

УДК 612.73:613.815

И. А. Владимирова, М. Ф. Шуба

**ДЕЙСТВИЕ АПАМИНА НА ТОРМОЗЯЩИЙ ЭФФЕКТ
НОРАДРЕНАЛИНА В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ**

В предыдущих наших работах [1, 2, 10] было показано, что апамин — полипептид пчелиного яда [9] — эффективно и обратимо блокирует неадренергическую (пуринергическую [6]) нервно-мышечную передачу торможения в гладких мышцах желудочно-кишечного тракта, а также гиперполяризующее действие экзогенной АТФ на эти мышцы. На фоне действия апамина интрамуральное раздражение сопровождается возникновением в мышечных клетках слепой кишки возбуждающих синаптических потенциалов (ВСП), устойчивых к адрено-, ацетилхолино- и серотониноблокаторам, а экзогенная АТФ вызывает деполяризацию этих мышечных клеток вместо гиперполяризации. В мышечных клетках желудка ВСП и АТФ-деполяризация не возникают на фоне действия апамина. Апамин не блокирует гиперполяризацию, вызываемую аденозином в мышечных клетках желудочно-кишечного тракта.

Недавно Бенкс и соавт. [5], подтвердив эти данные, обнаружили новые свойства апамина — способность его угнетать: а) расслабление мышечной полоски *taenia coli*, вызываемое раздражением симпатических нервов и α -адреномиметиком амидефрином; б) выход из печеночных клеток K^+ , стимулируемый норадреналином, АТФ и двухвалентным ионофором А-23187. При этом угнетение апамином расслабляющего действия амидефрина на мышечную полоску носит неконкурентный характер. На основании этих данных авторы предположили, что блокирование апамином упомянутых эффектов связано с угнетающим действием апамина на калиевую проницаемость мембраны, а не с действием его на восприимчивую часть адрено- или АТФ-рецепторов.

Учитывая важность этих данных, мы провели электрофизиологическое исследование действия апамина на тормозящий эффект норадреналина в гладких мышцах желудка и слепой кишки морской свинки.

Методика исследований

Исследования проводились на изолированных атропизированных мышечных полосках слепой кишки (продольные — *taenia coli* и кольцевые мышцы) и желудка морской свинки с помощью метода сахарозного мостика. Интрамуральное раздражение нервных образований, находящихся в толще мышечной полоски, производилось стимулами длительностью 0,2–0,5 мс.

Результаты исследований и их обсуждение

В нормальных условиях норадреналин вызывает в мышечных клетках слепой кишки гиперполяризацию, на фоне которой неадренергические тормозящие синаптические потенциалы (ТСП) мышечных клеток уменьшаются, а спонтанная активность их угнетается. Отмывание норадреналина сопровождается реполяризацией мышечных клеток и вос-

становлением амплитуды ТПС (рис. 1 и 2). Иногда реполяризация мышечных клеток переходит в значительную следовую депполяризацию, во время которой возникает либо усиливается спонтанная активность.

Апамин в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М блокирует неадренергические ТСП и в этих условиях интрамуральное раздражение сопровождается возникновением в мышечных клетках нехолинергических ВСП. На фоне

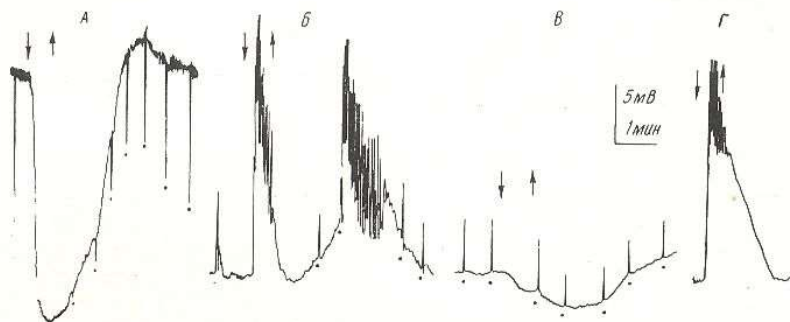


Рис. 1. Действие апамина на норадреналиновый эффект в гладкомышечных клетках атропинизированной мышечной полоски кольцевого слоя слепой кишки.

