

Академія Наук України
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця

На правах рукопису

МЕЛІЩУК Олексій Ігорович

УДК 611.839.3:612.822

ВЛАСТИВОСТІ НІКОТИНОВИХ ХОЛІНОРЕЦЕПТОРІВ
НЕЙРОНІВ ПІДСЛИЗОВОГО СПЛЕТІННЯ
МОРСЬКОЇ СВИНКИ

03.00.02 - біофізика

Автореферат дисертації на здобуття вченого
ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 1993

Робота виконана в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця
АН України

Офіційні опоненти: зав. кафедрою біології медичинського
Університету ім. О. О. Богомольця,
професор Романенко О. В. ;
зав. лабораторією,
доктор біологічних наук,
Кононенко М. І.

Провідна організація: Інститут фізіології при Державному
університеті ім. Т. Г. Шевченка

Захист відбудеться 24 листопада 1993 р. о 14 годині на
засіданні спеціалізованої ради Д-016.15.01 при Інституті фізіології
ім. О. О. Богомольця АН України за адресою:

252024, Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту
фізіології ім. О. О. Богомольця АН України.

Автореферат розісланий < ___ > _____ 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор біологічних наук

З. О. Сорокіна-Маріна

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00813988 (.)

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Загальна характеристика роботи

Нікотинові холінорецептори (НХР) є одним з найбільш поширених в організмі та найбільш досліджених видів хеморецепторів, які беруть участь у швидкій синаптичній передачі. Існує багато типів цих рецепторів - на сьогодні відомо 8 α -суб'єдиниць (одна м'язова та сім нейрональних) та 4 β -суб'єдиниці (одна м'язова та три нейрональних). (Скок и соавт., 1987; Colquhoun et al., 1987; Role, 1992). Типи НХР відрізняються по їх чутливості до дії хімічних сполук - агоністів та антагоністів ацетилхоліну, кінетичних властивостей, наявності або відсутності ефекту «випрямлення», десенситизації та ін. Так, наприклад, тубокурарін є міорелаксанти, а мекаміламін та гексаметоній відбірково блокують гангліонарну передачу у порівнянні з нервово-м'язовою (Triggle, Triggle, 1976). α -токсини специфічно блокують холінорецептори скелетних м'язів (Changeux et al., 1970), але не впливають на нейрональні НХР (Магазаник и соавт., 1974; Chiappinelli et al., 1981). Майже усі типи нейрональних НХР виявляють ефект випрямлення - дуже сильне зменшення загальної нікотинової провідності у діапазоні потенціалів від 0 до 50-60 мВ, в той час, коли у м'язових НХР цей ефект відсутній.

З попередніх робіт (Hirst, McKirdy, 1975; Surprenant, 1984) відомо, що НХР беруть участь у швидкій збуджувачій синаптичній передачі в нейронах підслизового сплетіння (ПС) тонкої кишки морської свинки. Але властивості саме НХР не було досліджено.

Мета та завдання дослідження:

У зв'язку з вищевикладеним метою поданої роботи було докладне електрофізіологічне вивчення властивостей нікотинових холінорецепторів нейронів підслизового сплетіння тонкої кишки морської свинки, зокрема їх десенситизації та впливу на них блокаторів синаптичної передачі.

Головні завдання:

1. Вивчити механізми активації НХР нейронів підслизового сплетіння ацетилхоліном, селективність іонного каналу рецептора, вплив мембранного потенціалу та дози ацетилхоліну на час відкритого стану іонного каналу рецептора.
2. Вивчити механізми десенситизації ацетилхолінового струму та генерації слідового струму.

3. Дослідити механізми блокування НХР класичними гангліоблокаторами та міорелаксантами.

Наукова новизна отриманих результатів:

В нейронах підслизового сплетіння тонкої кишки морської свинки за допомогою методу локальної фіксації мембранного потенціалу на цілій клітині вперше докладно вивчені струми, які викликає іонофоретична аплікація ацетилхоліну, а також механізми їх блокування класичними гангліоблокаторами гексаметонієм та триметафаном та міорелаксантами тубокурарином, дигідро- β -еритроїдином та декаметонієм. Знайдено додаткове місце зв'язування ацетилхоліну, локалізоване поза іонним каналом НХР. Приєднання ацетилхоліну до цього місця зв'язування призводить до десенситизації рецептора, при виході з якої рецептор переходить у стан з відкритим іонним каналом. Вперше для нейрональних НХР знайдено «слідовий струм», який виникає у момент закінчення аплікації ацетилхоліну як наслідок дисоціації ацетилхоліну від додаткового місця зв'язування.

