

К. В. КАЗАРЯН, С. М. МАРТИРОСОВ

## ВЕЛИЧИНЫ МЕМБРАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В МЕТОДЕ «САХАРОЗНОГО МОСТА»

Метод «сахарозного моста» [1, 3, 5] получил широкое применение в электрофизиологии гладкой мускулатуры, размеры клеток которой очень малы и затрудняют применение внутриклеточной микроэлектродной техники. Однако, наряду с такими преимуществами, как возможность длительного наблюдения за биоэлектрической активностью гладкомышечных клеток, а также возможность продолжительных воздействий различных веществ и ионов на величину мембранного потенциала (МП), этот метод было трудно использовать для количественной оценки МП из-за определенных недостатков самого метода—фактора «короткого замыкания» и диффузионных потенциалов, влияющих на его величину.

*Материал и методика.* Эксперименты были проведены на полосках гладкомышечных клеток кольцевых мышц желудка лягушки, а также на их моделях. Последние представляли собой плотный нитяной жгут, размеры и форма которого аналогичны мышечной полоске.

Исследование потенциалов проводилось методом «сахарозного моста». Электрическая цепь включала рН-метр типа ЛПУ-01 в качестве усилителя биопотенциалов, а также самопишущий электронный потенциометр типа ЭПП-09. Потенциалы регистрировались с помощью хлорсеребряных электродов, введенных в солевые мосты (3М КСl на агаре).

Экспериментальные растворы были приготовлены на основе хлорных и сульфатных растворов Рингера следующих составов (в мМ): 1. КСl—2,5; NaCl—115; CaCl<sub>2</sub>—1,8; NaHCO<sub>3</sub>—2,4; 2. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>—1,2; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>—57,5; CaSO<sub>4</sub>—8, NaHCO<sub>3</sub>—2,4; сахароза—48,1. Тоничность растворов оставалась постоянной.

Измерение сопротивлений определенных участков цепи проводилось с помощью катодного вольтметра типа А4-М2.

*Результаты и обсуждение.* Возникновение «короткозамыкающего фактора», обусловленного частичным прохождением тока по межклеточной жидкости, наглядно можно представить при анализе метода «сахарозного моста». Согласно схеме, представленной на рис. 1, мышечная полоска помещается в горизонтальную часть Т-образной трубки плексигласовой камеры, омываемой раствором сахарозы. Концы препарата вводятся в вертикальные отсеки, через которые пропускаются соответствующие электролиты. С помощью электродов, контактируемых с концами мышечной полоски, регистрируется разность МП, поскольку наличие высокоомного раствора сахарозы сводит к минимуму возможность

короткого замыкания между электродами. В такой системе ток проходит по цепи: фоновый раствор—мышца—тестирующий раствор.

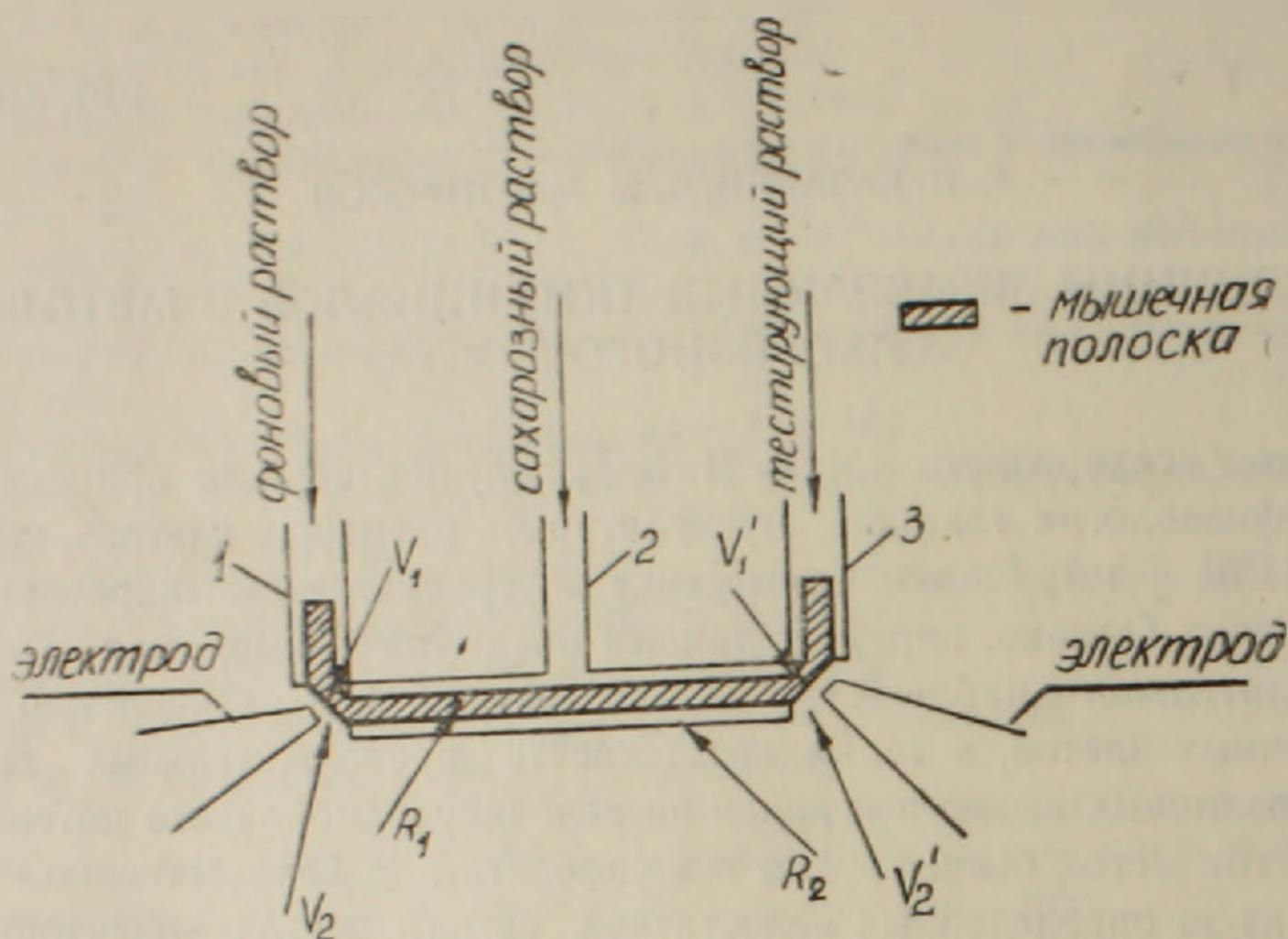


Рис. 1. Схема распределений ЭДС и сопротивлений в каналах камеры с мышечной полоской. 1, 2, 3—каналы I, II и III отсеков;  $V_1'$  и  $V_1$ —мембранные потенциалы на концах мышечной полоски;  $V_2'$  и  $V_2$ —диффузионные потенциалы в области контакта растворов: фоновый—сахарозный и тестирующий—сахарозный;  $R_1$ —сопротивление через мышечную полоску;  $R_2$ —сопротивление через сахарозу.

Эквивалентная электрическая схема измерений (рис. 2) позволяет установить величину погрешности, вносимой диффузионными потенциалами. Последние, обусловленные градиентом концентрации в растворе и неодинаковыми подвижностями ионов электролита в методе «сахарозного моста» возникают на границах: фоновый раствор—сахароза ( $V_2$ ) и сахароза—тестирующий раствор ( $V_2'$ ).

В настоящей работе предложены и проведены модельные эксперименты для оценки влияния указанных погрешностей на истинную величину мембранного потенциала.

