

УДК 612.014.423:612.273.2

В. И. Богомолец

ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Вопрос о чувствительности клетки к снижению парциального давления кислорода (P_{O_2}) в окружающей среде имеет как общебиологическое, так и большое практическое значение. Известно, что степень этой чувствительности зависит от интенсивности метаболизма и базируется на основных свойствах клеточной мембраны нейронов. Получены данные, свидетельствующие о способности нейронов холоднокровных животных реагировать на изменения газового состава инкубационной среды [7—9, 13—15]. Снижая P_{O_2} в растворе, омывающем изолированный ганглий морского моллюска аплизии до уровня, при котором внутриклеточное P_{O_2} достигало 5—7 мм рт. ст., авторы отмечали прогрессирующую деполяризацию этих нейронов и временное усиление импульсной тонической активности [11]. Такие же обратимые изменения импульсной активности характерны и для изолированного медленноадаптирующегося рецептора растяжения речного рака при снижении P_{O_2} в наружном (изотоническом растворе) до 2,5—12 мм рт. ст. [2, 19]. Механизм указанной деполяризации остался не выясненным.

Мы исследовали влияние снижения напряжения кислорода на нервные ганглионарные клетки наземного моллюска — (виноградской улитки). Измеряли уровень мембранного потенциала и характер импульсной активности.

Методика исследований

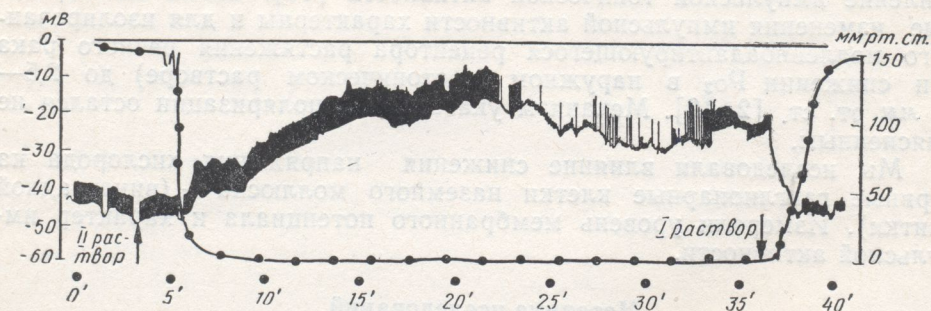
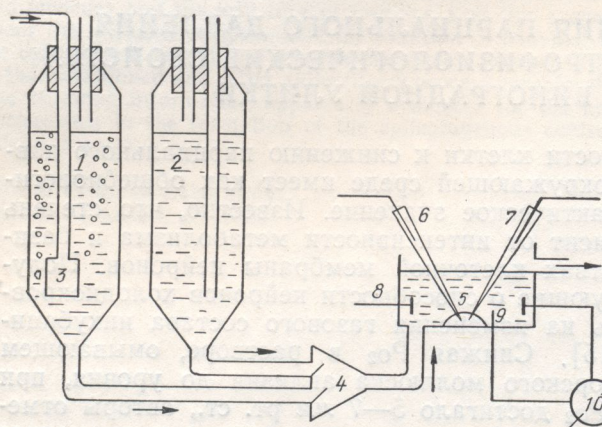
Опыты проводились на изолированном ганглии виноградской улитки (*Helix pomatia*), который помещался в открытую камеру с проточным изотоническим раствором ($NaCl$ —90, KCl —5 и $CaCl_2$ —10 ммоль, трис-буфер, pH—6,9). Раствор поступал поочередно из двух различных бюреток. В первой из них P_{O_2} раствора был равен атмосферному — около 152 мм рт. ст. Во второй находился раствор, снижение P_{O_2} которого достигалось продуванием через сатуратор аргона (рис. 1) [16, 17]. Напряжение кислорода в бюретке регулировалось скоростью подачи аргона, контролируемой газометром. P_{O_2} в камере измеряли остеклованным электродом, находящимся в непосредственной близости от препарата [18]. Объем камеры составлял 2,8 мл, а скорость подачи раствора 1,85 мл/мин. Полное замещение растворов в камере происходило в течение 3 мин. При заданной скорости перфузии кислород из окружающего воздуха не успевал диффундировать в толщу раствора открытой камеры, поэтому P_{O_2} в ней не отличалось от наблюдаемого в продуваемой газом бюретке. Пропуская в камеру раствор из одной или другой бюретки, можно создавать для нейронов нормоксическую (раствор I) либо гипоксическую (раствор II) среду по отношению к атмосферному воздуху. Пропуская аргон со скоростью 2 л/мин, можно снизить P_{O_2} раствора в камере почти до нуля; pH данного раствора изменялся в малых пределах (6,9—7,4).