Практичне значення роботи:

Результати дослідів становлять інтерес для біофізиків фізіологів та фармакологів, оскільки дають нову інформацію про молекулярні механізми роботи іонного каналу НХР нового об'єкту - нервової клітини підслизового сплетіння, які є основою міжнейронної передачі, і можуть бути використані як основа при дослідженні механізмів дії фармакологічних препаратів, які застосовуються при лікуванні розладів діяльності шлунково-кишкового тракту.

Апробація роботи:

Результати досліджень, наведених в дисертаційній роботі було повідомлено на наукових семінарах відділу фізіології вегетативної нервової системи Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН України, загальноінститутському семінарі Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН України, та на міжнародній науковій конференції «Калієві канали та нейрональні механізми» (1991р. Париж) ("European Neuroscience Conference" "K⁺ channels and neuronal mechanisms" (1991, Paris)).

Об'єм та структура дисертації:

Робота викладена на 105 сторінках машинописного тексту та складається з вступу, чотирьох розділів, висновків та

бібліографічного покажчика. Дисертація ілюстрована 21 малюнком. Бібліографічний покажчик налічує 148 джерел, з них 17 - російською мовою та 131 - англою мовою.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ацетилхоліновий струм (АХ-струм) вивчали на свіжедисоційованих нейронах методом локальної фіксації мембранного потенціалу на цілій клітині (patch-clamp whole cell, (Hamill et al., 1981)). Для виділення клітин брали ділянку клубової кишки, розміщену на відстані приблизно 15-20 см від товстої кишки, довжиною 2 см, розрізали його повздовж продольної осі і закріплювали в камері для препарування за допомогою голки слизовою оболонкою доверху. Потім за допомогою піпету з плоскими кінчиками акуратно знімали слизову оболонку. Після цього підслизову оболонку відділяли від шару кільцевих м'язів, не залишаючи кусочків кільцевих м'язів на підслизовій оболонці. Потім, половину відділеної підслизової оболонки переносили в розчин колагенази (Collagenase, SIGMA, USA), 2 мг/мл і трипсину (Trypsin, Boehringer Mannheim, West Germany), 0,2 мг/мл, виготовленого на зовнішньоклітинному розчині без Ca^{2+} і Mg^{2+} . Час обробки складав 25-45 хв., приблизно кожні 10 хв. від початку обробки ділянку підслизової оболонки піпетували піпеткою з діаметром кінчика 0,8-1 мм. Ця процедура сприяла більш рівномірній обробці ферментами, а також дозволяла контролювати ступінь обробки. Потім отриману суспензію клітин переносили в модифіковане середовище Ігла - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) і піпетували 5-10 разів, послідовно зменшуючи діаметри кінчиків піпеток. Далі суспензію клітин виливали в робочу камеру зі скляним дном і через 3-5 хв. включали повільну перфузію. Перші 10-15 хв. клітини перфузували DMEM, а потім зовнішньоклітинним розчином. Через 40 хв. клітини міцно прикріплювалися до скла і були готові для експерименту.

Розчини.

В експериментах були застосовані наступні розчини: зовнішньоклітинний: NaCl - 164 мМ, KCl - 1 мМ, MgCl_2 - 1 мМ, CaCl_2 - 1 мМ, HEPES/NaOH - 10 мМ, глюкоза - 11 мМ, pH - 7,4;

внутрішньоклітинний: К-глюконат - 100 мМ, КСl - 20 мМ, NaCl - 5 мМ, MgCl₂ - 1 мМ, CaCl₂ - 1 мМ, EGTA/NaOH - 11 мМ, HEPES/NaOH - 10 мМ, рН - 7,4;

Вимірювання трансмембранного струму.

Для ресстрації трансмембранного струму використовували стандартний метод локальної фіксації мембранного потенціалу за допомогою мікропіпетки, яка утворювала щільний контакт з мембраною клітини (patch-clamp whole cell; Hamill et al., 1981). Використовували скляні мікропіпетки з тугоплавкого скла пірекс, які витягували із заготовок діаметром 1,7 мм. Перед заповненням розчином кінчик піпетки оплавляли, що дозволяло покращити наступний контакт піпетки з мембраною клітини. Після заповнення розчином, піпетки мали опір 2-5 МОм, що при максимальному АХ-струмі 2 нА давало помилку фіксації потенціалу не більш 10 мВ, а в багатьох випадках менше ніж 2-5 мВ. Ацетилхоліном діяли на клітину за допомогою іонофоретичної аплікації. Концентрація ацетилхоліну в розчині, яким був заповнений аплікуючий мікроелектрод, складала 1 Моль.

