



УДК 612.822.1

ДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ Ca^{2+} В ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

НИКИТИН В. П., САМОЯЛОВ М. О., ШЕРСТНЕВ В. В., МАПОРОВ В. Н.

Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва
Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

С помощью хлортетрациклинового зонда было исследовано соотношение биоэлектрической активности и динамики связывания Ca^{2+} в идентифицированных нейронах виноградной улитки. Обнаружено, что функционально неоднородные нейроны обладают разным содержанием связанного Ca^{2+} и неодинаковой динамикой его сродства. Наименьшее содержание связанного Ca^{2+} и наименее выраженная динамика его связывания выявлены в командных нейронах безусловного оборонительного рефлекса улиток: ЛПа3, ППа3, ЛПа2, ППа2. Более высокая интенсивность флуоресценции отмечена в клетках, имеющих другую функциональную принадлежность (мотонейроны). По характеру изменений флуоресценции и корреляции этих изменений с биоэлектрической активностью выявлены 3 типа волн связывания Ca^{2+} . Биологически активные вещества (сАМР и ангиотензин II) оказывали выраженное влияние на волны всех типов и на их корреляцию с биоэлектрической активностью. Обсуждены возможные молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе выявленных метаболических изменений.

В настоящее время не вызывает сомнения важное значение внутриклеточных метаболических процессов в осуществлении специфических функций нейронов [1, 2]. В связи с этим особый интерес вызывает корреляционное изучение динамики метаболических процессов и одновременно регистрируемой биоэлектрической активности идентифицированных нейронов. К немногим современным методам, позволяющим осуществлять такие исследования, относится прижизненная спектрофотометрия нейронов с отведением их биопотенциалов. На основе этой методики ранее нами были исследованы особенности связи биоэлектрической активности с динамикой окислительно-восстановительных процессов нейронов при подведении к ним биологически активных веществ [3].

Наряду с редокс-состоянием, другим важным показателем метаболической активности нейронов является динамика содержания связанных с компонентами внутриклеточных мембран ионов кальция (Ca_c^{2+}). С целью определения Ca_c^{2+} в исследуемых нейронах при одновременной регистрации их биоэлектрической активности был при-

менее способ спектрофотометрического флуоресцентного выявления Ca_c^{2+} с помощью хлортетрациклинового зонда. Этот метод широко используют для изучения метаболизма Ca_c^{2+} в эритроцитах, гепатоцитах [4, 5], а также в различных компонентах нейронов: митохондриях, синапсосомах, аксоне [5—9].

В задачу настоящей работы входило сравнительное определение величины и колебаний содержания Ca_c^{2+} в различных по функциональным свойствам нейронах моллюсков и окружающих их глиальных элементах и изучение динамики Ca_c^{2+} и биоэлектрической активности нейронов при воздействии на них некоторыми биологически активными веществами, регулирующими внутриклеточные процессы.

Материалы и методы

Опыты проводили на идентифицированных нейронах дорзальной поверхности изолированного подглоточного комплекса ганглиев виноградной улитки. Препарат НС улитки находился в камере, через которую осуществляли принудительный проток физиологического раствора для моллюсков [10]. Вне- и внутриклеточную регистрацию биоэлектрической активности и внеклеточную аппликацию биологически активных веществ осуществляли с помощью многоканальных капиллярных микроэлектродов, подводимых к нейронам под визуальным контролем.

Регистрирующей микроэлектрод заполняли 3 М КСl; сопротивление его кончика составляло 5—20 Мом. Инъекцию веществ проводили методом микропипетирования: сАМР (0,2 М, рН 7,4) («Sigma», США) подводили отрицательным током силой 60—80 нА в течение 2—4 мин, ангиотензин II (0,1 М, рН 5,0) («Sigma», США), подводили положительным током силой 60—80 нА в течение 3—5 мин. Биологически активные вещества аппликаровали так же в раствор, омывавший ганглий: сАМР—10⁻⁶ М, ангиотензин II—10⁻⁷ М.

сАМР был выбран нами для исследований в связи с тем, что обычно используемые для внеклеточных подведений его производные могут вызывать эффекты, отличные от действия сАМР, и, кроме того, установлено, что внеклеточные аппликации циклического нуклеотида вызывают специфические биологические эффекты, хотя и ослабленные, но принципиально схожие с теми, которые возникают при его введении внутрь клеток или в экспериментах, проводимых *in vitro*.

