

УДК 612.813

Ю. А. Акімов

ВПЛИВ НАФТОХІНОНУ НА ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНІВ *HELIX POMATIA*

Інгібітор кінцевої ланки дихального ланцюжка ціаністий натрій викликає досить характерні електрофізіологічні зміни у нейронах слимака *Helix*, а також змінює внутріклітинний вміст калію і натрію в цих клітинах [1]. Проте майже нічого не відомо, як позначається вплив інгібіторів інших етапів дихального ланцюжка на властивостях нейронів слимака. Досліджували дію водорозчинної сполуки нафтохінону, що блокує передачу електронів у дихальному ланцюжку на рівні цитохрому в [4] на нейрони слимака *Helix pomatia*.

Методика досліджень

Досліди провадилися на сомах нейронів ізольованих підглоткових гангліїв слимака. Ганглії вміщували в камеру з робочим об'ємом 1,5 см³, через яку здійснювали постійне надходження розчину із швидкістю 8—10 мл/хв. Використовували розчин Рінгера такого складу (в ммоль/л): NaCl — 90, KCl — 5, CaCl₂ — 10, рН 7,2—7,5. Нафтохінон-4-сульфонат додавали до розчину Рінгера замість еквімолярної кількості NaCl. В сому нейрона вводили одночасно два мікроелектроди — відвідний і подразний. Мікроелектроди заповнювали 2,5 М розчином KCl. Подразнення здійснювали прямокутними імпульсами струму. В роботі використовували загальноприйнятий комплекс апаратури для мікроелектродних досліджень.

З допомогою методу полум'яної фотометрії визначали вміст іонів К і Na в гангліях слимака «в нормі» та в міру інкубації їх у розчині нафтохінону.

Результати дослідів піддавали статистичному аналізу.

Результати досліджень

Інтенсивність розвитку змін електрофізіологічних характеристик нейронів залежить від концентрації нафтохінону в середовищі. При концентрації інгібітора 5—10 ммоль (рН 7,2—7,5) зміни розвивалися дуже швидко: через 15—20 хв інкубації потенціал спокою (ПС) зменшувався до 15—20 мВ. В нормі ПС становив $53,4 \pm 1,9$ мВ ($n=30$). При цьому нейрон втрачав здатність генерувати потенціали дії (ПД) як спонтанні, так і викликані прямим подразненням навіть при багаторазовому збільшенні сили струму подразнення. Вхідний опір нейрона, судячи з величини анелектротонічного потенціалу (АЕП), зменшився за час інкубації в кілька разів. Всі ці зміни були необоротними при будь-якій тривалості відмивання гангліїв нормальним розчином Рінгера.

Застосування більш низьких концентрацій інгібітора дозволило досліджувати кінетику змін електрофізіологічних характеристик нейрона і давало задовільну відтворюваність результатів. На рис. 1 наведені результати дії нафтохінону в концентрації 3 ммоль на гігантський нейрон в лівому паріетальному ганглії. В нормі, через 40 хв після введення електродів у сому, ПС становив 60 мВ, у відповідь на поштовх деполяризуючого струму нейрон генерував розряд з трьох ПД, амплітуда яких досягала 86 мВ, з високою пороговою деполяризацією (28 мВ), тривалим латентним періодом (60 мс), а також високими максимальними

швидкостями наростання і спаду (відповідно V_n і V_c ; див. рис. 1, А, 1). V_n і V_c ПД розраховували з першої похідної ПД. Нейрон мав високий вхідний опір і в нормі не давав спонтанних ПД. В перші ж хвилини дії нафтохінону ПС зменшився майже на 10 мВ, знизилася амплітуда ПД і підвищилася збудливість нейрона: кількість піків у відповідь на подразнення збільшилася, а порогова деполяризація і латентний період зменшилися (рис. 1, А, 1—2). Деполяризація нейрона зростала в наступ-

ні хвилини, нейрон почав генерувати спонтанні синаптичні потенціали і ПД (рис. 1, А, 3), причому амплітуда ПД і, особливо, його V_n і V_c зменшилися (рис. 1, А, 4—8). Найбільш інтенсивна зміна всіх характеристик прийшлася на другу годину двогодинної інкубації гангліїв в наф-