Согласно схеме (рис. 2), ток в цепи определяется следующим выражением:

$$J = \frac{\Delta V_1 - \Delta V_2}{R_1 + R_2} \quad (1)$$

В этом случае регистрируемую разность потенциалов можно представить в виде:

$$V_{аб} = \frac{\Delta V_1 - \Delta V_2}{R_1 + R_2} \cdot R_1 + \Delta V_2 \quad (2)$$

Рассмотрим три различных случая соотношений между  $R_1$  и  $R_2$  и соответственно для каждого случая  $V_{аб}$ :

$$R_2 \ll R_1$$

$$V_{a\delta} = \lim_{R_2 \rightarrow 0} \left[ \frac{\Delta V_1 - \Delta V_2 \cdot R_2}{R_1 - R_2} + \Delta V_2 \right] = \Delta V_2 \quad (3)$$

$$R_2 = R_1$$

$$V_{a\delta} = - \frac{\Delta V_1 - \Delta V_2}{2} \quad (4)$$

$$R_2 \gg R_1$$

$$V_{a\delta} = \Delta V_1 \quad (5)$$

Таким образом, регистрируемая разность потенциалов определяется соотношением между сопротивлениями через сахарозу ( $R_2$ ) и ткань ( $R$ ).

В зависимости от применяемого варианта метода «сахарозного моста», а также от выбора объекта соотношения между сопротивлениями через мышечную полоску и сахарозу могут быть разными. В нашем случае для удобства измерялись отдельно как общее сопротивление цепи, состоящего из параллельно соединенных  $R_1$  и  $R_2$  (рис. 2, сопротивление на концах а-б), так и только  $R_2$ .