Отводимые от нейрона потенциалы регистрировали на двухлучевом осциллографе и быстродействующем чернилопишущем приборе НЗ27/5.

Перед экспериментом ганглий улитки в течение 30 мин окрашивали хлортетрациклином (10 мкМ) («Sigma», США).

Визуальную идентификацию и спектрофотометрию нейронов проводили с использованием люминисцентного микроскопа ЛЮМАМ КФ, в комплект которого входит микрофлуориметрическая приставка ФМЭЛ-1. Согласно некоторым рекомендациям [8, 9], с целью выявления Ca_c^{2+} окрашенные хлортетрациклином структуры возбуждали светом в области с максимумом 410 нм, а флуоресценцию регистрировали в области с максимумом 520 нм. В таких условиях выявляется флуоресценция комплексов, включающих хлортетрациклин и Ca_c^{2+} , связанные с компонентами внутриклеточных мембран [4, 6, 9]. По современным представлениям, компонентами мембран, связывающих Ca_c^{2+} , являющаяся преимущественно белковая молекула [11].

В проведенных исследованиях оптический сигнал, поступающий на ФМЭЛ-1, преобразовывали посредством ФЭУ-69 в электрический, который усиливали потенциометрическим усилителем У5-7 и регистрировали на самопишущем приборе типа КСП-4.

Всего было зарегистрировано и исследовано 43 нейрона.

Результаты и обсуждение

После окрашивания хлортетрациклином были выявлены отчетливые различия флуоресценции нейронов и глиальных элементов ганглия: интенсивность свечения глиальных клеток была в несколько раз выше, чем нейронов, расположенных рядом. Более высокое содержание меченого Ca^{2+} в глиальных клетках, по сравнению с нейронами, обнаружено также Lazarewicz и соавт. [12].

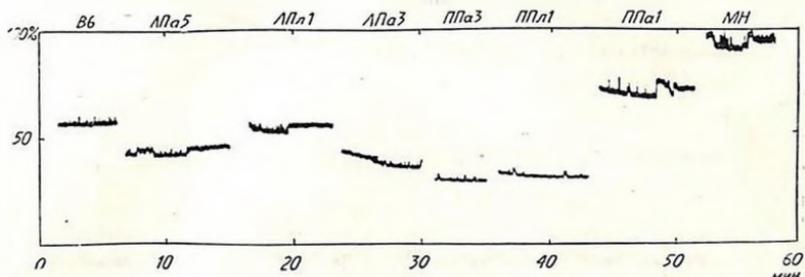


Рис. 1. Спектрофотометрия идентифицированных нейронов виноградной улитки, окрашенных хлортетрациклином. По оси абсцисс—время эксперимента в минутах; по оси ординат—условная шкала интенсивности флуоресценции в %. За 0 принят уровень флуоресценции неокрашенного препарата. Нейроны регистрировали в одном препарате.

При сравнительном исследовании интенсивности флуоресценции различных нейронов было обнаружено, что функционально неоднородные нейроны обладают разным содержанием Ca^{2+} и неодинаковой динамикой его сродства (рис. 1). Низкое содержание Ca^{2+} и наименее выраженная динамика его связывания были выявлены в командных нейронах безусловного оборонительного рефлекса улиток: ЛПа3, ППа3, ЛПа2, ППа2, ЛПл1, ППл1, В6 [13]. Внутри группы командных нейронов исследуемые показатели оказались также неоднородными: в нейронах ППа3 и ЛПа3 количество Ca^{2+} было относительно ниже, чем в остальных командных нейронах. Не совпадали характеристики симметричных нейронов: ППа3 и ЛПа3, ЛПл1 и ППл1.

Более высокая интенсивность флуоресценции хлортетрациклином, по сравнению с командными нейронами, была отмечена в клетке В4 и клетках группы Д [10]. Промежуточное положение занимали мотонейроны вегетативного ганглия [14], а также нейроны ППа1 и В6 [10].

По характеру изменений флуоресценции хлортетрациклином в корреляции с биоэлектрической активностью можно выделить три типа динамики связывания Ca^{2+} .

Волны порядка I—плавные изменения количества Ca^{2+} (в течение десятков минут), совпадавшие с медленными изменениями мембранного потенциала (рис. 2). Амплитуда этих волн могла достигать 30—40% от всего количества Ca^{2+} .

Волны II-их длительность была от десятков секунд до нескольких минут, амплитуда 2—4%. Нередко они характеризовались почти скачкообразным увеличением интенсивности флуоресценции, затем плато и относительно быстрым снижением до исходного уровня (рис. 2). Другие из них имели пирамидообразную или более сложную форму (рис. 1). Следует отметить наиболее важные особенности волн II-ого порядка. Во-первых, цикличность их возникновения—в ряде

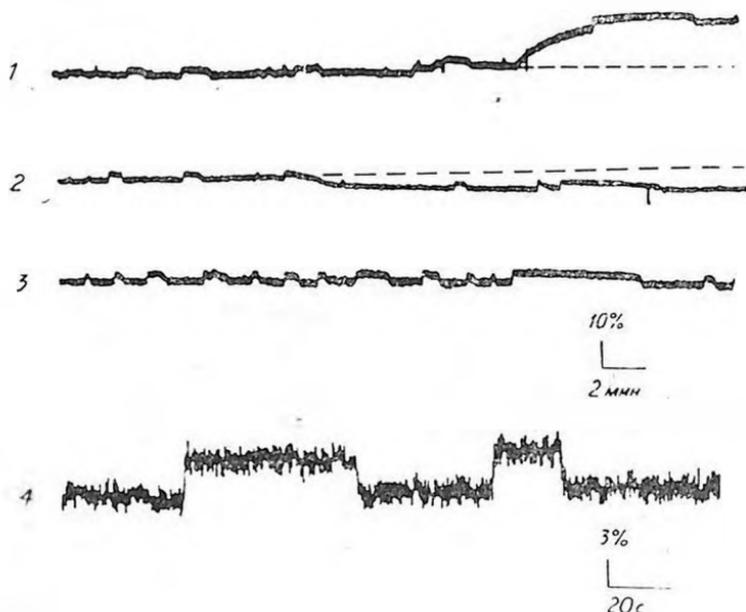


Рис. 2. Типы волн динамики связывания Ca^{2+} в нейронах. Волна порядка I в сторону увеличения (1, над пунктирной линией) и уменьшения (2, под пунктирной линией) содержания Ca_c^{2+} . Волны этого типа видны также на спектрофотометрических кривых 1 и 2. Две волны порядка II, а также волны порядка III, представляющие собой колебания на спектрофотометрической записи длительностью менее 1 сек. (4). По оси абсцисс—время эксперимента; по оси ординат—условная шкала интенсивности флуоресценции. За 100 % принят уровень флуоресценции окрашенного препарата по отношению к неокрашенному

случаев спонтанно или под воздействием биологически активных веществ отсутствовавшие или неупорядоченные волны II-ого порядка возникали через приблизительно равные промежутки времени, при этом они имели схожую конфигурацию и амплитуду (рис. 3). Отмечено совпадение волн II-ого порядка с осцилляциями мембранного потенциала, сопровождавших, в частности, пачечную активность нейронов (рис. 4). Наиболее отчетливая корреляция была выявлена с залповой активностью нейрона ППа1.

Волны III-го порядка—быстрые, в пределах 1с, колебания флуоресценции. Амплитуда колебаний была сравнима с амплитудой волн II-ого порядка (рис. 2). В некоторых случаях была обнаружена корреляция возрастания частоты волн III-го порядка с активацией или усилением пейсмекерных волн нейронов.

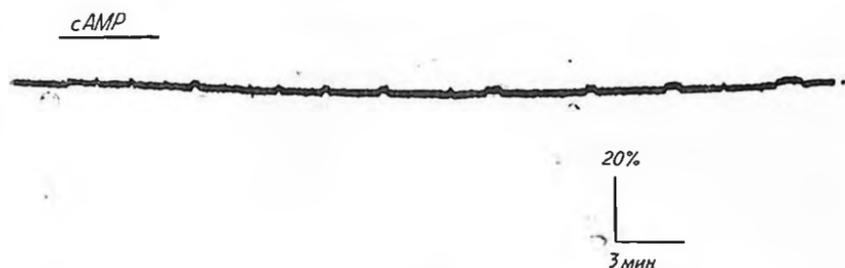


Рис. 3. Инициация сАМР волн порядка II у нейрона В7. Утолщенная линия—время микроинъекционного подведения сАМР. По оси абсцисс и ординат обозначения те же, что на рис. 2.

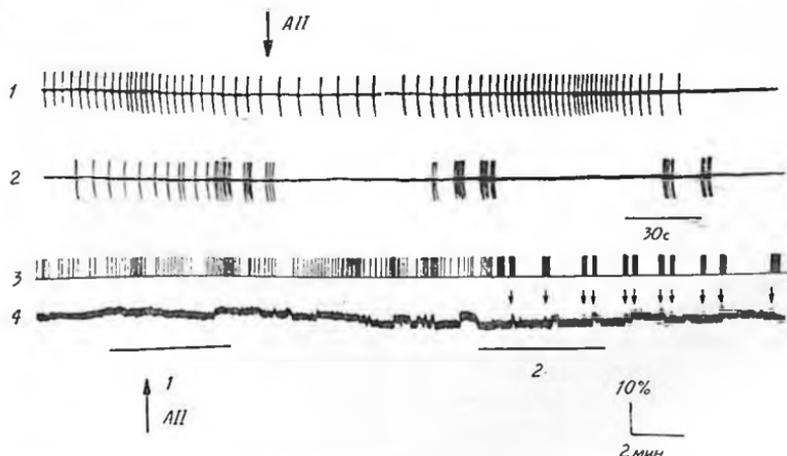


Рис. 4. Инициация ангиотензином II (А II) пачечной активности и волн порядка II у нейрона IIIa1. Исходная биоэлектрическая активность (внеклеточное отведение) и аппликация А II (отмечена стрелкой)—1. Продолжение записи нейронограммы через 10 мин—2. Схема нейронограммы—3, сопоставленная по времени со спектрофотометрической записью—4. Стрелками обозначены волны порядка II, совпадающие с пачками потенциалов действия. Утолщенные линии под спектрофотометрической кривой—сопоставленные по времени отрезки нейронограмм 1 и 2.

По оси абсцисс и ординат обозначения те же, что на рис. 2.

Описанные типы динамики содержания Ca^{2+} были обнаружены во всех исследованных нейронах. Однако степень их выраженности оказалась неодинаковой: наиболее выражены были волны выявленных типов у клеток, содержавших большее количество Ca^{2+} .

Биологически активные вещества оказывали значительное влияние на волны всех типов. Подведение сАМР обычно вызывало фазные изменения волны I-ого порядка с начальным уменьшением количества Ca_c^{2+} и последующей его стабилизацией, либо увеличением. Латентный период реакций составлял 1—2 мин, длительность—десятки минут и более. Действие сАМР сопровождалось также инициацией волны II-ого порядка (рис. 3). Во время подведения сАМР волны II-ого порядка возникали циклично, через равные промежутки времени, будучи схожими по конфигурации и амплитуде. После окончания аппликации цикличность нарушалась, волны становились изменчивыми по форме и амплитуде. Временные параметры описанных изменений совпадали с таковыми для волны I-ого порядка. В ряде случаев было отмечено возникавшее под влиянием сАМР учащение волны III-ого порядка.

В экспериментах отчетливо выявлялась способность сАМР к корреляции электрофизиологических и метаболических процессов нервных клеток. Это проявлялось в том, что сАМР либо инициировал волны различных порядков и соответствующие им изменения биоэлектрической активности, либо совмещал динамику обоих показателей в случае, если в исходной фоновой активности нейрона присутствовали осцилляции мембранного потенциала и колебания количества Ca_c^{2+} . После окончания подведения сАМР имевшая место корреляция между обоими показателями постепенно исчезала (в течение десятков минут и более).

Ангиотензин II вызывал метаболические и электрофизиологические перестройки активности нейронов, принципиально сходные с таковыми при действии сАМР. Существенное отличие заключалось в большей продолжительности латентных периодов реакций: в среднем они составляли 10—15 мин от начала подведения пептида. На рис. 4 представлены характерные реакции нейрона ППа1, вызванные подведением ангиотензина II. В фоновой активности нейрона регистрировались длинные, от десятков секунд до 1,5 мин, пачечные разряды, которые через 12—15 мин после начала подведения ангиотензина II преобразовывались в залповую активность с короткими пачками импульсов (несколько секунд). Одновременно возникали волны II-ого порядка, которые совпадали с пачечной активностью. Следует отметить, что до начала аппликации пептида также были зарегистрированы волны II-ого порядка, отличавшиеся от инициированных ангиотензином II как по форме, так и по амплитуде. Причем они возникали нерегулярно и, кроме того, отсутствовала их корреляция с биоэлектрической активностью.

Как следует из полученных нами результатов, каждый исследованный идентифицированный нейрон характеризовался определенным уровнем содержания Ca_c^{2+} . Вместе с тем, внутри группы функционально однородных нейронов были констатированы близкие количества Ca_c^{2+} , тогда как нейроны функционально различных групп характеризовались отчетливыми различиями.

Необходимо подчеркнуть наличие определенной динамики связывания Ca^{2+} , нашедшей отражение в виде волн трех порядков. Различия временных параметров и выраженности изменений дают основание предполагать существенную неоднородность характеризующих или метаболических процессов. Так, первый тип волн отличает относительно медленное и, как правило, выраженное изменение содержания Ca_i^{2+} . Развитие и латентные периоды реакций при действии биологически активных веществ, а также корреляция с медленными колебаниями мембранного потенциала у этого типа волн были сходны с исследованными нами ранее сдвигами редокс-систем в клетках [3]. Это дает основание полагать, что данные изменения, по-видимому, связаны с некоторыми базовыми метаболическими и энергетическими процессами, протекающими в нейронах.

При анализе волн II-ого порядка прежде всего обращают на себя внимание некоторые их характерные особенности: сходные по форме и амплитуде циклические колебания флуоресценции, возникавшие иногда спонтанно и значительно чаще под воздействием регуляторов внутриклеточных процессов. Наличие выраженных п-образных регуляторных сдвигов количества Ca_i^{2+} предполагает синхронное вовлечение в данный процесс достаточно большого количества компартментализованных надмолекулярных субстратов, сохранявшееся в течение десятков секунд. Одним из вероятных структурных компонентов таких комплексов могут быть микротрубочки и нейрофиламенты [15]. Имеются данные о цикличности процессов полимеризации-деполимеризации этих органелл [16], их зависимости от присутствия Ca^{2+} [16, 17], регуляции сборки посредством сАМР и кальмодулина [16, 18]. Кроме того, показано, что циклическое перераспределение Ca^{2+} происходит при активном захвате свободного Ca^{2+} гладким эндоплазматическим ретикулом, АТР-индуцируемом захвате Ca^{2+} митохондриями и Na^+ -зависимом пассивном высвобождении Ca^{2+} из митохондрий, связывании Ca^{2+} цитоплазматическими буферными системами, в том числе кальмодулином и белками группы S-100.

Интерпретация возможного механизма возникновения волн III-ого порядка затруднительна. Однако следует учитывать, что в некоторых случаях увеличение частоты этих волн совпадало с активацией пейсмекерных колебаний мембранного потенциала нейронов. В связи с этим представляют интерес данные Соколова [19] относительно вовлечения белков плазматической мембраны при активации пейсмекерных участков.

В настоящее время установлено, что в нейронах моллюсков Ca^{2+} могут вовлекаться в механизмы генерации биоэлектрической активности [20, 21]. Выдвигаются также предположения о том, что Ca^{2+} , проникающие через цитоплазматическую мембрану при спайковой активности, являются регуляторами внутриклеточных метаболических процессов [21, 22]. В этом плане привлекают внимание экспериментальные факты, полученные при исследовании нейрона ППа1. Показано, что в регуляции залповой активности этого нейрона исключи-

тельно важную роль играет внутриклеточное накопление Ca^{2+} во время залпов потенциалов действия [23, 24]. В наших экспериментах обнаружено, что в фоновой активности нейрона залпы потенциалов действия и изменения количества Ca_c^{2+} , как правило, не совпадали, и только воздействие сАМР или ангиотензина II приводило к согласованию залпов с волнами II-ого порядка.

Особо следует отметить, что в случаях совпадения сдвигов содержания Ca_c^{2+} и электрогенеза выявлялось опережающее изменение первого показателя. Это, по-видимому, свидетельствует о первичном возникновении в данных условиях именно метаболических перестроек по отношению к электрофизиологическим. Вместе с тем, относительная независимость обоих показателей свидетельствует, очевидно, о том, что данные метаболические перестройки являются скорее регуляторными, чем абсолютно необходимыми для процессов электрогенеза.

Согласно современным представлениям, Ca^{2+} участвуют в регуляции внутриклеточных процессов, необходимых для осуществления многих функций нейронов, таких как процессы дифференцировки [25], выделения и рецепции нейромедиаторов, гормонов [26], электрогенез [20, 21], регуляция активности ДНК [27], метаболизм системы циклических нуклеотидов [28] и др. Одним из основных универсальных внутриклеточных регуляторов является кальмодулин. Комплекс кальмодулина с Ca^{2+} активировывает ряд ферментов, в том числе и Ca^{2+} -зависимые протеникиназы, которые участвуют в реализации описанных выше Ca^{2+} -зависимых процессов.