Робочу камеру з клітинами, відповідну мікропіпетку і іонофоретичний мікроелектрод закріплювали на позиціонері маніпуляторі ПМ-1. Кінчик піпетки підводили до мембрани клітини під візуальним контролем через інвертований мікроскоп "Biolam" (ЛОМО) з біокулярною насадкою АУ-12. Контакт мембрани з кінчиком піпетки фіксували по різкому зменшенню току витoku. Після створення упіпетці невеликого від'ємного тиску виникав щільний контакт між кінчиком піпетки і мембраною клітини, потім повторним створенням від'ємного тиску проривали ділянку мембрани клітини, що знаходилася всередині піпетки, завдяки чому розчин, який заповнював піпетку, проникав у середину клітини. Таким чином ставало можливим контролювати склад внутрішньоклітинного середовища, а також фіксувати потенціал на мембрані, пропускаючи через піпетку струм необхідної величини. Електрична схема ресстрації зроблена за Сігворсом (Sigworth, 1983). Опір зворотного зв'язку в перетворювачі струм-напруга складав 100 МОм. Схеми фіксації мембранного потенціалу і іонофоретичного струму були виконані Деркачем В. А.

Для визначення уявної постійної часу відкритого стану іонного

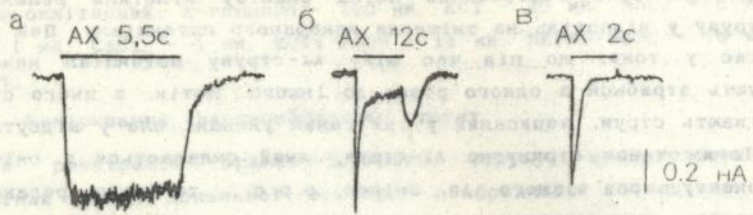
каналу НХР було застосовано метод аналізу кінетики релаксацій АХ-струму у відповідь на зміщення мембранного потенціалу. Цей метод полягає у тому, що під час піку АХ-струму потенціал мембрани зміщують стрибком з одного рівня до іншого. Потім, з цього струму віднімають струм, записаний у тих самих умовах, але у відсутності АХ. Таким чином отримуємо АХ-струм, який складається з омичного компоненту, пов'язаного із зміною е.р.с., та саме релаксацій АХ-струму, яка пов'язана із зміною стану іонного каналу, що відбувається за експоненціальним законом. Розрахунки показали (Adams, 1975a, 1977 a,b; Sakmann, 1975), що постійна часу релаксацій відповідає уявній постійній часу відкритого стану іонного каналу.

Сигнал з виходу схеми реєстрації подавався на самописець або на вхід багатоканального інтерфейсу, що дозволяло вводити його у комп'ютер безпосередньо під час реєстрації. Накопичування та обробку даних робили за допомогою стандартного пакету програм рСLAMP -5.5. Малюнки та графіки робили у програмах "Sigmaplo" та "Cplot".

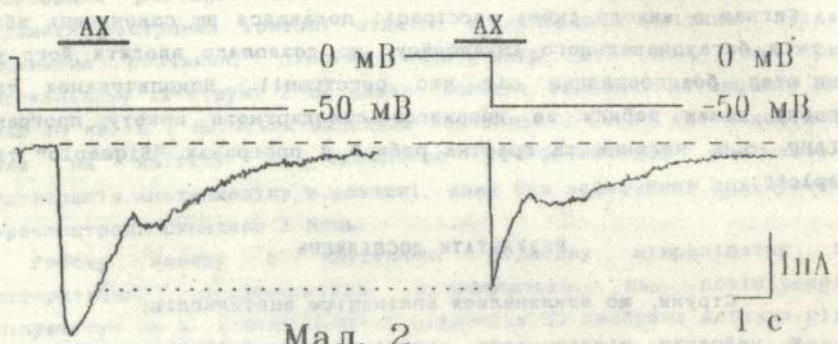
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Струми, що викликалися аплікацією ацетилхоліну.

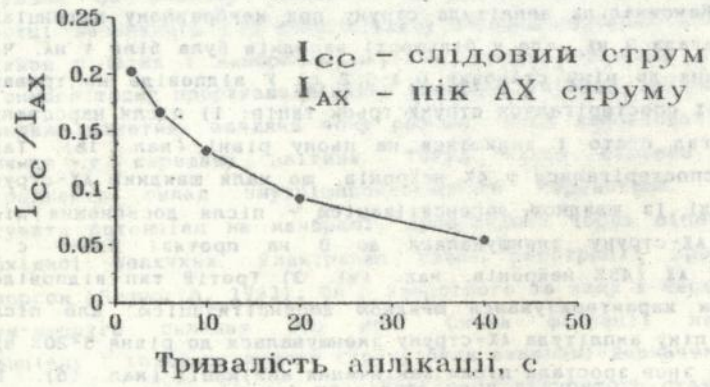
У нейронах підслизового сплетіння іонофоретична аплікація ацетилхоліну викликала швидконаростаючий вхідний струм (АХ-струм), який був пов'язаний із збільшенням провідності мембрани для катіонів. Максимальна амплітуда струму при мембранному потенціалі -50 мВ досягала 3 нА, але у більшості випадків була біля 1 нА. Час наростаючого до піку становив 0,1-0,2 с. У відповідь на тривалу аплікацію АХ спостерігалися струми трьох типів: 1) після наростаючого струму досягав плато і залишався на цьому рівні (мал. 1а). Такі відповіді спостерігалися у 4% нейронів, що мали швидкий АХ-струм. 2) відповіді із швидкою десенситизацією - після досягнення піку амплітуда АХ-струму зменшувалася до 0 на протязі 0,3-1 с і присутності АХ (45% нейронів, мал. 1в). 3) Третій тип відповідей (50%) також характеризувався швидкою десенситизацією, але після досягнення піку амплітуда АХ-струму зменшувалася до рівня 5-20% від максимуму і знов зростала після закінчення аплікації (мал. 1б). Це