Исследования проведены на 90 идентифицированных нейронах висцеральных ганглиев виноградской улитки. Отведение электрических потенциалов осуществлялось с помощью микроэлектродной техники [4, 5]. Сопротивление электродов составляло 5 — 10 МОм. Регистрирующая аппаратура состояла из усилителя постоянного тока с катод-

ным повторителем (УПТ-2, сеточный ток $5 \cdot 10^{-11}$ А), осциллографа С1-18 и чернильного самописца КСП-4 (пробег каретки 1 с). Потенциал индифферентного электрода в гипоксическом растворе не изменялся.

Результаты исследований

Полученные данные показали, что все исследуемые клетки можно разделить на две группы: «молчащие» нейроны, т. е. не генерирующие спонтанные потенциалы действия, и нейроны, имеющие ту или иную



форму активности. Мембранный потенциал покоя молчащих нейронов составлял $60,5 \pm 3,7$ мВ, активных $54,0 \pm 4,2$ мВ (см. таблицу). При снижении P_{O_2} в растворе инкубации от 152 до 1–2 мм рт. ст. нейроны начинали деполяризоваться. МП для первой группы составлял $34,5 \pm 4,1$, а для второй — $33,7 \pm 2,5$ мВ. Деполяризация начиналась через 1,3–1,5 мин после переключения на второй раствор и развивалась со скоростью 2–3 мВ/мин в течение 12–15 мин. Вслед за этим мембранный потенциал стабилизировался и сохранялся на низком уровне в течение 10–15 мин инкубации в гипоксическом растворе. Дальнейшее содержание ганглия в гипоксическом режиме приводило к некоторым колебаниям мембранного потенциала с тенденцией к реполяризации;

однако, средняя величина МП была низкой. При переключении на нормоксический раствор нейроны через 1,3—1,7 мин начали резко реполяризоваться. Время реполяризации до исходного уровня составляло 5—7 мин, а скорость — 5—7 мВ/мин (рис. 2).

Импульсная активность нейронов при резком снижении P_{O_2} в инкубирующей среде также изменялась. Наиболее характерным было

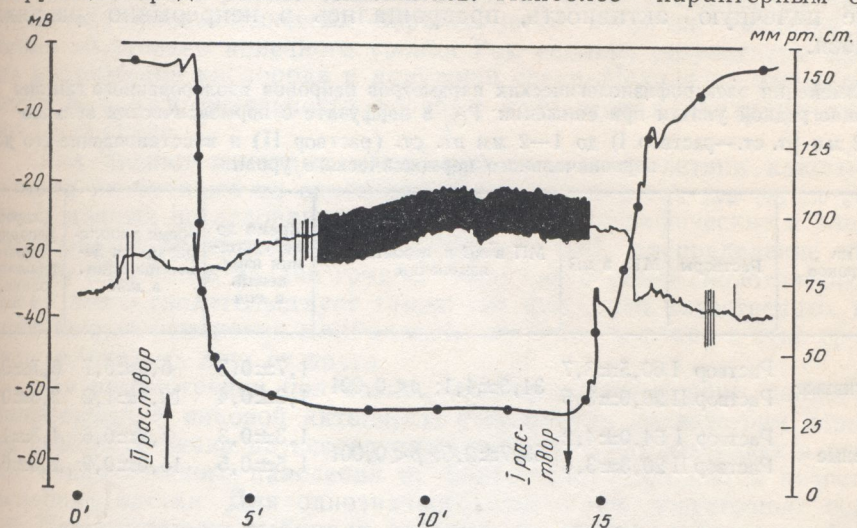


Рис. 3. Трансформация неритмичной активности нейрона висцерального ганглия виноградной улитки в ритмичную при снижении P_{O_2} в наружном растворе. Обозначения см. рис. 2.

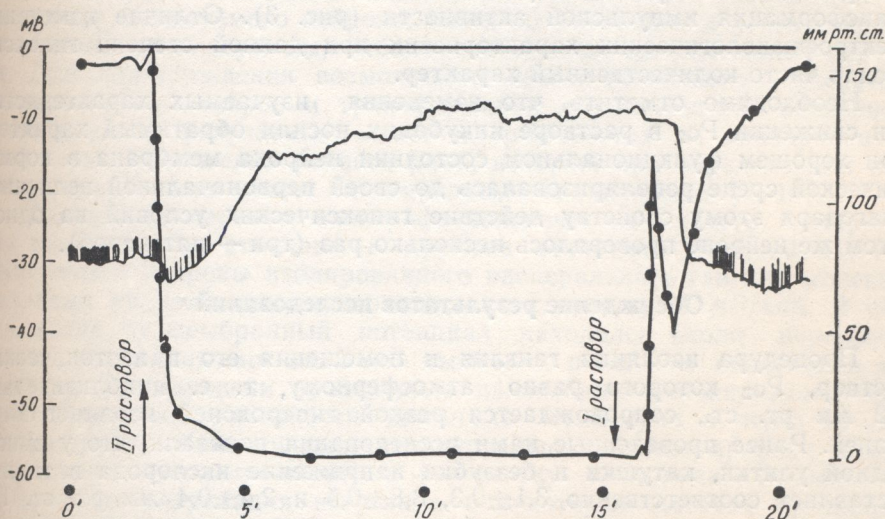


Рис. 4. Блок импульсной активности ганглионарного нейрона при снижении P_{O_2} в наружном растворе. Обозначения см. рис. 2.

усиление активности на фоне транзиторной и стабилизирующей стадиях деполяризации (рис. 3). Учащение разрядов в некоторых нейронах с низким исходным уровнем мембранного потенциала сопровождалось полным ее блоком (рис. 4). У некоторых неактивных нейронов гипоксия вызвала вначале единичные нерегулярные пики, частота ко-

торых со временем увеличивалась, и они превращались в ритмично разряжающиеся. В другой части таких нейронов, деполяризация, даже довольно глубокая, не сопровождалась появлением пиков. Наибольшую вариабильность реакций проявляли нейроны, имеющие неритмичную активность. При снижении P_{O_2} она могла трансформироваться в ритмичную, а потом вновь в нерегулярную. Наконец, нейроны, имеющие пачечную активность, превращались в непрерывно разряжающиеся.

Изменения электрофизиологических параметров нейронов изолированного ганглия виноградной улитки при снижении P_{O_2} в перфузате с нормоксических величин (152 мм рт. ст.—раствор I) до 1—2 мм рт. ст. (раствор II) и восстановление его до первоначального нормоксического уровня

Тип нейронов	Растворы	МП, в мВ	МП в мВ и вероятность изменения	Время до наступления изменений, в мин	Время реполяризации и деполяризации, в мин	Скорость реполяризации и деполяризации, в мин
Неактивные	Раствор I $60,5 \pm 3,7$	$34,5 \pm 4,1$; $p < 0,001$		$1,7 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,3$
	Раствор II $26,0 \pm 3,5$			$1,3 \pm 0,4$	$12,1 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,2$
Активные	Раствор I $54,0 \pm 4,2$	$33,7 \pm 2,5$; $p < 0,001$		$1,3 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,6$	$4,8 \pm 1,5$
	Раствор II $20,3 \pm 3,4$			$1,5 \pm 0,5$	$15,0 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,6$

В отдельной серии экспериментов P_{O_2} инкубационного раствора снижали до 20—25 мм рт. ст. В этих условиях также происходила деполяризация мембраны нейронов и описанная выше характерная трансформация импульсной активности (рис. 3). Отличие изменений электрофизиологических характеристик при данной степени гипоксии носило чисто количественный характер.

Необходимо отметить, что изменения изучаемых характеристик при снижении P_{O_2} в растворе инкубации носили обратимый характер. При хорошем функциональном состоянии нейрона мембрана в нормоксической среде реполяризовалась до своей первоначальной величины. Благодаря этому свойству действие гипоксических условий на одном и том же нейроне проверялось несколько раз (три — пять проб).

Обсуждение результатов исследований

Процедура изоляции ганглия и помещения его в изотонический раствор, P_{O_2} которого равно атмосферному, т. е. приблизительно 152 мм рт. ст., сопровождается резкой гипероксией изолированных тканей. Ранее проведенные нами исследования показали, что у виноградной улитки, катушки и беззубки напряжение кислорода в тканях составляет соответственно $3,1 \pm 0,3$, $3,8 \pm 0,5$ и $2,4 \pm 0,4$ мм рт. ст. P_{O_2} в гемолимфе у этих животных было несколько выше: у виноградной улитки оно составляло $21,0 \pm 1,8$, а в катушке — $6,9 \pm 0,2$ мм рт. ст. [3]. Изменение газовой среды, по-видимому, вызывает перестройку биохимических и физиологических процессов в ганглионарных нейронах, однако, хорошее функциональное состояние изолированных ганглионарных клеток, оцененное благодаря стабильности электрофизиологических параметров (как по нашим, так и по литературным данным [4, 5, 6]), заставляет предположить, что нейроны способны адаптироваться к новым газовым условиям искусственной среды.

В наших исследованиях снижение P_{O_2} в растворе доводилось до двух уровней: до 1—2 мм рт. ст., т. е. создавались гипоксические условия, и до 20—25 мм рт. ст., т. е. до уровня напряжения кислорода в гемолимфе улитки. Снижение мембранного потенциала происходило как в первом, так и во втором случаях, хотя при гипоксии деполяризация была более глубокой. Из этого можно сделать вывод, что изменения электрофизиологических характеристик нейронов является следствием не столько конечного уровня P_{O_2} , сколько результатом изменения напряжения кислорода в наружной среде. Исходя из этого, можно говорить о чувствительности нервных элементов к быстрому изменению P_{O_2} в среде.

Для оценки типичных изменений при воздействии какого-либо фактора необходимо их сопоставление в одних и тех же типах нейронов. В данных исследованиях применялись топографические и электрофизиологические критерии идентификации [6], распределение нейронов при обработке на две группы было чисто феноменологическим. В пользу этого свидетельствует также тот факт, что качественные и количественные изменения мембранного потенциала покоя в этих группах мало отличались друг от друга.

При рассмотрении полученных данных встает вопрос, является ли трансформация пиковой активности результатом воздействия перепада P_{O_2} непосредственно на исследуемый нейрон, либо возникает в результате синаптического наведения от более чувствительной к недостатку кислорода клетки. Для однозначного ответа нет достаточных оснований. Первоначально выбирали нейроны, не имеющие наведенной тонической активности. Однако, в ряде случаев в процессе изменения напряжения кислорода они начинали генерировать возбуждающие постсинаптические потенциалы. Это может свидетельствовать как об активации исследуемого нейрона, так и об активации другого нейрона, связанного с исследуемым, либо об облегчении синаптической передачи. Для подтверждения возможности непосредственного воздействия на исследуемый нейрон и трансформации его тонической активности могут служить результаты опытов, проведенных на изолированных рецепторах растяжения речного рака, который при определенном способе препаровки не может активироваться синаптически [2, 19].

Сходные изменения электрофизиологических свойств нейронов при снижении P_{O_2} отмечены и другими авторами [7, 9, 10, 11, 15]. «Молчащие» нейроны изолированного висцерального ганглия морского моллюска аплизии деполяризовались со скоростью 1 мВ/мин. В случае, когда их мембранный потенциал находился около порогового уровня, деполяризация на 5 мВ вызывала появление спонтанной активности. При аноксии происходила дальнейшая деполяризация, частота импульсной активности достигала максимума и через 13 мин прекращалась. Синаптически активируемые нейроны аплизии оказались менее чувствительными к недостатку кислорода. Вызываемая аноксией деполяризация встречала в некоторых клетках противоположный, синаптически навязанный процесс реполяризации за счет частых тормозных постсинаптических потенциалов. Блок активности в этом случае наступал только через 45 мин. Эти изменения, так же как и в нейронах виноградной улитки, носили обратимый характер. При восстановлении P_{O_2} в инкубирующей жидкости к 152 мм рт. ст. активность нейронов возобновлялась. Латентный период активации составлял 3—7 мин.

Методом дифференциальной микроспектрофотометрии измерено P_{O_2} внутри нейрона аплизии [13, 14]. Показано, что снижение внутрикле-

точного P_{O_2} на 3—5 мм рт. ст. приводило к снижению или к повышению мембранного потенциала на 1 мВ. Отношение МП/ P_{O_2} внутрикл. имеет наибольшее значение, когда P_{O_2} внутрикл. приближалось к нормоксическому.

Для выяснения причин деполяризации нейронов при снижении напряжения кислорода в наружной среде было исследовано состояние ионной проницаемости цитоплазматической мембраны, которое определяли методом измерения входного сопротивления нейрональных мембран [12]. На ганглии аплизии показано, что повышение P_{O_2} в среде инкубации от 20 до 550 мм рт. ст. снижает входное сопротивление ритмично разряжающихся нейронов почти в два раза. В нейронах с синаптическими входами, имеющих нерегулярную активность, сопротивление, наоборот, повышалось.

Выводы

1. Быстрое снижение P_{O_2} в среде инкубации с нормоксических величин для атмосферного воздуха до 1—2 мм рт. ст. вызывало деполяризацию нейронов изолированного ганглия виноградной улитки. Транзиторная фаза ее следовала через 1,3—1,5 мин после начала перфузии гипоксическим раствором и развивалась со скоростью 2—3 мВ/мин в течение 12—15 мин. Величина деполяризации для неактивных нейронов составляла $34,5 \pm 4,1$, а для активных — $33,7 \pm 2,5$ мВ.
2. При дальнейшем содержании ганглия в гипоксическом режиме показатели МП стабилизировались и оставались низкими.
3. Быстрое восстановление P_{O_2} в среде инкубации к нормоксическому приводило через 1,3—1,7 мин к реполяризации нейронов, которая развивалась со скоростью 5—7 мВ/мин. В течение 5—7 мин МП достигал своей исходной величины.
4. Импульсная активность нейронов в гипоксической среде резко усиливалась. В нейронах с низким исходным уровнем МП активация могла оканчиваться полным блоком.

Литература

1. Березовский В. А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека.— Киев: Наукова думка, 1975.—279 с.
2. Богомолец В. И. Влияние изменения газового состава среды на электрофизиологические свойства нейронов беспозвоночных животных.— В кн.: Кислородный гомеостаз и кислородная недостаточность. Киев: Наукова думка, 1978, с. 55—66.
3. Богомолец В. И., Журавлева Н. Н., Сушко Б. С. Напряжение кислорода в крови и тканях некоторых беспозвоночных.— Физиол. журн. АН УССР, 1978, 24, № 3, с. 343—347.
4. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника.— Киев: Изд-во АН УССР, 1960.—125 с.
5. Майский В. А. Электрические характеристики поверхностной мембраны гигантских нервных клеток *Helix pomatia*.— Физиол. журн. СССР, 1963, 49, № 12, с. 1468—1474.
6. Сахаров Д. А. Генетология нейронов.— Ж.: Наука, 1974.—180 с.
7. Arvanitaki-Chalazonitis A., Chalazonitis N. Differentiation modales des activite's electriques, par variation de la pression partielle de l'oxygene, sur trois neurones identifiables (*Aplysia delipans*).—Compt. Rend. Acad. Sci., 1965, 261, p. 548—551.
8. Arvanitaki A., Romey G., Takeuchi H. Variations de la relations caracteristique $v(i)$ de la neuromembrane en fonctionnelles.—Compt. Rend. Soc. Biol., 1967, 161, N 7, p. 1629—1641.
9. Chalazonitis N. Chemopotentials des neurones geant fonctionnelement differences.— Arch. sci. physiol., 1959, 13, p. 41—78.
10. Chalazonitis N. Chemopotentials on giant nerve cells (*Aplysia fasciata*).—In: Nervous inhibition. Proc. second friday harbor symposium. Oxford, London, New York, Paris / Ed. Ernst Eloreay: Pergamon press., 1961, p. 179—193.
11. Chalazonitis N. Effect of changes in P_{CO_2} and P_{O_2} on rhythmic potentials from giant neurons.—Ann. New York Acad. Sci., 1963, 109, p. 451—479.

12. Chalazonitis N. Effects des pressions partielles de l'oxygene sur le potentiels et la conductance de la membrane du soma neuronique dans les conditions d'hyperoxie» (neurones identifiables d'Aplysia).—Compt. Ren. Soc. Biol., 1964, 158, 2394—2399.
13. Chalazonitis N. Stimulation and depression of neurones by change in gas partial pressures und in pH.—J. Physiol. (Lond.), 1969, 202, 2—3 P.
14. Chalazonitis N., Gola M. Enregistrements simultanes de la PO_2 intracellulaire et de l'autoactivite electrique du neurone geant (Aplysia depilans).—Compt. Ren. Soc. Biol., 1965, 159, N 8—9, p. 1770—1776.
15. Chalazonitis N., Sugaya E. Effects anoxiques sur l'autoactivite electrique des neurones geants d'Aplysia.—Compt. Rep. Acad. Sci., 1958, 247, p. 1495—1497.
16. Dautrebande L. Microaerosols.—New York : Acad. Press, 1962.—153 p.
17. Euler U. S., Heymans C. An oxygenator for perfusion experiments.—J. Physiol. (Lond.), 1931, 74, N 7, p. 1—2.
18. Giacobini E., Przybylski A. Studies on hypoxia in isolated neurons: I. An open chamber apparatus for studying the effect of hypoxia on isolated neuron preparations.—Inter. J. Neurosc., 1971, 1, p. 159—162.
19. Giacobini E., Przybylski A. Studies on hypoxia in isolated neurons: II. The effect of hypoxia on the impulse activity and the intracellular K/Na ratio of the slowly adapting stretch receptor neuron (SRN).—Inter. J. Neurosc., 1971, 1, p. 163—169.

Отдел физиологии дыхания
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
21.VI 1978 г.

V. I. Bogomoletz

THE INFLUENCE OF THE OXYGEN PARTIAL PRESSURE LOWERING
ON ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *HELIX POMATIA* NEURONS

Summary

The lowering of the O_2 partial pressure in the incubation solution from normoxic values to zero for atmospheric air caused depolarization of neurons in an isolated ganglion of *Helix pomatia*, the depolarization was persistent during perfusion of hypoxic solution. In inactive neurons hypoxia caused at first the appearance of unitary irregular spikes whose frequency increased with time. Activation of neurons with a low initial membrane potential level could be accompanied by its complete block. Bursting neurons changed to continuously discharging ones. The change in these characteristics under O_2 removal from the incubation solution for a limited time was reversible.

Department of Respiration Physiology,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev