

УДК 577.352.5 : 612.822

БИОХИМИЯ

М. А. Сулейманян, С. Н. Айрапетян

О механизме действия аденилатциклазы на мембранный потенциал нейронов улитки

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 28/VI 1977)

Было показано, что в симпатических ганглиях млекопитающих под действием катехоламинов происходит активация аденилатциклазы, которая в свою очередь приводит к гиперполяризации нейрональной мембраны (1). Очевидно, что гиперполяризация, вызванная активацией аденилатциклазы, обусловлена либо активацией Na-K-АТФ-азы мембран, обуславливающей метаболически-зависимую часть мембранного потенциала (МП) клетки, либо увеличением проводимости мембраны для ионов калия и хлора, равновесный потенциал которых выше МП. Конкретные механизмы действия аденилатциклазы на МП нейронов в настоящее время остаются неизвестными.

Известно, что ионы фтора являются мощными активаторами аденилатциклазы мембран. Детальное изучение механизма действия ионов фтора на АТФ-азозависимый компонент МП позволит выяснить характер взаимосвязи аденилатциклазной и АТФ-азной активностей мембран, а также механизм действия аденилатциклазы на МП клетки. Изучению данного вопроса и посвящена настоящая работа.

Опыты проводили на изолированной нервной системе виноградной улитки в зимние месяцы, когда животные находились в анабиозе. Методика отведения трансмембранной разности потенциалов и измерения проводимости мембран описана ранее (2,3). Исходный физиологический раствор имел следующий состав в миллимолях: Na^+ —90, K^+ —4, Ca^{++} —7, Mg^{++} —4, трис-НСI (рН-7,5)—10, глюкоза-10. В некоторых опытах ионы хлора были заменены ионами ацетата. Фторсодержащие (5—10 ммоль) растворы готовили путем замены эквивалентного количества NaCl или NaAc на NaF в исходном растворе.

Нейрон RPa-1 (по классификации Сахарова и Шаланки) имеет вспышкообразную пейсмекерную активность, где за каждой пачкой импульсов следуют периоды гиперполяризации мембраны (4).

На рис. 1,А, где показано действие ионов фтора на ритмическую активность нейрона RPa-1, видно двухфазное действие фтора на час-

тоту и амплитуду пейсмекерного колебания МП: сперва резко увеличиваются амплитуда и частота медленных колебаний МП, а затем постепенно происходит стабилизация МП на более деполяризованном уровне. Аналогичная картина сохраняется и после предварительного повышения внутриклеточного содержания ионов натрия путем 10-минутной инкубации нейронов в бескальциевом рингеровском растворе, только в последнем случае высокоамплитудным колебаниям предшествует гиперполяризация мембраны и относительно быстрое наступление стабилизации МП (рис. 1,Б).

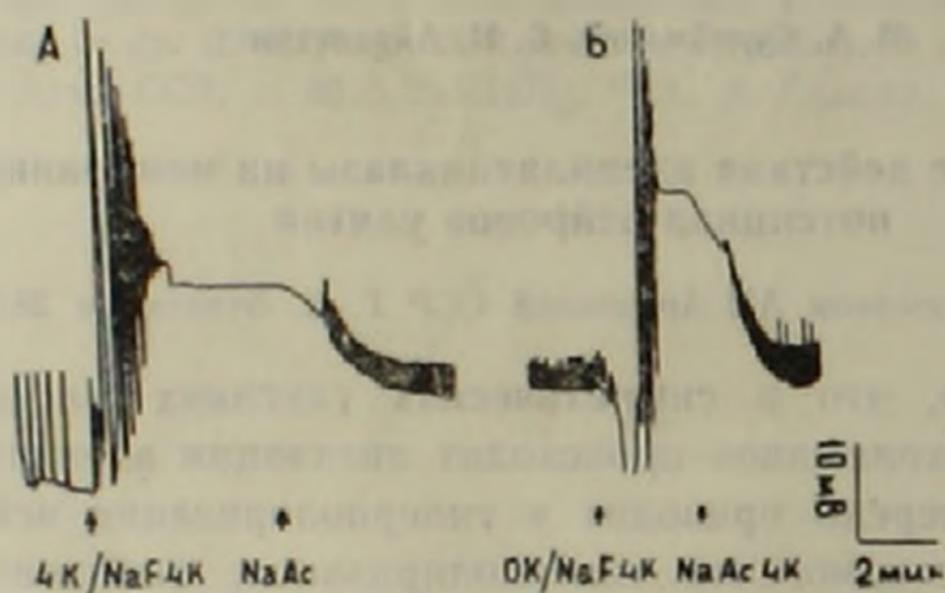


Рис 1 Действие 10 ммол NaF на вспышкообразную активность нейрона RPa-1. Стрелки указывают моменты смены растворов. А—действие NaF в обычном рингеровском растворе; Б—действие NaF после предварительного 10-минутного обогащения нейрона ионами Na

В предыдущих наших работах было показано, что после предварительной инкубации нейронов в бескальциевом растворе Рингера гиперполяризация мембраны вызванной повышением ионов калия в среде обусловлена активацией натриевого насоса клетки (2). Для того, чтобы выяснить характер действия ионов фтора на работу электрогенного натриевого насоса, мы изучали его действие на амплитуду и длительность К-вызванной гиперполяризации мембраны (рис. 2).

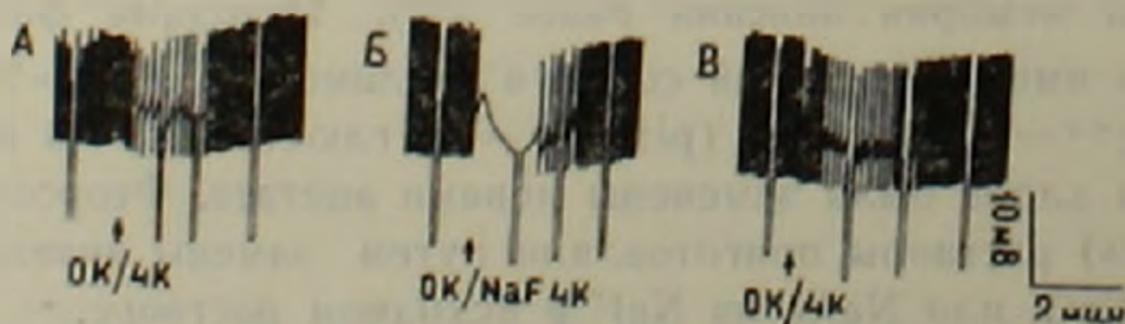


Рис 2 Действие 10 ммол NaF на спонтанно активный нейрон после предварительного 10-минутного обогащения ионами Na. А, В—контроль, насосная гиперполяризация в нормальном рингеровском растворе; Б—насосная гиперполяризация при действии NaF

Как видно из рис. 2,Б ионы фтора значительно увеличивали амплитуду и скорость нарастания К-вызванной гиперполяризации мембраны. Для оценки проводимости мембраны через второй микроэлектрод подавали прямоугольные импульсы входящего тока. Амплитуды электротонических ответов обычно уменьшаются в период насосной гиперполяризации мембраны (рис. 2,Б). Интересно отметить, что добавление ионов фтора в наружную среду у необогащенных натрием нейронов вызывает деполяризацию мембраны на 2—5 мВ, которая сопровождается уменьшением амплитуды электротонических ответов.

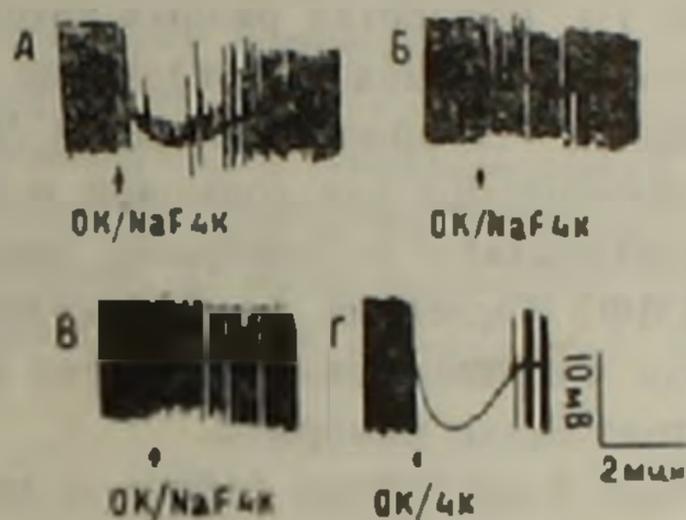


Рис. 3. Эффект уменьшения действия NaF со временем по мере пребывания нейрона в условиях *in vitro*. А—спустя 1 час; Б—2 часа и Б'—2,5 часа после введения микроэлектродов; Г—наличие насосной гиперполяризации после вымывания NaF

Активационное действие ионов фтора на насосную гиперполяризацию мембраны уменьшается со временем по мере пребывания нейронов в условиях *in vitro* (рис. 3), тогда как амплитуда насосной гиперполяризации существенно не изменяется или даже увеличивается (рис. 3,Г). Обычно активационное действие ионов фтора на насосную гиперполяризацию мембраны не проявилось у нейронов с низким входным сопротивлением, у которых АГФ-азнозависимая часть МП отсутствовала или была незначительной, то есть когда нейрон находился в плохом функциональном состоянии.

Известно, что ионы фтора могут иметь двойной эффект на метаболизм клетки: с одной стороны являются активаторами аденилатциклазной активности мембраны, с другой стороны—ингибиторами гликолиза (энолазы) клетки. Очевидно, что при добавлении ионов фтора в наружную среду клетки, сперва будет проявляться его активационное действие на циклазу мембраны, а затем только ингибационное действие на энолазу, которая находится в цитоплазме клетки. Вышеуказанные оба эффекта ионов фтора по разному действуют на поляризацию мембраны: активация аденилатциклазы приводит к гиперполяризации

(¹), а подавление эналазы — к деполяризации мембраны (⁵). В данной работе обсуждаются данные только о первичном, гиперполяризационном эффекте кратковременной (1-2 минуты) аппликации ионов фтора на мембрану. Интересно отметить, что добавление 1—3 ммол циклический АМФ в наружный омывающий раствор увеличивает амплитуду вышеуказанной гиперполяризации без существенного изменения сопротивления мембраны (⁶).

В предыдущих наших работах было показано, что межпачечная гиперполяризация мембраны у пейсмекерных нейронов, имеющих вспышкообразную активность, вызвана активацией работы электрогенного натриевого насоса (²). В работах разных авторов было показано, что катехоламины, гормоны вызывают увеличение амплитуды и длительности вышеуказанной гиперполяризации (^{7,8}). А в настоящее время известно, что рецепторами для гормонов и катехоламинов служат молекулы аденилатциклазы в мембране, которые обеспечивают синтез циклической АМФ. Последний же связывается с регуляторной единицей протенингиаза и активирует его, которая в свою очередь специфически фосфорилирует белки мембраны.

Данные, приведенные в настоящей работе, о том, что ионы фтора значительно увеличивают насосную гиперполяризацию мембраны у пейсмекерных и непейсмекерных нейронов, сопровождающийся уменьшением сопротивления мембраны, указывают на то, что увеличение насосзависимого компонента МП обусловлено дополнительно активацией транспортной АТФ-азы в результате активации аденилатциклазы мембран под действием ионов фтора. Различие характера действия ионов фтора на МП пейсмекерного и непейсмекерного нейронов по-видимому можно объяснить, тем, что в первых нейронах в результате интенсивного поступления натрия внутрь нейронов исходный уровень активности транспортной АТФ-азы высокий и лимитирующим фактором работы натриевого насоса является содержание АТФ в клетке. По этой причине инактивационное действие ионов фтора на гликолиз клетки (деполяризация) наступает быстрее, чем у обычных нейронов. Аналогичным образом (истощением внутриклеточного содержания АТФ) можно объяснить ослабление гиперполяризационного эффекта ионов фтора со временем по мере пребывания нейронов в условиях *in vitro*. Однако для окончательного выяснения данного вопроса требуются более детальные исследования.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Մ. Ա. ՍՈՒՆՅՄԱՆՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱԳԵՏՅԱՆ

Աղենիլատցիկլազայի ազդման մեխանիզմի մասին՝ խիունջի նեյրոնների մեմբրանային պոտենցիալի վրա

Այս աշխատանքում ուսումնասիրվել է ֆտորի իոնների ազդեցությունը մեմբրանային պոտենցիալի ալենոզինտրիֆոսֆատազայից (ԱՏՖ) կախված

րազադրիչի վրա: Ֆտորի իոնների ազդեցության տակ մեծանում է պեյսմեկերային նեյրոնների մեմբրանային պոտենցիալի դանդաղ տատանումների ամպլիտուդան և հաճախականությունը, իսկ հետո աստիճանաբար վրա է հասնում մեմբրանային պոտենցիալի ստաբիլիզացիան ավելի դեպոլյարիզացիոն մակարդակի վրա: Նույն պատկերը պահպանվում է նաև նատրիումի ներքջային կոնցենտրացիայի նախասլես մեծացումից հետո, միայն այս դեպքում բարձրամասլիտուդային տատանումներին նախորդում է մեմբրանի հիպերպոլյարիզացիոն փուլը: Ֆտորի իոնները այլ կերպ են ազդում սովորական օսցիլյացիոն քնույթ ունեցող նեյրոնների վրա: Նրանք մեծացնում են մեմբրանային պոտենցիալի նատրիումական պոմպով պայմանավորված հիպերպոլյարիզացիայի ամպլիտուդան և արագությունը: Ելնելով այս տվյալներից, կկն ենք այն եզրակացության, որ մեմբրանային պոտենցիալի նատրիումական պոմպով պայմանավորված հիպերպոլյարիզացիայի ամպլիտուդայի և արագության մեծացումը, որն ուղեկցվում է մեմբրանի դիմադրության փորացումով, պայմանավորված է տրանսպորտային ԱՏՖ-ազայի լրացուցիչ ակտիվացումով ազենիլատցիկլազայի ակտիվության հետևանքով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ P. Greengard and R. W. Straub, J. Physiol., 161, 414 (1962). ² S. N. Ayrapetyan, Neurobiology of Invertebrates, Tihany, 353 (1976). ³ C. H. Այրապետյան, Биофизика, т. 14, вып. 5 (1969). ⁴ D. A. Sakharov, J. Salanki, Acad. Sci. Hung., 35, 19 (1969). ⁵ G. A. Kerkut, R. C. Thomas, Comp. Biochem. Physiol., 14, 167 (1965) ⁶ D. Faber and A. Greenberg, Abstracts symposium on snail brain, Tihany (1975). ⁷ M. Buisson and M. Gola, Comp. Biochem. Physiol., 54c, 109 (1976). ⁸ J. Salanki and I. Vadasz, Acta, Physiol. Acad. Sci. Hung., 44, 51 (1973).