Таким образом, проведенное исследование показывает перспективность использования методического подхода для выявления участия и роли метаболических процессов в обеспечении специфических функций нейронов, экспериментально дополняя современные данные о возможных Ca^{2+} -зависимых механизмах регуляции молекулярных процессов, лежащих в основе интегративной деятельности нервной клетки.

DYNAMICS OF Ca^{2+} BINDING IN THE NEURONS OF GARDEN SNAIL

NIKITIN V. P., SAMOILOV M. O., SHERSTNEV V. V., MAJOROV V. N.

P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, I. P. Pavlov Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Correlation between the bioelectric activity and dynamics of Ca^{2+} binding has been studied by means of chlortetracycline test. It was discovered that functionally different neurons contain both different amounts of bound Ca^{2+} and exert different affinity to it. Minimal amount and binding of Ca^{2+} was detected in snail neurons responsible for non-conditioned defensive reflex: LPa3, PPa3, LPa2, PPa2. A higher intensity of fluorescence of chlortetracycline- Ca^{2+} complex was detected in moto-

neurons. 3 types of Ca^{2+} -binding waves have been described on the basis of the correlation between fluorescence and bioelectric activity. Biologically active compounds (cAMP and angiotensin II) exert pronounced effect on the waves of all 3 types and their correlation with bioelectric activity. Possible mechanisms of these metabolic changes are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анохин П. К. Успехи физиол. наук, т. 5, № 2, с. 5—92, 1974.
2. Osborne N. N. Biochemistry of characterised neurons. Pergamon press, Oxford, 1978.
3. Самойлов М. О., Никитин В. П., Семенов Д. Г., Майоров В. Н., Шерстнев В. В. V Всесоюзный семинар по развитию общей теории функциональных систем «Интегративная деятельность нейрона», с. 29—30, М., 1979.
4. Вадимиров Ю. А., Коган Э. М., Коркина Л. Г., Сороковой В. Н.—В кн.: Актуальные проблемы пересадки органов, с. 150—165, М., Медицина, 1979.
5. Hallett M., Schneider A. S., Carbone E. J. Membrane Biol., v. 10, № 1, p. 31—44, 1972.
6. Caswell A. N., Hutchison J. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 43, p. 625—630, 1971.
7. Caswell A. N. J. Membrane Biol., v. 7, p. 345—364, 1972.
8. Schaffer W. T., Olson M. S., v. 27, p. 1319—1325, 1976.
9. Carvalho C. A. M. J. Neurochem., v. 30, p. 1149—1155, 1978.
10. Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
11. Kretsinger R. H. CRC Critical Reviews in Biochemistry, v. 12, p. 119—174, 1930.
12. Lazarewicz J. W., Kanje M., Sellström A., Hanberger A. J. Neurochem., v. 29, p. 495—502, 1977.
13. Балабан П. М., Литвинов Е. Г. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 27, № 3, с. 538—544, 1977.
14. Балабан П. М. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 31, № 2, с. 315—322, 1981.
15. Нейрохимия. Л., Изд-во ЛГУ, 1979.
16. Каппучинелли П. Подвижность живых клеток, М., Мир, 1982.
17. Воробьев В. С.—В кн.: Итоги науки и техники. ВИНТИ. Морфология человека и животных. Антропология, с. 6—26, 1983.
18. Stoboda R. D., Dentler W. L., Rosenbaum J. L. Biochemistry, v. 15, p. 4497—4504, 1976.
19. Соколов Е. Н. Нейронные механизмы памяти и обучения, М., Наука, 1981.
20. Костюк П. Г., Крышталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
21. Кэндел Э. Клеточные основы поведения, М., Мир, 1980.
22. Kostyuk P. G., Veselovsky N. S., Fedulova S. A. Neuroscience, v. 6, p. 2431—2437, 1981.
23. Gorman A. L., Hermann A., Thomas M. V. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 327, p. 185—217, 1982.
24. Alvarez-Leefmans F. J., Rink T. J., Tsien R. Y. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 315, p. 531—548, 1981.
25. Костенко М. А., Мусиенко В. С., Смолихина Т. Н. Цитология, т. 23, с. 779—787, 1981.
26. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов. М., Медицина, 1978.
27. Разумовская П. И., Домбинова С. А., Демича М. Н., Говарова Л. В. Бюл. эксперим. бюл. и мед., т. 91, с. 677—679, 1981.
28. Rasmussen H., Godman D. Physiol. Rev., v. 57, p. 421—510, 1977.