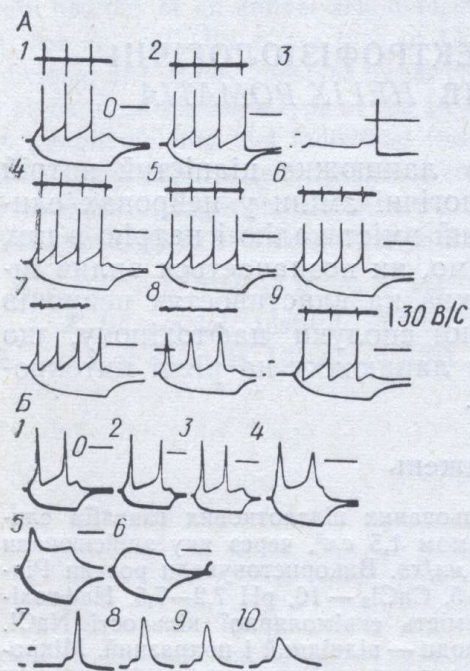


Рис. 1. Дія нафтохінону на гігантські нейрони слимака.

Зверху вниз: перша похідна потенціалу дії (тільки для А), нульовий рівень потенціалу спокою; відповідь нейрона на де- і гіперполяризуючі поштовхи струму. А — перший нейрон; 1 — у нормі; 2, 4 — на 5, 15, 30, 60, 90, 120 хв дії нафтохінону; 3 — спонтанна активність нейрона на 6 хв дії нафтохінону; 9 — відповідь нейрона на 45 хв відмивання нормальним розчином Рінгера. Сила струму подразнення $5 \cdot 10^{-9}$ а. Б — другий нейрон: 1 — у нормі; 2—5 — на 5, 30, 60, 120 хв дії нафтохінону; 6 — на 40 хв відмивання нормальним розчином Рінгера; 7—10 — спонтанна активність нейрона, відповідно на 60, 75, 90, 120 хв дії нафтохінону. Сила струму подразнення — $8 \cdot 10^{-9}$ а. На початку осцилограм АЗ, А9, Б7 калібрувальний імпульс 20 мВ, 50 мс.

тохіноні. Дещо відмінною була кінетика зміни АЕП: в перші хвилини його амплітуда зменшилася, потім відновилася до вихідного значення і залишалася деякий час незмінною, а в останні півгодини інкубації зменшилася повторно (рис. 1, А, 2—8).

Навіть тривале відмивання гангліїв розчином Рінгера лише частково відновило величини досліджуваних параметрів (рис. 1, А, 9).

В кількох випадках, а саме на восьми нейронах з 51 дослідженого, спостерігали дещо відмінну кінетику електрофізіологічних змін під час дії нафтохінону при збереженні аналогічних умов дослідження (рис. 1, Б). В цих випадках у перші півгодини ПС, амплітуда ПД, порогова деполяризація, латентний період і АЕП також зменшились (рис. 1, Б, 1—3). Але дальша інкубація в нафтохіноні викликала часткову реполяризацію мембрани нейрона і збільшення АЕП, причому на протязі другої години амплітуда АЕП продовжувала зростати і перевищила вихідну, а ПС знову зменшився (рис. 1, Б, 7). Спонтанні пікові ПД в міру дії інгібітора зменшувались за амплітудою і розтягувались, а величина і форма препотенціалу не змінювалась (рис. 1, Б, 7—10). Очевидно, зниження порога і деполяризація нейрона створили сприятливі умови для прояву збудження, що надходить з якогось іншого, «пейсмейкерного», нейрона, в розвитку спонтанних ПД. Відмивання розчином Рінгера на протязі 40 хв частково відновило ПС і АЕП нейрона, але ПД продовжували зменшуватись і кінець кінцем зникли, хоча нейрон ще генерував анодрозмікальні потенціали (рис. 1, Б, 6).

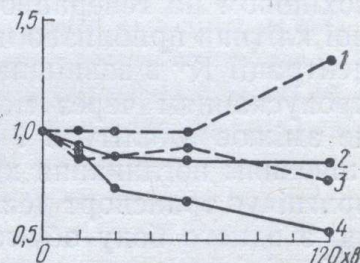
Такий тип реакції, якщо судити з кінетики електрофізіологічних змін, характеризується істотними відмінностями лише на деяких етапах, і, очевидно, може розглядатися як типовий випадок дії нафтохінону, але

з більш вираженою стабілізацією величини ПС і АЕП після початкового зменшення. Виявлені відмінності не пов'язані з типом нейрона за його відповіддю на дію ацетилхоліну, що обумовлюється особливостями мембрани (Н- і Д-нейрони) [7], оскільки обидва описані нейрони, як це показала проба на ацетилхолін, належали до Д-типу.

Як відзначалося раніше, просте збільшення сили струму подразнення не відновлювало генерації ПД нейронами, що втратили (або в яких знизилася) збудливість внаслідок дії інгібітора. Тривале ж пропускан-

Рис. 2. Зміни середніх нормованих експериментальних і теоретичних значень електрофізіологічних характеристик нейронів слимака при дії нафтохінону.

1 — рівноважний натрієвий потенціал; 2 — потенціал спокою (експериментальне значення); 3 — теоретичне значення потенціалу спокою; 4 — овершут потенціалу дії.



ня гіперполяризаційного струму, тобто штучне підвищення ПС нейрона на 20—30 мв, тимчасово відновлювало їх здатність до електрогенезу.

Дія нафтохінону викликала зміну у вмісті К і Na в нейронах. В перерахунку на клітинну воду внутріклітинна концентрація К в нормі становила $118,8 \pm 4,1$ ммоль ($n=35$, $p<0,05$), а Na — $33,8 \pm 2,0$ ммоль ($n=35$, $p=0,06$). В міру дії нафтохінону концентрація К зменшувалася і становила на 15, 30, 60 та 120 хв відповідно $92,0 \pm 5,1$; $95,4 \pm 4,8$; $99,3 \pm 3,4$; $79,6 \pm 4,2$ ммоль ($n=22-35$, $p \leq 0,05$). Кількість же Na в нейронах на протязі першої години дії інгібітора статистично достовірно не змінилася, а після двогодинної інкубації зменшилася до $25,9 \pm 2,2$ ммоль ($n=27$, $p=0,07$). Процентний вміст клітинної води (82—83%) при дії нафтохінону статистично достовірно не змінився.

Обговорення результатів досліджень

Аналізуючи одержані дані, ми розраховували величини потенціалів рівноваги для іонів К і Na нейронів слимака в нормі і в міру дії інгібітора. При розрахунках припускали, що кількість зв'язаного калію і натрію в нейронах під впливом нафтохінону не змінювалася, а всі зміни вмісту іонів, спостережувані в дослідах, виникли за рахунок перерозподілу фракції вільних іонів. З допомогою модифікованого рівняння Гольдмана [5] розраховували теоретичну величину ПС в нормі і для різних строків інкубації нейронів у розчині інгібітора. Порівнювали зміни електрофізіологічних характеристик, одержані безпосередньо в дослідах, із змінами цих же розрахованих параметрів. Деполяризація нейронів під впливом нафтохінону задовільно описується зміною теоретичної величини ПС (рис. 2, 2, 3) і, судячи з кінетики зміни калієвого рівноважного потенціалу, обумовлена, головним чином, зменшенням калієвого градієнта. Оскільки зменшення ПС на початку інкубації супроводжувалося зниженням вхідного опору, очевидно, в цей період деполаризуюча дія нафтохінону посилювалася збільшенням натрієвої проникності мембрани. Збільшення це тимчасове, бо пізніше опір зростав, а величина ПС стабілізувалася, або навіть спостерігалася часткова реполяризація. Оскільки весь цей час нейрони продовжували втрачати клітинний калій, а зростання опору супроводжувалося відновленням або уповільненням зменшення ПС, навряд зміни проникності на пізніших етапах дії нафтохінону можна пов'язувати з калієвою проникністю мембрани.

При порівнянні кінетики і направленості змін овершута ПД та величини рівноважного натрієвого потенціалу стає очевидним, що пригнічення і зменшення ПД під час дії нафтохінону не може обумовлюватися змінами натрієвого градієнта (рис. 2, 1, 4). Можна припустити, що пригнічення генерації ПД частково було викликане деполяризацією нейрона в цих умовах, оскільки реполяризація мембрани до ПС, що наближався за величиною до вихідного рівня, справляла відновлюючу дію на генерацію ПД. Проте пригнічуючий вплив деполяризації мембрани нафтохіноном на генерацію ПД незначний, оскільки деполяризація інтактної клітини приблизно на таку ж величину з допомогою збільшення концентрації K^+ в зовнішньому середовищі [2], як і зниження ПС тривалим пропусканням через мембрану соми деполяризуючого струму, істотно не змінює амплітуди і форми ПД. Оскільки нафтохінон поряд з пригніченням поглинання кисню і зниженням внутріклітинного вмісту АТФ пригнічує транспорт деяких попередників РНК, ДНК, білків і полімерів, що з одного боку обумовлено відокремленням транспорту цих метаболітів від ланцюга переносу електронів, а з іншого — безпосереднім мембранним ефектом інгібітора, при якому порушуються ліпідно-білкові зв'язки в мембранах [6], то можна припустити, що пригнічення ПД, головним чином, пов'язано з порушенням деяких процесів у мембрані, які безпосередньо відповідають за генерацію ПД, що в умовах фіксації напруги пов'язують з порушенням активації каналів вхідного струму.

Заслуговує на увагу порівняльний аналіз впливу на електрофізіологічні характеристики нейронів слимака ціаністого натрію [1] і нафтохінону. Дія обох інгібіторів характеризується рядом загальних закономірностей, а саме: зменшенням ПС, пригніченням ПД, зміною опору мембран, причому на відповідних етапах інкубації нейронів у нафтохіноні опір мембрани, як і при дії ціаніду, збільшується однаковою втраченою внутріклітинного калію, хоч зниження калієвого градієнта в різній мірі визначає деполяризацію нейрона. Зміни ж натрієвого градієнта під впливом цих інгібіторів мають різну направленість і інтенсивність, але в обох випадках не описують пригнічення ПД. Характерні загальні риси зміни електрофізіологічних параметрів, очевидно, свідчать про їх однакову обумовленість внаслідок дії інгібіторів, так як кінець кінцем і ціаністий натрій і нафтохінон, різні за хімічною природою і точками прикладання в ланцюгові передачі електронів, є інгібіторами клітинного дихання.

Література

1. Акімов Ю. А. Влияние цианистого натрия на электрофизиол. свойства гигантских нейтронов виноградной улитки. — Физиол. журн. СССР, 1972, 58, 1355—1361.
2. Герасимов В. Д., Костюк П. Г., Майский В. А. Изменение электрических характеристик мембраны гигантского нейрона при увеличении наружной концентрации ионов калия. — Биофизика, 1965, 10, 272—280.
3. Ayrapetyan S. N. On the regulation of the mechanism of rhythmic activity of Helix neurones. — Neurobiology of Invertebrates, Tihany, 1971, p. 81—92, 1973.
4. Ball E. G., Anfisen C. B., Cooper O. The inhibitory action of naphthoquinone on respiratory processes. — J. Biol. Chem., 1947, 168, 257—270.
5. Hodgkin A. L., Horowicz P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. — J. Physiol., 1959, 148, 127—160.
6. Olenick J. G., Hahn F. E. Bactericidal action of a 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinone blockade of metabolite permeation across the membrane. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, 235, 542—552.
7. Tauc L., Gerschenfeld H. M. A cholinergic mechanism of inhibitory synaptic transmission in a molluscan nervous system. — J. Neurophysiol., 1962, 25, 236—262.

Відділ нервово-м'язової фізіології
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
8.IV 1976 р.

Ju. A. Akimov

EFFECT OF NAPHTHOQUINONE ON ELECTROPHYSIOLOGICAL
PROPERTIES OF *HELIX POMATIA* NEURONS

Summary

Naphthoquinone depolarized snail neurons, decreased an amplitude and inhibited the action potential generation and finally decreased the input resistance of the cell membrane. The inhibitor evoked a gradual decrease in the intracellular potassium content and by the end of 2 hours' incubation the cells lost a considerable amount of sodium as well.

Depolarization of neurons by naphthoquinone was suggested to be mainly due to the decrease in potassium concentration gradient and it intensified at different stages by increasing the sodium permeability of the membrane. Possible reasons for the action potential inhibition under the influence of inhibitor are discussed.

Department of Nervimuscular Physiology,
the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR