$). Этот результат может рассматриваться как дополнительное подтверждение идеи, что разная степень деполяризации мембраны в присутствии 4-АП определяет временной ход длительной СД: увеличение деполяризации ведёт к большей активации медленных калиевых каналов и более быстрой реполяризации, тогда как уменьшение деполяризации активирует меньшее число калиевых каналов и приводит к затягиванию реполяризации.

Ранее обнаружено [3], что под влиянием 4-АП увеличивается амплитуда и уменьшается длительность посттетанической деполяризации (ПТД), подобно СД, наблюдаемой после значительного по своей площади ПД. ПТД под влиянием 4-АП не только уменьшается по своей длительности, но и переходит с ростом частоты стимуляции в посттетаническую гиперполяризацию (ПТГ). 4-АП привёл к уменьшению длительности ПТД и возникновению ПТГ при частоте раздражения 10 и 50 Гц (рис. 4). Обнаруживаемая уже в исходном состоянии ПТГ (при частоте стимуляции 100 и 300 Гц) под влиянием 4-АП резко возрастает.

Объяснение поведения ПТД в присутствии 4-АП также может быть дано с точки зрения увеличения активации медленных калиевых каналов по мере роста деполяризации мембраны. Деполяризация мембраны, развивающаяся во время ритмической стимуляции (в течение 1 с) в несколько раз превышает таковую во время генерации многоспайкового (или платообразного) ответа, что приводит к куда более сильной активации медленных калиевых каналов, ведущей к более ощутимому сок-

ращению ПТД и генерации более значительного по амплитуде и длительности гиперполяризационного потенциала – ПТГ. Та деполяризация, которая развивается после многоспайкового ответа (или же платообразного ПД), способна сократить длительность СД и вызвать сравнительно небольшую по своей амплитуде и длительности СГ.

ВЫВОДЫ

1. Блокирование быстрых калиевых каналов 4-АП приводит к продлению ПД и генерации многоспайковых ответов. Изменения длительности СД зависят от времени действия блокатора и связанного с ним роста деполяризации мембраны, измеряемой по площади фигуры, занимаемой ПД. Обнаружено три сменяющие друг друга фазы изменений длительности следовой деполяризации: её первоначальное увеличение, дальнейшее прекращение роста и, наконец, уменьшение с переходом в следовую гиперполяризацию. В основе смены первоначального роста СД её падением и переходом в следовую гиперполяризацию в присутствии 4-АП лежит прогрессивно увеличивающаяся активация медленных калиевых каналов по мере всё уменьшающейся роли быстрых калиевых каналов в осуществлении реполяризации мембраны.

2. Подавление натриевого тока новокаином и связанное с этим уменьшение площади вызванного 4-АП многоспайкового ответа (при незначительном уменьшении амплитуды ПД) ведёт к увеличению длительности СД.

3. ПТД, регистрируемая после ритмической стимуляции нервных волокон, под влиянием 4-АП увеличивается по амплитуде и уменьшается по длительности. При высокочастотной стимуляции она переходит в ПТГ, которая под влиянием 4-АП резко увеличивается как по амплитуде, так и по длительности. 4-АП также вызывает

появление ПТГ при раздражении нервных волокон ритмическими импульсами низкой частоты. Происходящие под влиянием 4-АП уменьшение длительности ПТД, появление ПТГ при низкочастотной и её усиление при высокочастотной стимуляции связаны с активацией медленных калиевых каналов.

I.V. Kuznetzova, D.A. Evstigneev, N.V. Gluhova

PROLONGED AFTER-POTENTIALS OF MYELINATED NERVOUS FIBRES OF AMPHIBIAN AFTER BLOCKAGE OF POTASSIUM CHANNELS BY 4-AMINOPYRIDINE

Myelinated nerve fibres of *Rana ridibunda* Pallas were studied by using extra-cellular recording technique. 4-aminopyridine, a blocker of fast potassium channels produced considerable changes in duration of the after-depolarization and increase in total membrane depolarization (evaluated by an action potential area). These effects were time-dependent. The after-depolarization duration under 4-aminopyridine (4-AP) treatment changes in 3 phases: at the beginning of the exposure its duration increased; then the increase stopped; and later duration of the after-depolarization start to decrease. The last phase was often followed by hyperpolarizing after-potential. The interchange of these phases accompanies by statistically significant increase of the action potential area (from 189.201 ± 28.437 mV \cdot ms in normal solution to 489.945 ± 41.75 mV \cdot ms in 5 minutes after 4-AP application). These observations are explained as a result of the increased activation of the slow potassium channels and decreased portion of fast potassium channels involved in membrane repolarization. The decrease in post-tetanic depolarization duration, the appearance of the post-tetanic hyperpolarization at low frequencies and increase of post-tetanic hyperpolarization at higher frequencies of stimulation under 4-AP treatment are dependent on activation of slow potassium channels.

Ecological Foundation, Ulianov Region, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин В.И., Катина И.Е., Лонский А.В., Маковский В.С., Полищук Е.В. Компоненты калиевого тока мембраны перехвата Ранвье в условиях фиксации потенциала. – В кн.: Биофизика мембран: Материалы конф. 21–23 сент. 1973 г. – Каунас, 1973. – С. 286–291.

2. Каталымов Л.Л. Особенности следовой деполяризации нерва и одиночного нервного волокна лягушки // *Нейрофизиология*. – 1974. – 6, № 10. – С. 532–541.

3. Кузнецова И.В., Евстигнеев Д.А., Глухова Н.В. Изменения электрической активности миелинизированных нервных волокон амфибий под влиянием 4-аминопиридина // *Фізіол. журн.* – 2005. – 51. – № 2. – С. 96–103.

4. David G., Modney B., Scappaticci K.A. et al. Electrical and morphological factors influencing the depolarizing after-potential in rat and lizard myelinated axons // *J. Physiol.* – 1995. – 489, № 1. – P. 141–157.

5. Dubois J.M. Evidence for existence of three types of potassium channels in the frog node membrane // *Ibid.* – 1981. – 318. – P. 279–295.

6. Dubois J.M. Properties and physiological roles of K⁺ currents in frog myelinated nerve fibres as revealed by 4-aminopyridine. – In: *Aminopyridines and similarly acting drugs*. – N. Y.: Pergamon press, 1982. – P. 43–51.

7. Dubois J.M. Potassium current in the frog node of Ranvier // *Prog. Biophys. Molec. Biol.* – 1983. – 42. – P. 1–20.

8. Eng D.L., Gordon T.R., Kocsis J.D., Waxman S.G. Development of 4-AP and TEA sensitivities in mammalian myelinated nerve fibers // *J. Neurophysiol.* – 1988. – 60, № 6. – P. 2168–2179.

9. Honmou O., Utzshneider D.A., Rizzo M.A. et al. Delayed depolarization and slow sodium current in cutaneous afferents // *J. Neurophysiol.* – 1994. – 71, № 5. – P. 1627–1637.

10. Ilyin V.I., Katina I.E., Lonskii A.V. et al. The Cole-Moore effect in nodal membrane of the frog *Rana ridibunda*: evidence for fast and slow potassium channels // *J. Membrane Biol.* – 1980. – 57. – P. 179–193.

11. Kocsis J.D., Eng D.L., Gordon T.R., Waxman S.G. Functional differences between 4-aminopyridine and tetraethylammonium-sensitive potassium channels in myelinated axons // *Neurosc. Lett.* – 1987. – 75. – P. 193–198.

12. Kocsis J.D., Ruiz J.A., Waxman S.G. Maturation of mammalian myelinated fibers: changes in action-potential characteristics following 4-aminopyridine application // *J. Neurophysiol.* – 1983. – 50, № 2. – P. 449–463.

13. McIntyre C.C., Richardson A.G., Grill W.N. Modeling the excitability of mammalian nerve fibers: influence of afterpotentials on the recovery cycle // *Ibid.* – 2002. – 87, № 2. – P. 995–1006.

14. Poulter M.P., Padjen A.L. Different voltage-dependent potassium conductances regulate action potential repolarization in frog myelinated axon // *Neuroscience*. – 1995. – 68, № 2. – P. 497–504.

Экол. фонд Ульянов. обл., Россия

Материал поступил в редакцию 23.05.2006