Мал. 1



Мал. 2



Мал. 3

зростання амплітуди струму після закінчення аплікації є слідовим струмом (СС) (Vlachova et al., 1987).

Для усіх трьох типів відповідей вольт-амперна характеристика, дозозалежність та чутливість до антагоністів були однакові.

Приблизно у 10% досліджених нейронів аплікація АХ не викликала швидкого вхідного струму, що, мабуть, означає відсутність НХР в цих нейронах. Ймовірно, що це так звані АН нейрони, в яких за літературними даними були відсутні синаптичні входи (Surprenant, 1984). Іноколи в цих нейронах спостерігався повільний вихідний струм, який був пов'язаний з активацією мускаринових холінорецепторів. Перфузія розчином атропіну 1 мкМ повністю блокувала цей струм.

Потенціало- та дозозалежність АХ-струмів.

Потенціалозалежність АХ-струму досліджували як у стаціонарних умовах, так і за допомогою методу релаксації. Останній метод дозволяє значно розширити діапазон досліджуваних потенціалів. Обидва методи дали однакові результати.

В області негативних мембранних потенціалів АХ-струм мав вхідний напрямок і його амплітуда лінійно залежала від потенціалу мембрани. В області позитивних потенціалів при потенціалах від 0-10 мВ до 50-60 мВ амплітуда АХ-струму майже дорівнювала нулю та не залежала від потенціалу. Це так званий ефект "випрямлення", властивий багатьом типам нейрональних НХР (Selyanko et al., 1979; Mathie et al., 1987), крім НХР деяких центральних нейронів. Вилучення катіонів Ca^{2+} та Mg^{2+} із зовнішньоклітинного розчину і Mg^{2+} із внутрішньоклітинного не впливало на ефект випрямлення. Заміна внутрішньоклітинного Na^+ на K^+ або Cs^+ також не впливала на цей ефект. Потенціал реверсії АХ-струму становить 19 ± 6 мВ, ($n=10$), 6 ± 1 , ($n=12$) та $2,8 \pm 1,1$, ($n=4$) для головних внутрішньоклітинних катіонів K^+ , Na^+ та Cs^+ , відповідно. Розрахунок відносних провідностей для цих катіонів показав, що вони приблизно рівні.

Релаксації АХ-струму викликали зменшення мембранного потенціалу від рівня +20 мВ, коли АХ-струм відсутній або майже відсутній через ефект випрямлення, до потрібного рівня у час, відповідний до максимуму АХ-струму. Завдяки ефекту випрямлення, отриманий АХ-струм був "чистою" релаксацією, тобто омичний компонент АХ-струму був

майже або повністю відсутній. Потенціалозалежність амплітуди релаксацій АХ-струму було досліджено у діапазоні від -140 до 140 мВ. Як і в стаціонарних умовах, потенціалозалежність амплітуди релаксацій в області негативних потенціалів була лінійною. В діапазоні потенціалів від 0 до 50-60 мВ амплітуда АХ-струму була дуже близькою до 0. Застосування методу релаксацій дозволило встановити, що при потенціалах більш позитивних, ніж 60 мВ амплітуда АХ-струму лінійно залежить від потенціалу.

Залежність амплітуди АХ-струму від дози АХ досліджували як у стаціонарних умовах, так і за допомогою методу релаксацій. Обидва ці методи дали аналогічні результати. Метод іонофоретичної аплікації не дозволяє точно розрахувати концентрацію АХ біля клітини. Але встановлено, що концентрація АХ біля клітини прямо пропорційна іонофоретичному струму.

Із збільшенням концентрації АХ амплітуда АХ-струму зростає, досягає піку і потім зменшується, мабуть, через блокування відкритого іонного каналу НХР ацетилхоліном (Ogden, Colquhoun, 1985, Colquhoun, Ogden, 1984, 1988).