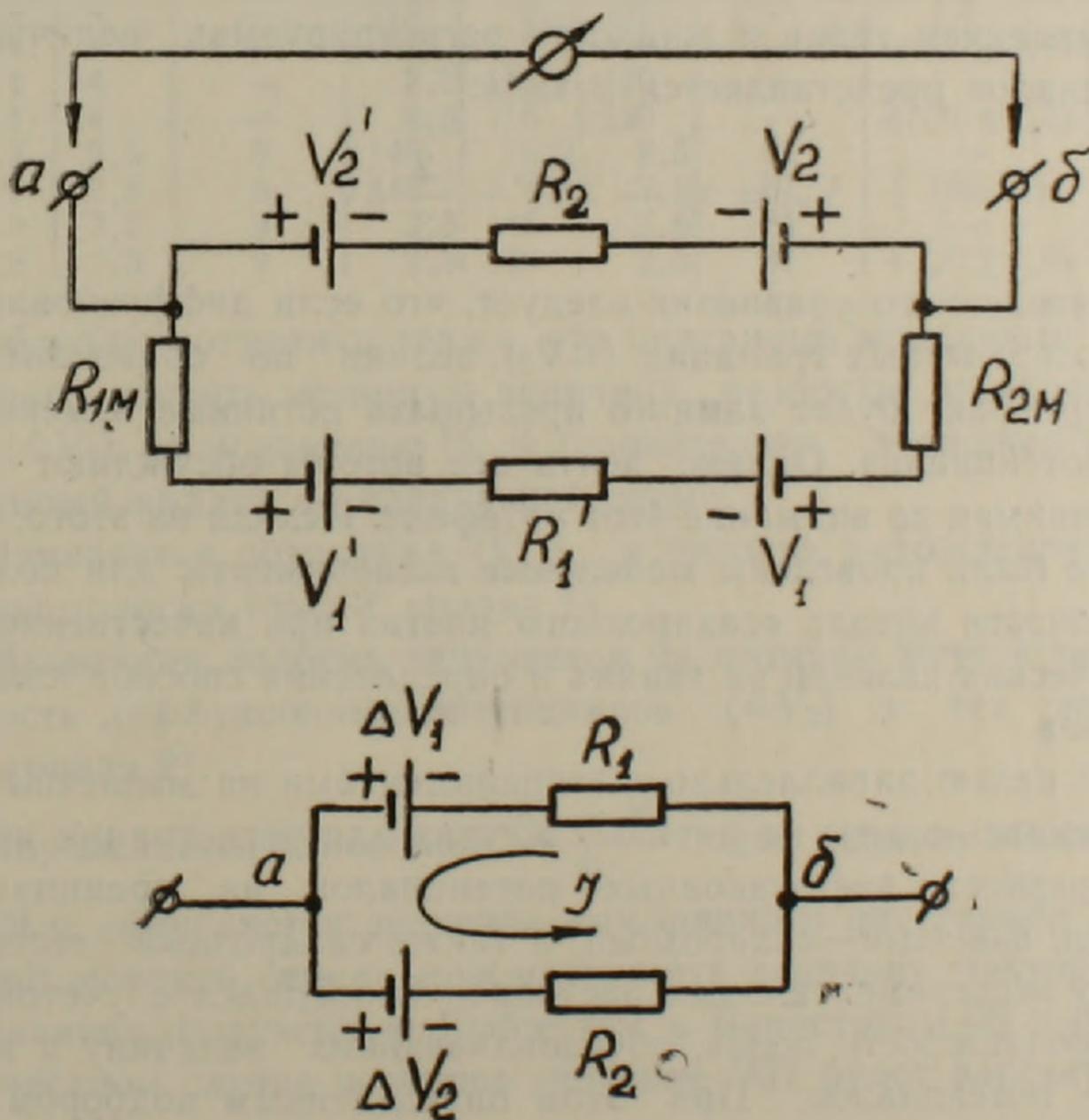


Рис. 2. Эквивалентные электрические схемы распределения ЭДС и сопротивлений в каналах камеры с мышечной полоской.  $I$  — ток в цепи;  $R_{1M}$  и  $R_{2M}$  — мембранные сопротивления на концах мышечной полоски;  $R'_1$  — сопротивление внутриклеточной среды;  $\Delta V_1 = V'_1 - V_1$ ;  $\Delta V_2 = V'_2 - V_2$ ;  
 $R_1 = R_{1M} + R_{2M} + R'_1$ .

В первом случае измеряемая величина представляла собой сопротивление вдоль системы, находящейся между концами мышечной полоски, омываемой по краям электролитами, а в центральной части—сахарозным раствором.

Для определения же сопротивления без ткани ( $R_2$ ) изготовлялась нитяная модель. После помещения в камеру жгут пропитывался всеми тремя растворами. Поэтому измеряемое сопротивление соответствующего участка, как и в случае определения общего сопротивления, представляло собой  $R_2$ .

Для каждого случая были получены соответственно следующие величины:  $(13 \pm 5,5) \cdot 10^5 \Omega$  и  $(12,5 \pm 6,4) \cdot 10^5 \Omega$ .

Поскольку измеряемые величины сопротивлений оказались почти одинаковыми, могла возникнуть возможность замыкания тока только через жидкость. Отсюда мы вправе заключить, что сам по себе метод может быть полностью ошибочным. Учитывая полученную нами погрешность, можно ожидать, что различие в 2—3 раза между общим сопротивлением и сопротивлением через жидкость трудно зафиксировать. Поэтому создается видимость, что через ткань сопротивление намного больше, чем через сахарозу. Ранее Беннетт и Барнсток [2] показали, что разница между ними не превышает двух. Для такого соотношения между сопротивлением ткани и жидкости регистрируемая величина разности потенциалов представляется в виде:

$$V_{аб} = \approx \frac{1}{3} \Delta V_2 + \frac{2}{3} \Delta V_1. \quad (6)$$

Из приведенного уравнения следует, что если диффузионные потенциалы на жидкостных границах ( $\Delta V_2$ ) велики по сравнению с МП ( $\Delta V_1$ ), то артефакт будет намного превышать истинные изменения мембранных потенциалов. Однако почти все авторы обсуждают значения МП, не принимая во внимание этот артефакт. Исходя из этого, в настоящей работе были проведены модельные эксперименты для подтверждения пригодности метода «сахарозного моста» при качественном анализе электрических явлений на тканях и определения способа количественного анализа.

С этой целью параллельно с экспериментами на мышечных полосках проводились опыты на нитяных жгутах для регистрации при тех же условиях разности диффузионных потенциалов на границах между растворами: фоновый—сахарозный, а также сахарозный—тестирующий.

