

ДЕЙСТВИЕ БЛОКАТОРА КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ТЕТРАЭТИЛАММОНИЯ В УСЛОВИЯХ КАЛИЕВОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ МЕМБРАНЫ МИЕЛИНИЗИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН АМФИБИЙ

¹Кузнецова И.В., ²Евстигнеев Д.А., ¹Глухова Н.В.

¹ГОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»,
Ульяновск, e-mail: Cryptaciura@rambler.ru;

²ФГОУ ВПО «Ульяновское высшее авиационное училище гражданской авиации (институт)»,
Ульяновск, e-mail: temporaria@yandex.ru

Действие блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония (ТЭА) в условиях калиевой деполяризации мембраны изучено на миелинизированных нервных волокнах амфибий (*Rana ridibunda* Pallas). Нервные волокна отвечают на замену нормального раствора Рингера (2,5 мМ К⁺) на гиперкалиевый (30 мМ К⁺) двумя противоположными реакциями – в одних волокнах калиевая деполяризация развивается (сопровождается падением амплитуды потенциала действия (ПД) и амплитуды и длительности следовой деполяризации), а в других – нет (амплитуда ПД достоверно не меняется, а амплитуда и длительность следовой деполяризации растут). В волокнах, в которых калиевая деполяризация наступала, добавление к гиперкалиевому раствору ТЭА вело к восстановлению сниженного избытком ионов калия ПД, увеличению амплитуды и длительности следовой деполяризации, а также значительному увеличению длительности посттетанической деполяризации.

Ключевые слова: избыток ионов калия, тетраэтиламмоний, калиевые каналы, миелинизированные нервные волокна, потенциал действия, *Rana ridibunda*

ACTION OF POTASSIUM CHANNEL BLOCKER TETRAETHYLAMMONIUM IN SITUATION OF POTASSIUM DEPOLARIZATION IN MEMBRANE OF AMPHIBIAN MYELINATED NERVE FIBRES

¹Kuznetzova I.V., ²Evstigneev D.A., ¹Gluhova N.V.

¹I.N. Ul'yanov State Pedagogical University of Ul'yanovsk, Ul'yanovsk,
e-mail: Cryptaciura@rambler.ru;

²Ul'yanovsk Higher Civil Aviation School, ul. Mozhayskogo, Ul'yanovsk, e-mail: temporaria@yandex.ru

The action of potassium channels blocker, tetraethylammonium (TEA), in case of potassium depolarization of the membrane, was investigated on amphibian myelinated nerve fibres (*Rana ridibunda* Pallas). Nerve fibres showed two completely different reactions to the potassium-rich solution (30 mM K⁺) substitution for normal Ringer solution (2,5 mM K⁺): the first type of fibres developed potassium depolarization (followed by decrease in action potential (AP) amplitude and decrease in depolarizing after-potential amplitude and duration), and the second type of fibres did not show such reaction (AP amplitude did not change significantly, and depolarizing after-potential amplitude and duration increased). In the fibres developing potassium depolarization, additional TEA treatment in potassium-rich solution restored the AP amplitude (previously decreased by potassium-rich solution), increased depolarizing after-potential amplitude and duration, and considerably increased the duration of post-tetanic depolarization.

Keywords: potassium-rich solution, tetraethylammonium, potassium channels, myelinated nerve fibres, action potential, *Rana ridibunda*

Феномен калиевой деполяризации состоит в том, что в результате замены нормального раствора Рингера на гиперкалиевый происходит снижение мембранного потенциала, что сопровождается падением амплитуды потенциала действия (ПД). Блокирование калиевых каналов тетраэтиламмонием (ТЭА) устраняет вызванную избытком калия деполяризацию мембраны – и это несмотря на то, что при обычной концентрации ионов калия в наружном растворе ТЭА сам деполяризует мембрану [5, 6, 7].

В экспериментах, проведённых на миелинизированных нервных волокнах амфибий [10], было показано, что добавление ТЭА в наружный раствор, содержащий 30–60 мМ КСl, ведёт к восстановлению сниженного избытком ионов калия мембранно-

го потенциала. Чуть позже [4] способность ТЭА восстанавливать сниженный гиперкалиевым раствором мембранный потенциал была подтверждена. Если сведения об уменьшении калиевой деполяризации под влиянием ТЭА в упомянутых работах [4, 10] были приведены, то относительно того, восстанавливалась ли под влиянием ТЭА генерация угнетённого гиперкалиевым раствором ПД, ничего не сказано. Этот пробел удалось устранить В.И. Беляеву и Б.И. Ходорову [1, 3], которые показали, что, помимо увеличения мембранного потенциала под влиянием ТЭА, в миелинизированных нервных волокнах амфибий происходит восстановление амплитуды ПД, до этого значительно уменьшенного гиперкалиевым раствором.

В экспериментах, проведённых на миелинизированных нервных волокнах амфибий [5], было установлено, что ТЭА приводил в нормальном растворе Рингера (концентрация ионов калия 2,5 мМ) к деполяризации мембраны вплоть до 8 мВ. В деполяризованных же с помощью гиперкалиевого (концентрация ионов калия от 10 до 117 мМ) раствора волокнах ТЭА смещал мембранный потенциал в противоположном направлении – вызывал гиперполяризацию мембраны приблизительно на 10 мВ.

В работе, выполненной на пучках миелинизированных нервных волокон амфибий *Rana esculenta* [6], установлено следующее. Если наружный раствор содержал от 0 до 2,5 мМ KCl, ТЭА приводил к деполяризации мембраны на 1–2,5 мВ, в то время как при концентрации ионов калия более 5 мМ ТЭА производил обратный эффект – происходила гиперполяризация (примерно на 10 мВ) мембраны. В работе, выполненной на одиночных миелинизированных нервных волокнах амфибий *Rana esculenta* и *Xenopus laevis* [7], показано, что ТЭА вызывает снижение мембранного потенциала в среднем на 5 мВ. В сенсорных волокнах степень деполяризации мембраны под влиянием ТЭА была меньше таковой моторных волокон. Добавление к раствору Рингера ТЭА вело к деполяризации мембраны, но если мембрану предварительно деполяризовали гиперкалиевым раствором, то ТЭА уменьшал эту деполяризацию в среднем на 7–15 мВ.

Различные нервные волокна по-разному реагируют на повышение концентрации ионов калия в среде [8, 9]. Разная чувствительность нервных волокон к калиевой деполяризации связывалась [8, 9] с тем, насколько хорошо были отпрепарированы волокна: в неповреждённых нервных волокнах увеличение концентрации ионов калия до 20 мМ приводило к небольшой и медленно нарастающей деполяризации, тогда как у плохо отпрепарированных волокон деполяризация возникала мгновенно, достигая уровня теоретического калиевого равновесного потенциала. По мнению автора [9], именно устойчивые к калиевой деполяризации волокна находятся в подобном *in vivo* состоянии.

В процессе изучения электрогенеза миелинизированных нервных волокон амфибий нами обнаружено два вида реакций волокон на избыток ионов калия в среде: в одних волокнах калиевая деполяризация развивается, а в других – нет. Представляется важным выявить, каким образом будет действовать блокатор калиевых каналов ТЭА в гиперкалиевой среде при ритмическом раз-

дражении нервных волокон, реагирующих на избыток ионов калия деполяризацией мембраны, сведения о чём в литературе отсутствуют. Важность определения особенностей действия ТЭА в гиперкалиевой среде именно при ритмическом раздражении нервных волокон продиктована тем, что в процессе ритмической стимуляции можно проследить возможность суммирования следов от каждого одиночного нервного импульса – то есть смоделировать ситуацию, когда нервное волокно генерирует не один, а пачку нервных импульсов.

Материал и методы исследования

Эксперименты ($n = 22$) проводили на одиночных миелинизированных нервных волокнах седалищного нерва озёрной лягушки *Rana ridibunda* Pallas. Препаровку нервного волокна производили таким образом, что изолировали лишь интернодальную часть волокна, а перехват Ранвье, от которого в последующем отводили ПД, оставляли в нервном стволе. Подробное описание методики проведения экспериментов дано ранее [2]. О наступлении калиевой деполяризации в настоящей работе судили по уменьшению амплитуды ПД, а о её устранении – по увеличению амплитуды ПД. Судить о наступлении калиевой деполяризации по амплитуде ПД нам позволили данные В.И. Беляева, Б.И. Ходорова [1, 3], которые установили параллелизм между изменениями потенциала покоя и амплитуды ПД: в гиперкалиевом растворе под влиянием ТЭА происходило как увеличение амплитуды ПД, так и восстановление исходного потенциала покоя. Раствор Рингера, использованный в экспериментах, имел следующий состав (в мМ): NaCl – 111; KCl – 2,5; CaCl₂ – 1,95; NaHCO₃ – 1,2; HEPES («Sigma», США) – 10; pH 7,3. Эксперименты проводили при температуре 17–22 °С. Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием критерия Стьюдента. Как и в предыдущей нашей работе, касающейся действия ТЭА в нормальном растворе Рингера [2], ТЭА («Sigma», США) использовался в концентрации 10 мМ. Гиперкалиевый раствор Рингера получали путём замены 30 мМ NaCl на такое же количество KCl.

Результаты исследования и их обсуждение

В ответ на приложение к нервному волокну одиночного деполяризующего стимула возникал ПД, сопровождающийся хорошо выраженной следовой деполяризацией (СД), амплитуда и длительность которой составили в среднем $2,12 \pm 0,64$ мВ и $175,27 \pm 39,12$ мс соответственно. Замена нормального раствора Рингера, содержащего 2,5 мМ K⁺, на гиперкалиевый (30 мМ K⁺) раствор вела к двум совершенно различным реакциям. В первом случае нервные волокна реагировали на повышение концентрации ионов калия в растворе падением амплитуды ПД и СД (35% случаев), тогда как во втором случае амплитуда ПД достоверно не изменялась, а амплитуда СД суще-

ственно росла (65% случаев). Итак, если в первом случае СД как по своей амплитуде, так и длительности уменьшалась (рис. 1, а), то во втором случае СД значительно увеличивалась (рис. 1, б). То, каким образом нервные волокна реагировали на избыток калия, зависело от исходного состояния

волокна. В нормальном растворе Рингера амплитуда ПД нервных волокон, реагирующих на гиперкалиевый раствор по первому типу, составила $60,13 \pm 16,64$ мВ, тогда как у волокон, реагирующих по второму типу, она была равной $85,36 \pm 11,87$ мВ (различие статистически достоверно, $p < 0,05$).

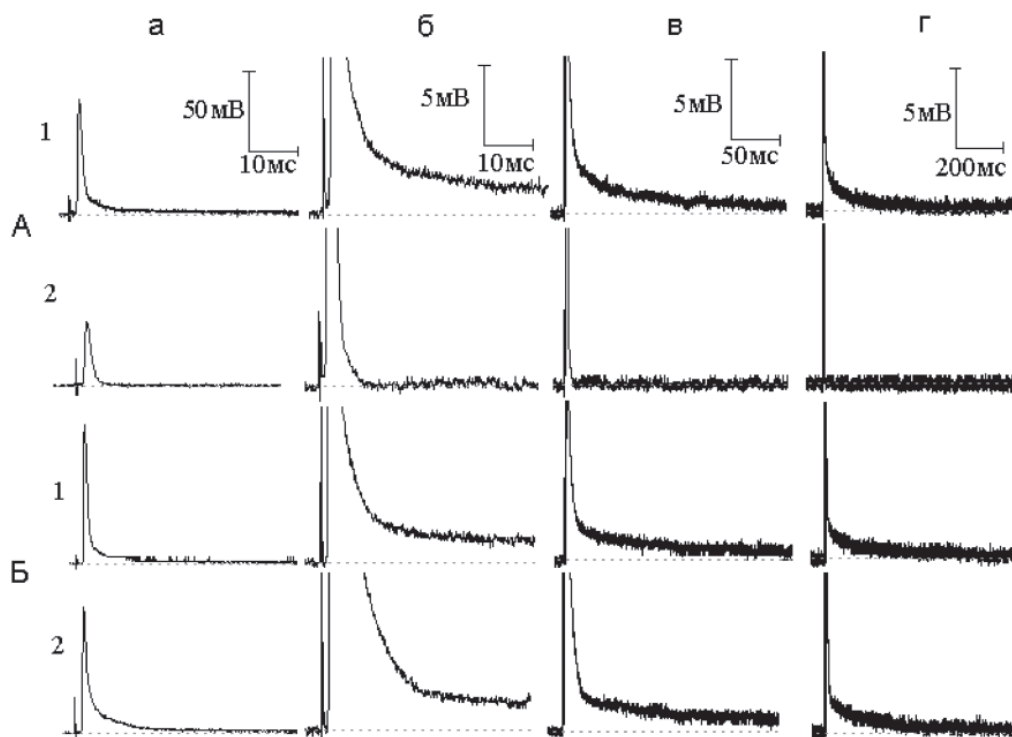


Рис. 1. Различные типы реакций миелинизированных нервных волокон на повышение концентрации ионов калия в наружном растворе с 2,5 до 30 мМ:

А – уменьшение следовой деполяризации (СД) под влиянием гиперкалиевого раствора.

1 – потенциал действия – ПД (а) и СД (б – г) в нормальном растворе Рингера. 2 – то же спустя три минуты после замены нормального раствора Рингера на гиперкалиевый. Б – увеличение СД под действием гиперкалиевого раствора. 1 – ПД (а) и СД (б – г) в нормальном растворе Рингера. 2 – то же спустя четыре минуты после замены нормального раствора Рингера на гиперкалиевый

Калиевая деполяризация изучалась на тех волокнах, которые отвечали на избыток ионов калия в среде подавлением ПД. Эксперимент, в котором замена нормального раствора Рингера на гиперкалиевый привела к калиевой деполяризации, представлен на рис. 2 и 3. Рис. 2 иллюстрирует изменение амплитудно-временных характеристик ПД и СД при одиночном раздражении нервного волокна: избыток ионов калия привёл к уменьшению амплитуды ПД и СД, добавление же к гиперкалиевому раствору ТЭА вызвало восстановление ПД и значительное увеличение амплитуды и длительности СД. Увеличение амплитуды и длительности СД под влиянием ТЭА можно также наблюдать и в нормальном (2,5 мМ K^+) растворе Рингера [2].

На рис. 3 можно проследить изменения следовых потенциалов в этом эксперименте при ритмическом раздражении нервного волокна. Падение амплитуды ПД и уменьшение амплитуды и длительности СД, вызванное гиперкалиевым раствором, привело к тому, что суммация СД в ритмическом ряду была существенно уменьшена, а посттетаническая деполяризация (ПТД), представляющая собой замедленное возвращение мембранного потенциала к исходному уровню после прекращения ритмической стимуляции, практически исчезла. Добавление к гиперкалиевому раствору ТЭА вызвало увеличение как амплитуды деполяризационного плато, так и амплитуды и длительности ПТД.

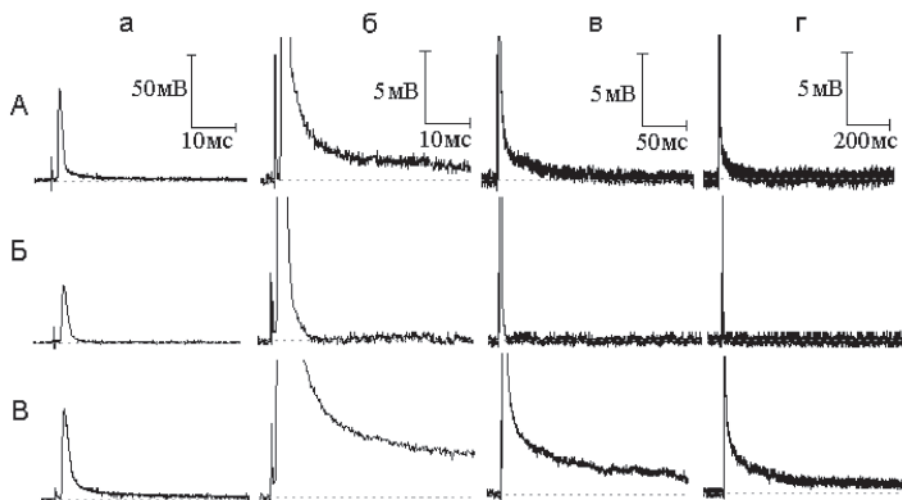


Рис. 2. Влияние, оказываемое тетраэтиламмонием на электрическую активность нервного волокна при одиночном раздражении в гиперкалиевом (30 мМ) растворе Рингера: А – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера. Б – то же через шесть минут действия гиперкалиевого раствора. В – то же через три минуты после добавления к гиперкалиевому раствору тетраэтиламмония

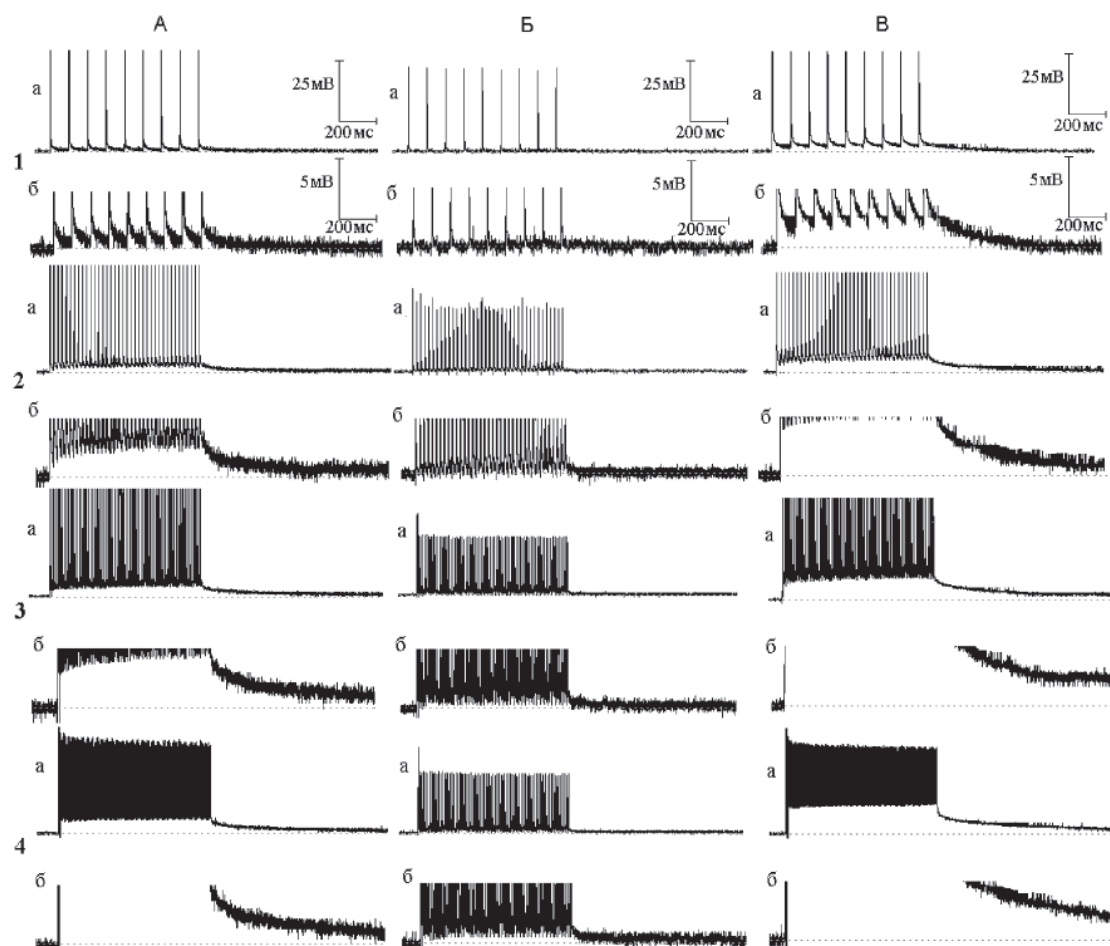


Рис. 3. Эффект совместного действия тетраэтиламмония (ТЭА) и гиперкалиевого (30 мМ) раствора Рингера на следовые потенциалы при ритмическом раздражении нервных волокон (тот же опыт, что и на рис. 2): А – следовые потенциалы при ритмической стимуляции нервного волокна частотой 10 (1), 50 (2), 100 (3) и 300 (4) Гц в нормальном растворе Рингера. Б – то же через шесть минут действия гиперкалиевого раствора. В – то же через три минуты после добавления к гиперкалиевому раствору ТЭА

Можно было бы подумать, что такое колоссальное увеличение длительности ПТД вызвано сугубо одним действием ТЭА, но это не так. Столь колоссального увеличения длительности ПТД добиться в экспериментах, в которых ТЭА действует в нормальном растворе Рингера, невозможно. При частоте раздражения 50 Гц длительность ПТД в растворе Рингера, содержащем 2,5 мМ K^+ и 10 мМ ТЭА, составила $0,45 \pm 0,12$ мс, в то время как в растворе, содержащем 30 мМ K^+ и 10 мМ ТЭА, в серии экспериментов с нервными волокнами, чувствительными к гиперкалиевому раствору, она составила $1,17 \pm 0,41$ мс (различия статистически достоверны, $p < 0,05$, $n = 7$). Чтобы изменения были столь велики, ТЭА должен действовать в гиперкали-

евом, а не в нормальном растворе Рингера. ПТД, регистрируемая при действии ТЭА в гиперкалиевой среде, напоминает ПТД, получаемую в гиперкалиевом растворе без ТЭА – и именно у тех нервных волокон, которые отвечают на избыток ионов калия в среде увеличением СД. Длительность ПТД в гиперкалиевом растворе в волокнах, не чувствительных к избытку ионов калия, при частоте раздражения 50 Гц составила $1,60 \pm 0,34$ мс. На рис. 4 и 5 приведены следовые потенциалы, получаемые у такого типа волокон при одиночном и ритмическом раздражении соответственно. Как можно видеть, характер изменения ПТД под влиянием избытка ионов калия (см. рис. 5) сходен с таковым в гиперкалиевой среде, содержащей ТЭА (рис. 3).

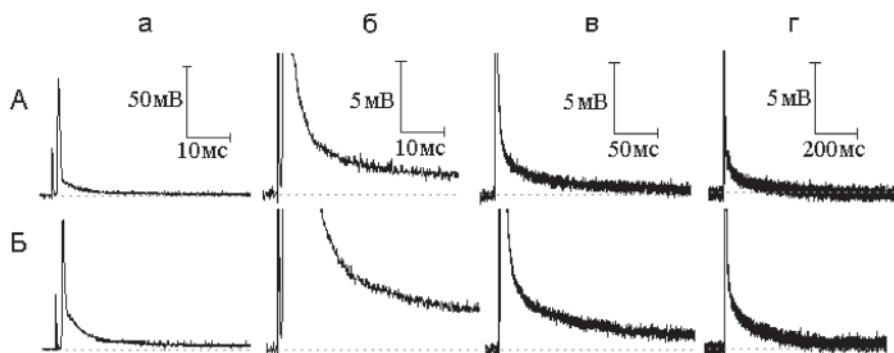


Рис. 4. Влияние, оказываемое гиперкалиевым (30 мМ) раствором на электрическую активность миелинизированного нервного волокна при одиночном раздражении:

А – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б – г) в нормальном растворе Рингера.
Б – то же через семь минут действия гиперкалиевого раствора

Тот факт, что в настоящей работе выявлено два типа реакций миелинизированных нервных волокон на повышение концентрации ионов калия, позволяет оценивать физиологическое состояние нервного проводника – калиевая деполяризация возникала в тех волокнах, амплитуда ПД которых колебалась в пределах от 30 до 80 мВ ($60,13 \pm 16,64$ мВ). Устойчивые к гиперкалиевому раствору волокна характеризовались амплитудой ПД в интервале от 71 до 106 мВ ($85,36 \pm 11,87$ мВ). Важно, что совершенно противоположная реакция волокон первого и второго типа указывает на то, что у неповрежденной мембраны имеется возможность сохранять потенциал покоя неизменным и предотвращать наступление калиевой деполяризации. Причину роста СД в гиперкалиевом растворе у неповрежденных нервных волокон мы видим в уменьшении концентрационного градиента для ионов калия на фоне отсутствия изменений потенциала покоя (либо сравнительно небольшого его изменения) мембраны волокна при повышении наруж-

ной концентрации ионов калия. В противоположность этому уменьшение потенциала покоя нервной мембраны должно вести как к падению амплитуды ПД, так и уменьшению величины СД.

Различные реакции нервных волокон на повышение концентрации ионов калия в среде согласуются с ранее известными исследованиями [8, 9], в которых развитие калиевой деполяризации зависело от состояния нервного волокна. В тех волокнах, которые находились в хорошем физиологическом состоянии, калиевая деполяризация развивалась медленно, тогда как в волокнах, находящихся в плохом состоянии, калиевая деполяризация развивалась стремительно.

Эксперименты, представленные в настоящей работе, позволили выявить особенности действия ТЭА в гиперкалиевом растворе. Гиперкалиевый раствор в отсутствие ТЭА приводит к двум совершенно различным реакциям. В волокнах, чувствительных к избытку ионов калия, гиперкалиевый раствор уменьшает величину СД, деполяриза-

ционного плато и ПТД. В нечувствительных к избытку ионов калия волокнах (у которых под влиянием гиперкалиевого раствора потенциал покоя либо совсем не изменяется, либо его изменения незначительны), СД, деполяризационное плато и ПТД в гиперкалиевом растворе значительно возрастают. Устраняя калиевую деполяризацию в чувствительных к избытку ионов калия волокнах (то есть восстанавливая исходный мембранный потенциал), ТЭА даёт возможность наблюдать увеличение следовых потенциалов, по характеру сходное с увеличением следовых потенциалов, наблюдаемых у нечувствительных к гиперкалиевому раствору волокон. Заметим, что ТЭА увеличивает следовые потенциалы посредством блокирования калиевых каналов, а гиперкалиевый раствор – посредством уменьшения концентрационного градиента для ионов калия. И гиперкалиевый раствор, и ТЭА в данном случае действуют однонаправлено – вы-

зывают увеличение следовых потенциалов, причём при их совместном действии возникает значительная трудность в разделении производимых ими эффектов. Мы столкнулись с тем, что в чувствительных к избытку ионов калия волокнах под влиянием ТЭА происходит значительное увеличение длительности ПТД, и это увеличение можно было бы ошибочно приписать только одному действию ТЭА. Имея в распоряжении информацию, что ТЭА в нормальном растворе Рингера производит не столь значительное увеличение ПТД, нами намеренно поставлены эксперименты в гиперкалиевой среде без ТЭА в волокнах, не чувствительных к калиевой деполяризации. Именно эти эксперименты позволили отделить увеличение ПТД, производимое ТЭА, от такового, производимого гиперкалиевым раствором. Стало ясно, что столь значительное увеличение ПТД под влиянием ТЭА можно получить лишь в гиперкалиевой среде.

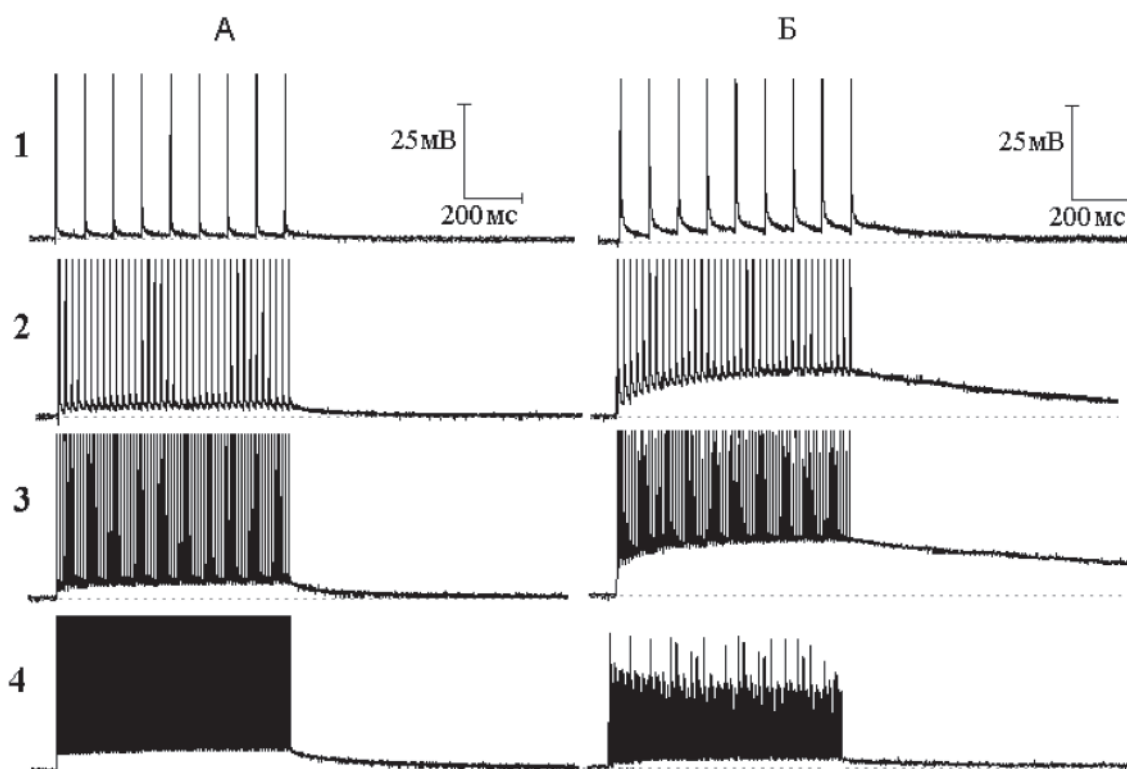


Рис. 5. Влияние гиперкалиевого (30 мМ) раствора на следовые потенциалы при ритмическом раздражении нервного волокна (тот же опыт, что на рис. 4):
 А – следовые потенциалы при ритмической стимуляции нервного волокна частотой 10 (1), 50 (2), 100 (3) и 300 (4) Гц в нормальном растворе Рингера. Б – то же через семь минут после замены нормального раствора Рингера на гиперкалиевый

Блокаторы калиевых каналов, предотвращая движение ионов калия через мембрану, способствуют восстановлению сниженного гиперкалиевым раствором мембранного потенциала. Поскольку про-

водящих каналов под влиянием блокаторов становится меньше, значит меньшее количество каналов будет участвовать в установлении новой разности потенциалов на мембране при повышении концентрации

ионов калия – то есть снижение мембранного потенциала будет замедляться.

Выводы

1. Миелинизированные нервные волокна амфибий отвечают на замену нормального раствора Рингера ($2,5 \text{ mM K}^+$) на гиперкалиевый (30 mM K^+) двумя совершенно противоположными реакциями. В первом случае происходит падение амплитуды ПД и сопровождающее это уменьшение амплитуды и длительности СД, во втором же случае амплитуда ПД достоверно не изменяется, а амплитуда и длительность СД растут.

2. В волокнах, чувствительных к избытку ионов калия, гиперкалиевый раствор уменьшает величину СД, деполяризационного плато и ПТД. В нечувствительных к избытку ионов калия волокнах (у которых под влиянием гиперкалиевого раствора потенциал покоя либо совсем не изменяется, либо его изменения незначительны), СД, деполяризационное плато и ПТД в гиперкалиевом растворе значительно возрастают.

3. В тех волокнах, в которых в гиперкалиевом растворе наблюдается калиевая деполяризация (снижение амплитуды ПД), введение в гиперкалиевый раствор ТЭА (10 mM) ведёт к восстановлению сниженно-го избытком ионов калия ПД, а также увеличению амплитуды и длительности СД.

4. Добавление к гиперкалиевому раствору ТЭА вызывает значительное увеличение длительности ПТД, получаемой при ритмическом раздражении нервных волокон, чувствительных к избытку ионов калия. Чтобы изменения были столь велики, ТЭА должен действовать в гиперкалиевом, а не в нормальном растворе Рингера. Устраняя калиевую деполяризацию в чувствительных к избытку ионов калия волокнах, ТЭА даёт возможность наблюдать увеличение следовых потенциалов, характерное для нечувствительных к гиперкалиевому раствору волокон, проявляющих увеличение следовых потенциалов в гиперкалиевом растворе в отсутствие ТЭА.

Список литературы

1. Беляев В.И. Сопоставление изменений электрической активности одиночного перехвата Ранвье при повышении концентрации ионов калия в среде и действии новокаина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1964. – № 12. – С. 13–17.
2. Изменение электрогенеза миелинизированных нервных волокон амфибий под действием тетраэтиламмония / И.В. Кузнецова, Д.А. Евстигнеев, Н.В. Глухова, В.П. Глухов // Современные наукоемкие технологии. – 2008. – № 2. – С. 22–29.
3. Ходоров Б.И., Беляев В.И. Физиологический электротон одиночного перехвата Ранвье в условиях воздействия ионов тетраэтиламмония // Биофизика клетки. – М.: Наука, 1965. – С. 159–174.
4. Lüttgau H.C. Das Kalium-Transportsystem am Ranvier-Knoten isolierter markhaltiger Nervenfasern // Pflügers Archiv. – 1960. – Vol. 271. – P. 613–633.
5. Schmidt H. Zur Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid (TEA) auf das Membranpotential markhaltiger Nervenfasern // Pflügers Archiv. – 1963. – Vol. 278. – P. R4–R5.
6. Schmidt H. Die Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid auf das Membranpotential und den Membranwiderstand von Bündeln markhaltiger Nervenfasern // Pflügers Archiv. – 1965. – Vol. 282. – P. 351–361.
7. Schmidt H., Stämpfli R. Die Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid auf den einzelnen Ranvierschen Schnürring // Pflügers Archiv. – 1966. – Vol. 287. – P. 311–325.
8. Stämpfli R. Die Strom-Spannungs-Charakteristik der erregbaren Membran eines einzelnen Schnürrings und ihre Abhängigkeit von der Ionenkonzentration // Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta. – 1958. – Vol. 16. – P. 127–145.
9. Stämpfli R. Is the resting potential of Ranvier nodes a potassium potential? // Annals New York Academy of Sciences. – 1959. – Vol. 81. – P. 265–284.
10. Tasaki I. Demonstration of two stable states of the nerve membrane in potassium-rich media // J. Physiol. – 1959. – Vol. 148. – P. 306–331.

Рецензенты:

Песков А.Б., д.м.н., профессор, декан факультета постдипломного, дополнительного и высшего сестринского образования института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск;

Русанов А.М., д.б.н., профессор, декан химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, г. Оренбург.