Аналіз кінетики релаксацій дозволив встановити уявний час відкритого стану іонного каналу НХР (УЧ), а також його залежність від дози АХ та потенціалу мембрани. В поданій роботі було встановлено, що із збільшенням концентрації АХ УЧ зменшується, що співпадає з теоретичними розрахунками. Згідно послідовній моделі середній уявний час відкритого стану іонного каналу може бути знайдено з рівняння $\tau_k = 1/(\alpha_k + \beta_k [A]^n)$, яке при $[A] = 0$ спрощується до $\tau_k = 1/\alpha_k$. Таким чином було встановлено нижню межу (тому, що концентрація АХ $[A]$ не дорівнювала нулю) середнього уявного часу відкритого стану іонного каналу, яка при потенціалі мембрани -60 мВ дорівнює $9,3 \pm 1,0$ мс ($n=23$).

Залежність УЧ від потенціалу досліджували в умовах аплікації мінімальної дози АХ. Відомо, що з гіперполяризацією мембрани тривалість відкритого стану збільшується (Derkach et al., 1987; Mathie et al., 1990). В поданій роботі було знайдено, що мінімальне значення УЧ спостерігається при потенціалах мембрани, що становлять область випрямлення. Із гіперполяризацією мембрани УЧ збільшується. Максимальна зміна УЧ спостерігається при потенціалах від 20 до -20 мВ, а е-кратній зміні УЧ відповідає гіперполяризація мембрани на 15

мВ. Така сильна залежність УЧ від потенціалу пояснює наявність області випрямлення на потенціалозалежності АХ-струму. По мірі деполаризації мембрани за область випрямлення УЧ зростає. Ми порівняли потенціалозалежність УЧ із потенціалозалежністю відносної нікотинної провідності мембрани. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що у нейронах підслизового сплетіння тонкої кишки морської свинки потенціалозалежність АХ-струму обумовлена потенціалозалежністю УЧ.

Слідовий струм

Приблизно у половині нейронів, що мали НХР, спостерігався слідовий струм. Особливість цього струму полягає у тому, що він виникає у відповідь не на початок аплікації АХ, а на її припинення. Раніше аналогічний струм спостерігали лише в кількох роботах для м'язових НХР (Adams, 1975c) та глутаматних рецепторів (Vlachova et al., 1987).

Аплікація АХ призводила до виникнення швидконаростаючого вхідного струму, який починав зменшуватися через 0,3-0,5 с після початку аплікації. Ступінь та крутизна спаду збільшувалися по мірі зростання дози агоністу і при дозах АХ, більших за насичуючу амплітуда відповіді через 2 с після початку аплікації становила 10-30% від пікового значення. В момент припинення аплікації виникав слідовий струм (СС), також вхідного напрямку, тривалістю 5-8 с. Аплікація карбахоліну викликала такий самий СС, як і аплікація АХ.

Для з'ясування природи СС було перевірено кілька можливостей: активація мускаринових ХР (МХР), кальційкерованих калієвих, катіоннеселективних або хлорних каналів, що могли б активуватися внаслідок входу іонів кальція через канал НХР (Vernino et al., 1992). Експерименти показали, що блокатор МХР атропін (1кМ), заміна іонів калія іонами натрію у внутрішньо- та зовнішньоклітинному розчинах не впливали на форму та потенціал реверсії СС. Вилучення із зовнішньоклітинного розчину іонів кальцію, присутність у внутрішньоклітинному розчині хелатора іонів кальцію EGTA (10 мМ, 0 мМ Ca^{2+}) та заміна іонів хлору іонами глюконату також не призвели до зміни СС та його потенціалу реверсії. Це дозволяє нам виключити можливість активації як МХР,

так і кальційкерованих провідностей. Таким чином, можна зробити висновок, що СС є безпосереднім результатом активації НХР. Це також підтверджується тим, що СС супроводжується збільшенням провідності мембрани та ефективно блокується гексонієм у тому ж діапазоні концентрацій (1-5мкМ), що і головна відповідь на АХ.

Спад АХ-струму і появу СС можна пояснити двома головними причинами: 1) десенситизація НХР, з якої рецептор повертається у стан з відкритим іонним каналом, та, 2) блокування відкритого іонного каналу НХР ацетилхоліном з подальшою його деблокадою після закінчення аплікації.

Той факт, що швидкість спаду АХ-струму зростає із збільшенням концентрації АХ, а після припинення аплікації з'являється слідовий струм, повинно означати наявність в рецепторі додаткового місця зв'язку ацетилхоліну. Внаслідок того, що цей ефект розвивається, коли концентрація АХ досягає насичуючої або перевищує її, спорідненість цього місця зв'язку до АХ повинна бути меншою, ніж спорідненість впізнаючого центру НХР. Приєднання АХ до цього місця зв'язку призводить до закриття каналу, а дисоціація - до повторного відкриття. Якщо це додаткове місце зв'язку локалізовано у іонному каналі НХР, то СС пов'язан із блокуванням відкритого іонного каналу. А якщо це місце зв'язку локалізовано поза іонним каналом, то це десенситизація. Наведені нижче результати дозволяють стверджувати, що в основі СС полягає десенситизація НХР, з якої рецептор переходить у стан із відкритим іонним каналом.

Аплікація АХ тривалістю 0,1 с викликала відповідь максимальної амплітуди і тривалістю спада біля 1 с. При подовженні аплікації АХ-струм починав спадати ще у присутності АХ, а тривалість спаду збільшувалася. Коли тривалість аплікації перевищувала 1 с з'являвся другий пік АХ-струму - СС. СС залишався при подовженні аплікації до 62 с, при цьому амплітуда АХ-струму у момент припинення аплікації становила 5-10% від пікової. Одночасно, із подовженням аплікації амплітуда СС зменшувалася (мал. 3).

Амплітуда АХ-струму у момент припинення аплікації зменшується якщо гіперполяризація мембрани перевищує -40 мВ. Це пов'язано із зменшенням відносної нікотинової провідності мембрани під час аплікації АХ, тобто ця провідність через 2 с після початку аплікації набагато менша ніж на піці АХ-струму. Після припинення

аплікації відносна нікотинова провідність поступово зростає і, на максимумі СС досягає свого значення на піці АХ-струму. Таке зменшення провідності із гіперполяризацією мембрани характерно для блоку відкритого іонного каналу НХР ацетилхоліном. Але треба зазначити, що наявність спаду АХ-струму і СС не залежить від мембранного потенціалу і спостерігається при деполяризації до 0 мВ, коли блок відкритого каналу повністю відсутній (Colquhoun, Ogden, 1984).

Для того, щоб перевірити, як залежить форма АХ-струму від потенціалу мембрани, ми міняли стрибком мембранний потенціал від підтримуваного потенціалу 0 мВ до -50 мВ у різні моменти часу відносно початку аплікації. Якщо стрибок потенціалу відбувався до початку аплікації, ми мали звичайний АХ-струм і СС (мал. 2, ліворуч). Коли стрибок потенціалу відбувався після початку аплікації, то в інтервалі часу від початку аплікації до стрибка потенціалу АХ-струм дорівнював нулю внаслідок ефекту випрямлення та близькості потенціалу мембрани до потенціалу реверсії АХ-струму. У цей час, коли потенціал мембрани 0 мВ, ймовірність іонного каналу НХР бути відкритим у десятки разів нижче ніж при потенціалі -50 мВ (Mathie et al., 1990). Якщо спад АХ-струму пов'язан із блокуванням відкритого іонного каналу, то внаслідок того, що канал може бути заблокован лише після того, як він відкриється, амплітуда піку АХ-струму, викликаного стрибком мембранного потенціалу під час аплікації АХ (мал. 2, праворуч) повинна дорівнювати піковому значенню АХ-струму, викликаного аплікацією АХ при -50 мВ (мал. 2, ліворуч), незалежно від того, у який час після початку аплікації відбувається стрибок потенціалу. Але пікове значення АХ-струму, викликаного стрибком мембранного потенціалу під час аплікації АХ, співпадало із значенням АХ-струму, викликаного при -50 мВ, у відповідний момент часу після початку аплікації (мал. 2). Таким чином, це означає, що генерація СС не залежить від мембранного потенціалу і його механізмом не є блокування відкритого іонного каналу НХР. А це у свою чергу означає, що додаткове місце зв'язку АХ локалізовано поза іонним каналом НХР.

Якщо на піці СС прикласти ще одну аплікацію, таку саму як і перша, то замість збільшення вхідного струму спостерігається його різке зменшення. Після припинення другої аплікації генерується СС,

але меншої амплітуди. У міру того, як зростає інтервал між першою та другою аплікаціями, амплітуда другого АХ-струму відновлюється.

Для порівняння в поданій роботі було досліджено швидкість відновлення другого АХ-струму у нейронах, що не мали СС. В результаті цього дослідження було встановлено, що швидкість відновлення другої відповіді в 2-3 рази більше у нейронах що мали СС, ніж у тих, що не його мали.

Таким чином, з вищенаведених фактів можна зробити висновок, що в тих нейронах, які мають СС, НХР можуть перебувати у двох станах десенситизації. Перший стан десенситизації пов'язан із додатковим місцем зв'язку АХ і доказом його наявності є СС. Наявність другого стану десенситизації підтверджується тим, що при збільшенні тривалості аплікації зменшується амплітуда СС. Це означає, що кожному одиницю часу деяка частина НХР переходить у стан десенситизації, з якого після усунення АХ рецептор переходить у неактивованій стан (так би мовити «звичайна» десенситизація, властива багатьом типам рецепторів). Що до НХР нейронів, які не мали СС, то вони можуть мати один або кілька станів десенситизації, які відрізняються своєю кінетикою.

Дія класичних гангліоблокаторів та міорелаксантів.

Для з'ясування місця НХР нейронів підслизового сплетіння серед НХР інших об'єктів було досліджено дію на АХ струм класичних гангліоблокаторів гексаметонію і триметафану, а також міорелаксантів тубокурарину, дігідро- β -ерітроїдину (ДГ β Е) та декантонію.

Дію гексаметонію було досліджено у діапазоні концентрацій від 1 до 10 мкМ. EC_{50} (концентрація половинного пригнічення) для гексаметонію при мембраному потенціалі становить 3 мкМ. Блокуюча дія гексаметонію посилювалась із гіперполяризацією мембрани і повністю зникала при деполіризації мембрани до -20-0 мВ. У той самий час ступінь блоку не залежала від дози АХ, тобто, дія гексаметонію була неконкурентною. Крім цього, було встановлено, що гексаметоній (3-10 мкМ) значно прискорює релаксації АХ-струму та викликає появу зворотної релаксації. Така поведінка релаксацій

АХ-струму у присутності гексаметонію є характерною ознакою блоку відкритого іонного каналу НХР (Asher et al., 1979; Colquhoun, Hawkes, 1983). Разом із неконкурентністю та потенціалозалежністю блокуючої дії, ці результати дозволяють вважати гексаметоній блокатором відкритого іонного каналу НХР нейронів підслизового сплетіння. Такі самі результати (EC_{50} біля 10 мкМ) були отримані у дослідах по впливу гексаметонію на деполаризацію, викликану АХ в тих самих нейронах (Vanner & Surprenant, 1990).

За механізмом своєї дії на багатьох досліджених об'єктах гексаметоній є каналоблокатор, але ефективність цієї дії дуже залежить від об'єкта. Ближче за всіх до НХР нейронів ПС є НХР нейронів парасимпатичних гангліїв - EC_{50} 2-5 мкМ, (Asher et al., 1979). Далі йдуть нейрони симпатичних гангліїв - EC_{50} біля 50 мкМ (Скок и др., 1987). Найменш чутливі до гексаметонію є НХР кішевої платівки жаби - 1 мМоль (Adams et al., 1991).

На відміну від гексаметонію для триметафану (3-10 мкМ) не залежала від потенціалу мембрани. Крім того, триметафан ніяк не впливав на кінетику релаксацій АХ-струму, а лише пригнічував їх амплітуду. При дослідженні впливу триметафану на дозозалежність АХ-струму спостерігалось паралельне зрушення кривої «доза-ефект» уздовж осі концентрацій. Таке зрушення свідчить про те, що ступінь блоку АХ-струму зменшується з підвищенням концентрації АХ, тобто АХ витискує триметафан з його місця зв'язку з рецептором. Таким чином, на НХР нейронів ПС триметафан є суто конкурентним блокатором. Це співпадає з літературними даними по інших об'єктах, де триметафан також є конкурентним блокатором. Ефективність триметафану на НХР нейронів ПС (EC_{50} 3 мкМ) співпадає з його ефективністю як на нейронах симпатичних - 1 мкМ, (Бобриньв, Скок, 1987), так і парасимпатичних гангліїв - 2,5 мкМ (Asher et al., 1979).

Міорелаксанти тубокурарин і ДГВЕ були менш ефективними блокаторами, ніж гексаметоній и триметафан. Їх блокуюча дія не залежала від потенціалу мембрани у діалазоні концентрацій 10-30 мкМ для тубокурарину та 30 мкМ для ДГВЕ. EC_{50} для тубокурарину становить 10 мкМ, а для ДГВЕ - 30 мкМ. Аналогічна величина була отримана для тубокурарину - 17 мкМ при дослідженні його впливу на деполаризацію, викликану АХ (Vanner, Surprenant, 1990). У порівнянні з іншими об'єктами НХР нейронів ПС менш чутливі до цих

блокаторів. Так, EC_{50} тубокурарину для кінцевої платівки жаби було 0,4 мкМ (Colquhoun et al., 1979), а для НХР нейронів парасимпатичного ганглію - 5мкМ (Asher et al., 1979). Аналог тубокурарину ДГВЕ був також більш ефективним на м'язових НХР (Скок, 1987).

Цікавою особливістю НХР нейронів ПС є їх висока чутливість до міорелаксанту декамтонію. EC_{50} декамтонію становила 15 мкМ при мембранному потенціалі -50 мВ. Ступінь блоку сильно залежала від потенціалу мембрани - якщо у присутності 20 мкМ декамтонію при мембранному потенціалі -10 мВ блок АХ-струму майже відсутній, то при -50 мВ амплітуда АХ-струму у 3,5 рази менше ніж у контролі. Крім цього, ступінь блоку не залежала від дози АХ, що з урахуванням потенціалозалежності означає каналоблокуючий механізм блоку декамтонію. На інших об'єктах декамтоній також є каналоблокатор з тією самою або трохи меншою ефективністю. EC_{50} для НХР кінцевої платівки становить 25 мкМ (Adams, Sakmann, 1978b), а для НХР нейронів парасимпатичного ганглію - 50мкМ (Asher et al., 1979). Крім цього, на відміну від НХР кінцевої платівки (Adams, Sakmann, 1978b), на нейронах ПС декамтоній не має властивостей часткового агоністу.

Таким чином, за своєю чутливістю до блокаторів НХР нейронів ПС більш за все походять на НХР нейронів парасимпатичних гангліїв.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою метода «patch-clamp» в конфігурації ціла клітина вперше вивчено електрофізіологічні характеристики нікотинових холінорецепторів нейронів підслизового сплетіння тонкої кишки морської свинки.

2. Показано, що іонофоретична аплікація ацетилхоліну викликає в цих нейронах відповіді трьох типів - без десенситизації, із швидкою десенситизацією та відповідь із швидкою десенситизацією, яка супроводжувалася слідовим струмом.

3. Висловлено припущення щодо наявності додаткового місця зв'язування ацетилхоліну, локалізованого поза іонним каналом нікотинового холінорецептору. Присуднення ацетилхоліну до цього місця призводить до десенситизації рецептора, при виході з якої

рецептор переходить у стан з відкритим іонним каналом.

4. Вперше для нейрональних холінорецепторів знайдено слідовий струм, який виникає у момент припинення аплікації ацетилхоліну і викликаний дисоціацією ацетилхоліну від додаткового місця зв'язування.

5. Для всіх трьох типів відповідей показано, що амплітуда ацетилхолінового струму в області негативних потенціалів лінійно залежить від мембранного потенціалу, а при потенціалах від 0 до 50 мВ близька до нуля. Знайдено, що це пов'язано із зменшенням уявної тривалості відкритого стану іонного каналу.

6. Показано, що проникність іонного каналу нікотинового холінорецептору майже однакова для катіонів калію, натрію та цезію. Потенціал реверсії ацетилхолінового струму дорівнює в середньому 6 ± 1 мВ ($n=12$).

7. Аналіз кінетики релаксацій ацетилхолінового струму, що виникають у відповідь на стрибок потенціалу, показав, що середня тривалість відкритого стану іонного каналу збільшується із гіперполяризацією мембрани і зменшується із збільшенням дози ацетилхоліну. При потенціалі мембрани -60 мВ і температурі 20°C середня тривалість відкритого стану іонного каналу дорівнює $9,3 \pm 1,0$ мс ($n=12$). Максимальна залежність тривалості відкритого стану іонного каналу від потенціалу мембрани спостерігається при потенціалах від 20 до -20 мВ і відповідає e -кратному її збільшенню при гіперполяризації мембрани на 15 мВ ($n=8$).

8. Знайдено, що класичні гангліоблокатори гексаметоній та триметафан мають відповідно каналоблокуючий та конкурентний механізми дії на нікотинові холінорецептори нейронів підслизового сплетіння. EC_{50} для обох блокаторів при потенціалі мембрани -50 мВ дорівнюють близько 3 мкМ. Міорелаксант тубокурарин та його похідне дигідро- β -еритроїдин є блокаторами з потенціалонезалежними механізмами дії і мають EC_{50} відповідно 10 і 30 мкМ. В той самий час міорелаксант деканетоній є блокатором відкритого іонного каналу, з EC_{50} при потенціалі мембрани -50 мВ 15 мкМ, яке значно зменшується із гіперполяризацією мембрани.

9. Таким чином, за іонною селективністю канала, потенціало- та дозозалежністю нікотинові холінорецептори нейронів підслизового сплетіння близькі до нікотинових холінорецепторів нейронів

екстрануральних вегетативних гангліїв. За наявності слідового струму ці рецептори є унікальними серед нейрональних нікотинових холінорецепторів, тоді як за своїми фармакологічним профілем вони близькі до нікотинових холінорецепторів нейронів парасимпатичних гангліїв.

Список опублікованих робіт за темою дисертації:

1. V. A. Derkach, D. E. Kurenyy, A. I. Melishchuk, A. A. Selyanko, V. I. Skok. Role of disulphide bonds in burst-like activity of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat sympathetic neurones//J. Physiology (London).-1991.-440.-P.1-15.
2. А. И. Мелшук, В. А. Деркач, В. И. Скок. Следовой ток в нейронах подслизистого сплетения морской свинки//Нейрофизиология. - 1993. - 1(N4). - С. 291-296.

Ротопринт інституту "Український проект"
Зак. № 1580 тпр.80 1993 г.

464196

AB28.357

AB 28.357