Выбор экспериментальных растворов проводился с учетом концентрации и подвижности ионов, обуславливающих величину и знак диффузионных потенциалов. При этом определенным подбором экспериментальных растворов удалось зарегистрировать разность жидкостных пограничных потенциалов, совпадающую с теоретически предсказываемой хотя бы своим знаком. Условия проведения опытов определялись таким образом, чтобы выбранные растворы для случая с мышцей позволили измерить потенциалы как отличные, так и совпадающие сво-

ей полярностью с потенциалами модельных экспериментов. Сравнение результатов в том и другом случаях поможет убедиться в правомерности применяемого метода для количественного анализа и определить степень влияния диффузионных потенциалов на регистрируемые величины.

Результаты таких опытов (таблица) свидетельствуют о том, что в случае с мышцей измеряемая разность потенциалов либо выше по абсолютной величине, либо другого знака, чем при тех же условиях, но при наличии в камере нитяного жгута. Таким образом, очевидна возможность качественного анализа измеряемых величин потенциалов методом «сахарозного моста».

Таблица  
Величины разностей потенциалов, зарегистрированных при нахождении в камере как мышечной полоски, так и нитяного жгута, омываемых одними и теми же экспериментальными растворами

Состав фоновых растворов, мг-ион/л				Состав тестирующих растворов, мг-ион/л				$V_{аб}$ , мВ	$\Delta V_2$ , мВ
$K^+$	$Na^+$	$Cl^-$	$SO_4^{2-}$	$K^+$	$Na^+$	$Cl^-$	$SO_4^{2-}$		
2,5	2,4	4	—	117	2,4	120	—	—	$+(16 \pm 2,2)$
2,5	2,4	4	—	117	2,4	120	—	$+(35 \pm 3,4)$	—
2,5	2,4	4	—	2,5	116	120	—	—	$-(8 \pm 2,0)$
2,5	2,4	4	—	2,5	116	120	—	$+(16 \pm 2,3)$	—
2,5	4,9	2,5	9	146	4,9	2,5	81	—	$+(18 \pm 1,5)$
2,5	4,9	2,5	9	146	4,9	2,5	81	$+(55 \pm 2)$	—
2,5	4,9	2,5	9	2,5	148	2,5	81	—	$+(6 \pm 1,5)$
2,5	4,9	2,5	9	2,5	148	2,5	81	$+(21 \pm 1,0)$	—

Необходимо отметить также, что описанные модельные эксперименты позволят оценить истинную величину разности мембранных потенциалов ( $\Delta V_1$ ) по уравнению [6]. Следовательно, возможен также и количественный анализ по следующей схеме:

1. Измеряется потенциал ( $V_{аб}$ ) в условии нахождения в камере мышечной полоски (рис. 3, кривая 1).

2. Мышечная полоска заменяется на нитяной жгут и регистрируется разность диффузионных потенциалов ( $\Delta V_2$ ) в тех же условиях (рис. 3, кривая 2).

3. Определяется отношение  $\frac{R_1 + R_2}{R_2}$  для данного объекта по уравнению [3] и вычисляется значение мембранного потенциала ( $\Delta V_1$ ). Для *taenia coli* морской свинки можно принять величину фактора «короткого замыкания», полученную Беннеттом и Барнстоком [2] и равную 1,55. В этом частном случае истинное значение МП будет рассчитываться по уравнению [6].

Данные проведенных экспериментов показывают, что метод «сахарозного моста» является приемлемым для качественного анализа результатов измеренных мембранных потенциалов гладкомышечных клеток кольцевых мышц желудка лягушки. При этом следует учесть, что он

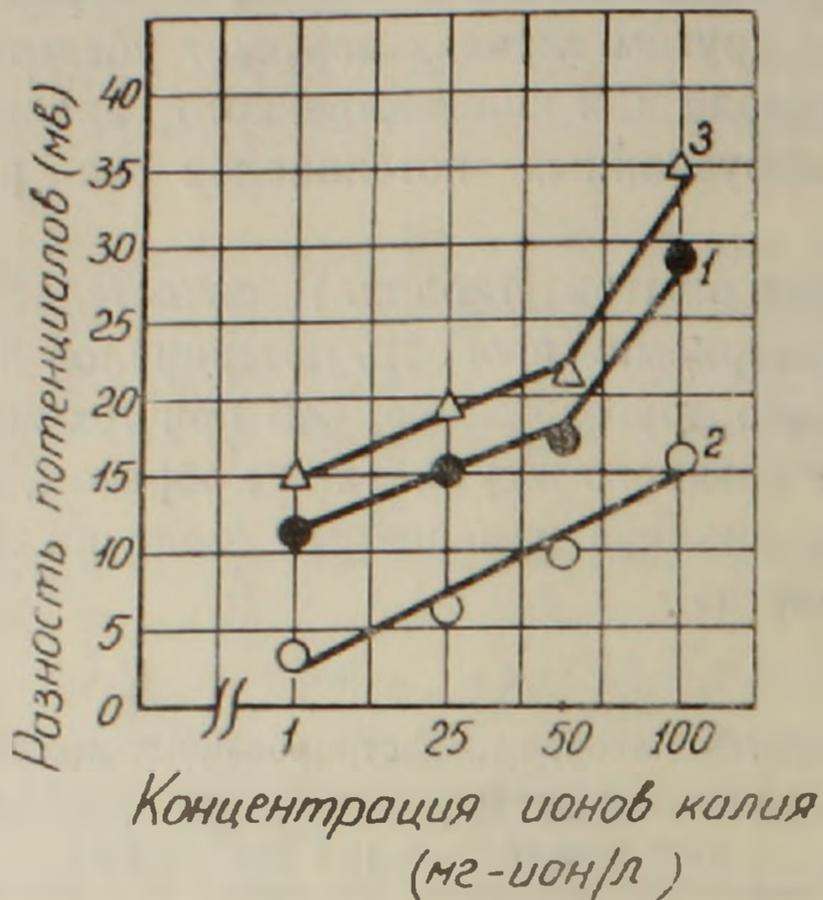


Рис. 3. Зависимость разности потенциалов от концентрации ионов  $K^+$  в тестирующем растворе. 1. Регистрируемая разность мембранных потенциалов; 2. Разность диффузионных потенциалов; 3. Истинная разность мембранных потенциалов (принимается величина фактора «короткого замыкания», равная 1,55). Ось абсцисс в логарифмической шкале. Стандартные ошибки от 15—18 измерений не превышают 1 мВ.

вносит довольно большую погрешность в количественные оценки, тем не менее имеется возможность и количественного анализа на основе предложенного в работе метода.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели  
АН АрССР

Поступило 21.XII 1974 г.

Բ. Վ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎ

ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼՆԵՐԻ ՄԵՆՍՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ «ՍԱԽԱՐՈՉԱՅԻՆ ԿԱՄՐՁԻ» ՄԵԹՈԴՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո Վ

Տիպարային փորձերի միջոցով ուսումնասիրվել է արտեֆակտերի ազդեցությունը «սախարոզային կամրջի» մեթոդում՝ «կարճ միացման» ֆակտորի և դիֆուզիոն պոտենցիալների ազդեցությունը գորտի ստամոքսի շրջանաձև մկանների հարթմկանային հյուսվածքների արձանագրվող մեծության մեմբրանային պոտենցիալների վրա:

Հաստատվել է, որ հիշյալ մեթոդը պիտանի է էլեկտրական երևույթների որակական գնահատման համար:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гуцин И. С., Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 62, 10, 120—122, 1966. -
2. Bennett M. R. Burnstock G. J. *Physiol.*, 183, 637—648, 1966.
3. Burnstock G., Straub R. W. *J. Physiol.*, 140, 156—167, 1958.
4. Jirounek P., Straub R. W. *Biophysical J.*, 11, 1971.
5. Stampfli R. A. *Experientia*, 10, 508—509, 1954.