А — гиперполяризация и уменьшение неадренергических ТСП под влиянием норадреналина (10^{-6} М). Б — депполяризация, возникающая под влиянием норадреналина на 20 мин действия апамина ($5 \cdot 10^{-7}$ М). В — угнетение норадреналиновой депполяризации фентоламином на фоне действия апамина. Г — депполяризующее действие АТФ (10^{-3} М) в присутствии фентоламина и апамина. Точками отмечены возникновение неадренергических ТСП (А) и неадренергических и нехолинергических ВСП (Б, В) в ответ на интрамуральное раздражение полоски. Стрелка вниз — добавление в раствор Кребса исследованных веществ. Стрелка вверх — начало отмывания.

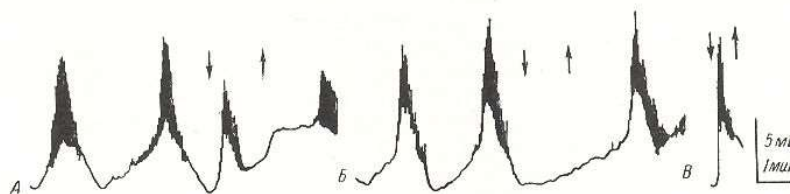


Рис. 2. Возбуждающее действие норадреналина и АТФ на мышечные клетки атропинизированной *taenia coli* в присутствии апамина.

А — депполяризация и появление спонтанной активности в мышечных клетках *taenia coli* под влиянием норадреналина (10^{-6} М) на 15 мин действия апамина. Б — блокирование норадреналиновой депполяризации гладкомышечных клеток фентоламином на фоне действия апамина. В — депполяризующее действие АТФ в присутствии в растворе Кребса апамина и фентоламина.

действия апамина норадреналин вместо гиперполяризации вызывает депполяризацию мышечных клеток (рис. 1, Б). Во время норадреналиновой депполяризации появляется или усиливается спонтанная активность мышечных клеток, а амплитуда ВСП уменьшается. Интересно заметить, что норадреналиновая депполяризация, достигнув максимальной величины, начинает постепенно уменьшаться, несмотря на продолжающееся действие норадреналина. Отмывание норадреналина ведет к устранению депполяризации, которая иногда переходит в небольшую гиперполяризацию, сменяющуюся длительной следовой депполяризацией. Особенности развития норадреналиновой депполяризации и последующих следовых реакций в ответ на отмывание норадреналина зависят от продолжительности действия норадреналина, его концентрации, исходной величины потенциала покоя мышечных клеток.

Исследования показали, что норадреналин вызывает гиперполяризацию в присутствии апамина. Действие норадреналина и фентоламина сохраняется и в присутствии апамина (рис. 1, В). Частично, активацией β -адренергических рецепторов.

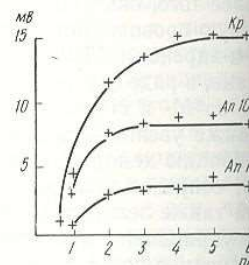


Рис. 3. Зависимость амплитуды ТСП от концентрации атропина.

По вертикали — амплитуда ТСП в мВ. По горизонтали — концентрация атропина в ppm.

Рис. 4. Гиперполяризующее действие апамина на мышечные клетки венозного синуса.

Для угнетения спонтанной активности.

β -адреноблокатором — ингибитором АТФ депполяризацию и ВСП. Раздражение на фоне апамина сопровождается спонтанной активностью.

В мышечных клетках гладкомышечной гиперполяризации, в противоположность гладкомышечным клеткам желудка интрамуральное раздражение вызывает ВСП, устойчивые к адренергическим агентам [2, 10].

Предварительные опыты показали, что в гладкомышечных клетках желудочно-кишечного тракта сходным образом на аденозинergic передачу тормозных эффектов. Судя, однако, по результатам исследований, что ТСП от интенсивности и на фоне действия апамина, видимо, не носит конкурентный характер. Можно предположить два вопроса, а именно: рецептор (α -адренергический) в нормальных условиях возбуждающие, и тормозящие.

Как известно, и в гладкомышечных клетках желудка увеличение калиевой по-

Исследования показали, что деполяризация мышечных клеток, вызванная норадреналином на фоне действия апамина, блокируется фентоламином. Действие норадреналина на мышечные клетки в присутствии апамина и фентоламина сопровождается небольшой гиперполяризацией, которая сохраняется и некоторое время после начала отмывания норадреналина (рис. 1, В). Частично эта гиперполяризация обуславливается, видимо, активацией β -адренорецепторов, поскольку она блокируется

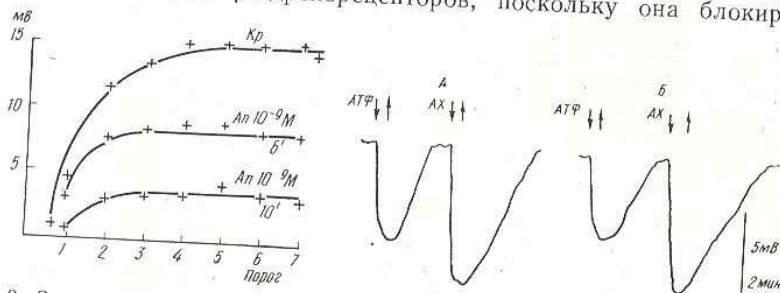


Рис. 3. Зависимость амплитуды неадренергических ТСП от интенсивности интрамурального раздражения атропинизированной мышечной полоски *taenia coli* до и на 6, 10 мин действия апамина.

По вертикали — амплитуда ТСП в мВ, по горизонтали — интенсивность интрамурального раздражения, выраженная в относительных порогах.

Рис. 4. Гиперполяризующее действие АТФ (10^{-4} М) и ацетилхолина (10^{-5} М) на мышечные клетки венозного синуса лягушки до (А) и на 10 минуте (Б) действия апамина (5×10^{-7} М).

Для угнетения спонтанных потенциалов действия к раствору Рингера добавляли 4 ммоль Mg^{++} .

β -адреноблокатором — индералом. Фентоламин и индерал не угнетают АТФ деполяризацию и ВСП, возникающие в ответ на интрамуральное раздражение на фоне апамина (рис. 1, Г). Часто действие фентоламина на фоне апамина сопровождается небольшой деполяризацией и увеличением спонтанной активности гладкомышечных клеток.

В мышечных клетках желудка апамин также угнетает норадреналиновую гиперполяризацию. На фоне же действия апамина норадреналин, в противоположность АТФ [10], вызывает деполяризацию в мышечных клетках желудка. Напомним, что в этих условиях в ответ на интрамуральное раздражение мышечные клетки желудка также не генерируют ВСП, устойчивые к адрено-, ацетилхолино- и серотониноблокаторам [2, 10].

Предварительные опыты показывают, что апамин блокирует и адренергическую нервно-мышечную передачу торможения в гладких мышцах желудочно-кишечного тракта. Таким образом, апамин действует сходным образом на адренергическую и пуринергическую нервно-мышечную передачу торможения, а также на АТФ- и норадреналиновый эффекты. Судя, однако, по кривой зависимости амплитуды пуринергических ТСП от интенсивности интрамурального раздражения в норме и на фоне действия апамина (рис. 3), блокирование ТСП апамином, видимо, не носит конкурентный характер. В этой связи уместно обсудить два вопроса, а именно: а) на какую часть комплекса ионный канал-рецептор (α -адрено- и АТФ-рецептор) действует апамин? Имеются ли в нормальных условиях в мембране гладкомышечных клеток и возбуждающие, и тормозящие α -адрено- и АТФ-рецепторы?

Как известно, и норадреналиновая, и АТФ-гиперполяризация гладкомышечных клеток желудочно-кишечного тракта обуславливаются увеличением калиевой проводимости мембраны [3, 4, 10]. Это обсто-

ятельство, а также тот факт, что обнаруженная нами на фоне действия апамина норадреналиновая деполяризация опосредуется через активацию α -адренорецепторов, как и в нормальных условиях норадреналиновая гиперполяризация [8], как будто подтверждают предположение о том, что блокирование апаминотормозящего норадреналинового и АТФ-эффектов связано с действием его не на воспринимающую часть соответствующих хеморецепторов, а на проводимость калиевых каналов мембраны, управляемых этими рецепторами [5]. Более того, оказалось, что в некоторых случаях апамин угнетает и ту калиевую проводимость мембраны, которая не управляется непосредственно α -адрено- и АТФ-рецепторами, либо вообще не связана с ними [5]. Однако, в ряде случаев апамин не оказывает заметного влияния, например на М- и Н-холиннергическую синаптическую передачу, при которой также увеличивается калиевая проводимость, опосредованная через активацию хеморецепторов [1, 5], а также на следовую гиперполяризацию, сопровождающую потенциалы действия, ВСП и т. д., в основе которой также лежит увеличение калиевой проводимости, которая, однако, не управляется хеморецепторами [10]. Более того, настоящие наши исследования показали, что в венозном синусе сердца лягушки апамин не блокирует не только ацетилхолиновую, но и АТФ-гиперполяризацию (рис. 4), хотя в обоих случаях гиперполяризация имеет калиевую природу. Все эти противоречия можно было бы объяснить предположением о том, что свойство, по крайней мере потенциалонезависимых калиевых каналов (хемочувствительных и утечки), неодинаковы, поскольку проводимость одних блокируется апаминотом, а других не блокируется. Происходит ли это блокирование на уровне воротного механизма (активационные ворота?) или на уровне самого канала (как при блокировании потенциалозависимого натриевого канала тетродотоксином), пока сказать трудно. Угнетение апаминотом по неконкурентному типу пуринергических ТСП (рис. 3) и расслабления *taenia coli*, вызываемое амидефрином [5], как будто подтверждают предположение о том, что апамин действует прямо на калиевую проводимость, уменьшая ее. Но тогда апамин должен бы в первую очередь блокировать открытые хемочувствительные (к АТФ и НА) калиевые каналы, закрывание которых, согласно нашим исследованиям, и обуславливает генерацию нехолиннергических ВСП и АТФ- и норадреналиновую деполяризацию на фоне действия апамина. Поэтому пока нельзя полностью исключить и возможность прямого действия апамина на какую-то активную часть хеморецепторов, являющуюся, видимо, общей для тормозящих α -адрено- и АТФ-рецепторов. Ведь α -адреноблокатор фентоламин в относительно больших концентрациях угнетает не только α -адреноэффекты, но и в ряде случаев АТФ-эффекты [7].

Следующий вопрос, заслуживающий внимания, состоит в следующем. В настоящее время известны три типа нервных влияний на двигательную активность желудочно-кишечного тракта: один возбуждающий — М-холиннергический, и два тормозящие — адренергический и пуринергический [7]. Апамин блокирует оба типа тормозящей передачи и в этих условиях в ответ на раздражение соответствующих нервов возникает ВСП вместо ТСП, а действие экзогенных норадреналина и АТФ вызывают деполяризацию, т. е. возбуждение вместо гиперполяризации, т. е. торможения. В этой связи возникает вопрос о том, существуют ли в естественных условиях возбуждающие α -адрено- и АТФ-рецепторы гладких мышц желудочно-кишечного тракта, или апамин модифицирует тормозящие α -адрено- и пуринергические рецепторы (или весь комплекс хеморецептор — ионный канал) таким образом, что их активация вызывает возбуждение вместо торможения. Данные наших исследований говорят о

том, что второе предположение на фоне действия апамина на фоне действия раздражающей мышечной по- никовением нехолиннергических условиях деполяризации ВСП, вызываемые интрамышечной полоской слепоты уменьшением, а не означает, что в спокойных АТФ-рецепторами в создании потенциала действия этих рецепторов веденалов, в результате чего В этой связи модификация бы привести к открыванию рецепторами, с тем, что ров каналы закрылись. гиперполяризации в ответнаблюдается, а даже ндеполяризацию мышечных

Следовательно, можнервно-мышечной переда- ника имеются два новыдачи, устойчивые к апамПервый осуществляетсярой — через активациюэтом α -адреноблокатормозящее действие норадействие, то можно преадреналина связано сров — α_1 и α_2 . Известно, фентоламинотом, их фарм

Характер развитияток под влиянием нораможной активации разнперполяризация, вызыва- но стабильной, тогда ка не сохраняется на по- вплоть до полного исчствие медиатора. Этое рецепторы, в отличие отторое, по крайней мере

Пока трудно что-двозбуждающих и тормсположить, что рецепторбыть и соответствующи и пуринергические двигторы пространственноответствующих двигателАТФ будет одновременщие α -адрено- и АТФтормозящий, как болеенальном значении возбо- кольку этот эффект с мембраны, ведущей к д

том, что второе предположение менее вероятно. И действительно, раздражение на фоне действия апамина соответствующих нервов атропинизированной мышечной полоски желудка никогда не сопровождалось возникновением нехолинергических ВСП, а экзогенная АТФ не вызывала в этих условиях деполяризацию мышечных клеток [2, 10]. Кроме того, ВСП, вызываемые интрамуральным раздражением атропинизированной мышечной полоски слепой кишки в присутствии апамина, обуславливаются уменьшением, а не увеличением калиевой проницаемости [10]. Это означает, что в спокойном состоянии калиевые каналы с возбуждающими АТФ-рецепторами находятся в открытом состоянии и участвуют в создании потенциала покоя (ПП) гладкомышечных клеток. Активация этих рецепторов ведет к закрыванию соответствующих калиевых каналов, в результате чего и возникает деполяризация мышечных клеток. В этой связи модификация адрено- и АТФ-рецепторов апином должна бы привести к открыванию калиевых каналов, управляемых этими хеморецепторами, с тем, чтобы при последующей активации хеморецепторов каналы закрылись. Но тогда следовало бы ожидать возникновения гиперполяризации в ответ на действие самого апамина. Однако это не наблюдается, а даже наоборот, иногда апин вызывает небольшую деполяризацию мышечных клеток.

Следовательно, можно полагать, что кроме известных трех типов нервно-мышечной передачи в гладких мышцах по крайней мере кишечника имеются два новых возбуждающих типа нервно-мышечной передачи, устойчивые к амину, — α -адренергический и пуринергический. Первый осуществляется через активацию α -адренорецепторов, второй — через активацию АТФ-рецепторов типа A_2 [10]. Поскольку при этом α -адреноблокатор фентоламин блокирует и возбуждающее, и тормозящее действие норадреналина, а апин только тормозящее его действие, то можно предположить, что противоположное действие норадреналина связано с наличием двух подтипов — α -адренорецепторов — α_1 и α_2 . Известно, что хотя α_1 и α_2 -адренорецепторы блокируются фентоламином, их фармакология различна [12].

Характер развития гипер- и деполяризации гладкомышечных клеток под влиянием норадреналина и АТФ также свидетельствует о возможной активации разных типов АТФ и α -адренорецепторов. Так, гиперполяризация, вызываемая этими веществами, является относительно стабильной, тогда как деполяризация, достигнув своего максимума, не сохраняется на постоянном уровне, а постепенно уменьшается, вплоть до полного исчезновения, несмотря на продолжающееся действие медиатора. Это означает, что возбуждающие α -адрено- и АТФ рецепторы, в отличие от тормозящих, обладают, видимо, свойством, которое, по крайней мере внешне, похоже на десенситизацию.

Пока трудно что-либо сказать о пространственном распределении возбуждающих и тормозящих α -адрено- и АТФ-рецепторов. Если предположить, что рецепторы пространственно разделены, то тогда должны быть и соответствующие возбуждающие и тормозящие адренергические и пуринергические двигательные нервные волокна. Если же эти рецепторы пространственно не разделены, то тогда выделившийся из соответствующих двигательных нервных терминалей норадреналин или АТФ будет одновременно активировать и возбуждающие, и тормозящие α -адрено- и АТФ-рецепторы. Результирующий же эффект будет тормозящий, как более сильный. Тогда возникает вопрос о функциональном значении возбуждающего эффекта. Надо полагать, что, поскольку этот эффект связан с уменьшением калиевой проводимости мембраны, ведущей к деполяризации мышечных клеток, то этим самым

он будет усиливать тормозящее действие медиатора, связанное с увеличением калиевой проводимости мембраны, ведущей к гиперполяризации гладкомышечных клеток.

Авторы выражают глубокую благодарность академику П. Г. Костюку за ценные консультации в процессе проведения настоящих исследований и при подготовке рукописи к печати, а также докт. хим. наук А. И. Мирошникову (Институт биоорганической химии АН СССР) за предоставленный апамин.

Л и т е р а т у р а

1. Байдан Л. В., Владимиров А. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. Действие апамина на синаптическую передачу в различных типах синапсов.— ДАН СССР, 1978, 241, № 5, с. 1224—1227.
2. Владимиров А. А., Шуба М. Ф. Влияние стрихнина, гидрастина и апамина на синаптическую передачу в гладкомышечных клетках.— Нейрофизиология, 1978, 10, № 3, с. 295—299.
3. Шуба М. Ф. Ионный механизм действия адреналина и ацетилхолина на электрические свойства гладкомышечных клеток.— В кн.: О значении гуморальных факторов в синаптической передаче возбуждения.— Казань: Материалы симпозиума, 1965, с. 159—161.
4. Шуба М. Ф., Клевец М. Ю. Ионный механизм действия адреналина и норадреналина на гладкомышечные клетки.— Физиол. журн., 1967, 13, № 1, с. 3—11.
5. Banks B. E. C., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. M., Jenkinson D. H. Apamin blocks certain neurotransmitter induced increases in potassium permeability.— Nature, 1979, 282, p. 415—417.
6. Bennett M. R. Autonomic neuromuscular transmission.— Cambridge: University Press, 1972.—295 p.
7. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor.— In: Cell membrane receptors for drugs and hormones. New York: Raven Press, 1979, p. 107—118.
8. Bülbring E., Tomita T. Increase of membrane conductance by adrenaline in the smooth muscle of guinea-pig Taenia coli.— Proc. Roy. Soc. B, 1969, 172, p. 89—102.
9. Habermann E. Bee and wasp genomes.— Science, 1972, 177, N 4046, p. 314—322.
10. Shuba M. F., Vladimirova I. A. Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to ATP and non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation.— Neuroscience, 1980, 5, N 5, p. 853—859.
11. Tomita T., Watanabe T. A comparison of the effects of adrenaline triphosphate with noradrenaline and with the inhibitory potential of the guinea-pig Taenia coli.— J. Physiol. (London), 1973, 231, N 1, p. 167—177.
12. Wikberg J. E. S. The pharmacological classification of adrenergic L₁ and L₂ receptors and their mechanism of action.— Acta physiol., scand. Suppl. 468, 1979, p. 6—99.

Отдел нервно-мышечной физиологии
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
10.XII 1979 г.

I. A. Vladimirova, M. F. Shub'a

EFFECT OF APAMIN ON NOREPINEPHRINE INHIBITORY ACTION IN SMOOTH MUSCLES

Summary

Norepinephrine (10^{-6} M) in the presence of apamin induces depolarization of the stomach and cecum smooth muscle cells. This depolarization as well as norepinephrine hyperpolarization of smooth muscle cells are blocked by phentolamine (10^{-6} M).

On the basis of these results two subtypes of α -adrenoreceptors—inhibitory and excitatory are supposed to exist in the membrane of smooth muscle cells. Effects induced by activation of the former are blocked by apamin, those induced by activation of the latter are resistant to apamin. Possible mechanisms of blocking action of apamin on the hyperpolarizing action of norepinephrine and ATP in smooth muscles are discussed.

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

УДК 612.13+612.73+612.816

М. И. Гуревич

ЗАВИСИМОСТЬ СОСУДИСТЫХ ОТ УРОВНЯ

Основой механизма, как известно, чувствительности к растяжению. Представлено А. Остроумовым и В. [17], Конради [7], Фолд результатами экспериментов числе и на сегментах симпатической иннервации на быстрое пассивное растяжение заметное повышение. Блокада обоих типов на направленности и в опубликованы данные, парата воротной вены гладкомышечных клеток с ними фазовых соотношений.

В плане выдвинутой гипотезы гладкомышечных клеток [2—6] существенности многогенного механизма ответа на этот вопрос влияния уровня окислительного растяжением сократительной способности.

На изолированных сегментах сосуда под действием препарата поддерживали непрерывную циркуляцию с уровнем P_{O_2} . Специально быстрого растяжения сосудов и мышц. Сократительную способность с помощью механического потенциометра и графическим методом.

Результаты

При перфузии препаратом Кребса (P_{O_2} в нормальном растяжении силой стенки проявляют ритм частотой 6—8 в мин и