

УДК 577.352.5:616—003.725:612.73

С. М. Тишкин, Л. В. Байдан, М. Ф. Шуба

ИОННЫЙ МЕХАНИЗМ ВОЗБУЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АТФ И НОРАДРЕНАЛИНА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ

Было установлено, что апамин блокирует неадренергическую передачу торможения, а также действие экзогенных АТФ и норадреналина (НА) в желудочно-кишечном тракте. При этом оказалось, что в гладкомышечных клетках слепой кишки в присутствии апамина в ответ на интрамуральное раздражение возникают нехолинергические возбуждающие синаптические потенциалы (ВСП), а экзогенные АТФ и НА вызывают деполяризацию [1, 2, 7, 12, 16]. Учитывая эти факты, а также одинаковую ионную природу тормозящего действия АТФ и НА [5, 6, 17], представляло интерес исследовать ионные механизмы возбуждающего действия этих веществ на гладкомышечные клетки.

Методика исследований

Опыты проведены на атропинизированных мышечных полосках слепой кишки морской свинки с помощью обычной методики двойного и одиночного сахарозного мостика. Смещение мембранного потенциала достигали пропусканием через гладкомышечные клетки поляризующего тока. Ионы натрия и хлора замещали в нормальном растворе Кребса эквимоллярным количеством трис-глутамата (рН 7,3). При удалении ионов кальция в бескальциевый раствор Кребса добавляли 0,5 ммоль ЭГТА для полного связывания остатков ионов Са и 12 ммоль/л Mg для стабилизации мембран [9].

Результаты исследований и их обсуждение

На фоне действия апамина при приложении АТФ (10^{-3} моль/л) и норадреналина ($3 \cdot 10^{-7}$ — $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л) наблюдается деполяризация гладкомышечных клеток (ГМК) кишечника (рис. 1). Во время развития этой деполяризации появляется или усиливается спонтанная активность мышечных клеток. После достижения максимальной величины деполяризация уменьшается, несмотря на присутствие в растворе АТФ и НА, и мембранный потенциал возвращается к потенциалу покоя. Однако довольно часто наблюдаются следовые явления, выражающиеся в некоторой гиперполяризации мембраны, переходящей в длительную небольшую деполяризацию с заметным усилением активности. Величина и длительность этих следовых изменений потенциала покоя в значительной степени зависят от времени действия веществ. Сопротивление мембраны во время действия АТФ существенно не изменяется, во время же действия НА сопротивление падает на 30—70 %.

Для выявления роли ионов натрия и хлора в АТФ и НА деполяризации наружный раствор Кребса заменяли раствором, в котором весь NaCl замещался эквимоллярными количествами трис-глутамата. Замена ионов натрия и хлора подобными крупными ионами приводила к постепенному увеличению сопротивления мембраны, которое к 10—15 мин достигало максимума и превышало исходную величину в 2—2,5 раза. В условиях двойного сахарозного мостика трудно судить об

изменениях потенциала покоя, поскольку замена ионов приводит к изменению диффузионных потенциалов на границе сахара — раствор Кребса. Учитывая, однако, тот факт, что при удалении ионов натрия и хлора сопротивление мембраны увеличивается, надо полагать, что мембрана гиперполяризуется, поскольку равновесные потенциалы этих ионов таковы, что их замещение ведет к увеличению потенциала покоя.

Известно, что величину эффекта ΔV , вызываемого медиатором или физиологически активным веществом, можно получить из уравнения:

$$\Delta V = \frac{\Delta G/G}{1 + (\Delta G/G)} (E - e),$$

где G исходная проводимость мембраны, ΔG — изменение проводимости при действии вещества, E — мембранный потенциал покоя, а e — потенциал равновесия данной реакции [11]. Как следует из этого выражения, эффект при действии вещества в растворах с измененным ионным составом меняется независимо от того, изменяется ли под влиянием этого вещества проницаемость мембраны для удаленного иона. Если бы ионы натрия или хлора не принимали участия в деполяризации, вызываемой аппликацией АТФ и НА, то эффект ΔV должен был бы возрасти, поскольку в растворе с измененным ионным составом

G уменьшилась в 2,5 раза. ΔV должна увеличиться еще и потому, что величина $E - e$ также увеличилась, так как при удалении натрия и хлора мембрана гиперполяризуется, а величина e лежит, как будет показано ниже, в области потенциалов, более положительных, чем потенциал покоя. Уменьшение же реакции ΔV на АТФ и НА в растворе с замещенным натрием и хлором говорит о том, что эти ионы (или один из них) участвуют в деполяризации мышечных клеток.

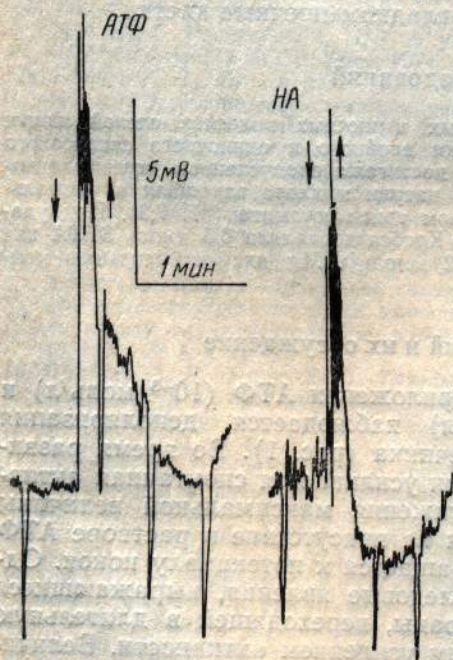


Рис. 1. Действие АТФ (10^{-3} моль/л) и НА ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л) на гладкомышечные клетки слепой кишки в присутствии апамина (10^{-7} моль/л). Электротоки вызывали толчками тока (0,1 мкА).

Стрелками указано начало и конец действия вещества.

Для того чтобы выяснить, участвуют ли в деполяризации, вызываемой приложением АТФ и НА, ионы кальция, исследовали действие этих веществ в бескальциевом растворе, из которого предварительно были удалены ионы натрия и хлора. Как видно из рис. 2, а, г, деполяризация ГМК в присутствии как НА, так и АТФ сохранялась в таком растворе, хотя и стала заметно меньше, чем исходная. Однако сделать заключение об участии ионов кальция в этой реакции трудно, поскольку кальций участвует во многих мембранных процессах: регулирует проницаемость мембраны для других ионов [4, 6], выступает кофактором взаимодействия медиатор — рецептор [8], и, видимо, влияет

на явление десенситизации [13, 14]. Поэтому непосредственное участие этого иона в переносе заряда через каналы, управляемые хеморецептором, трудно оценить. В силу этих причин как возбуждающее, так и тормозящее действие медиаторов в бескальциевом растворе оказывается уменьшенным [6] или полностью угнетается [9].

Тот факт, что деполяризация сохраняется в растворах с удаленными ионами натрия, хлора и кальция, однозначно свидетельствует о том, что в НА и АТФ эффекте кроме ионов хлора (или ионов натрия,

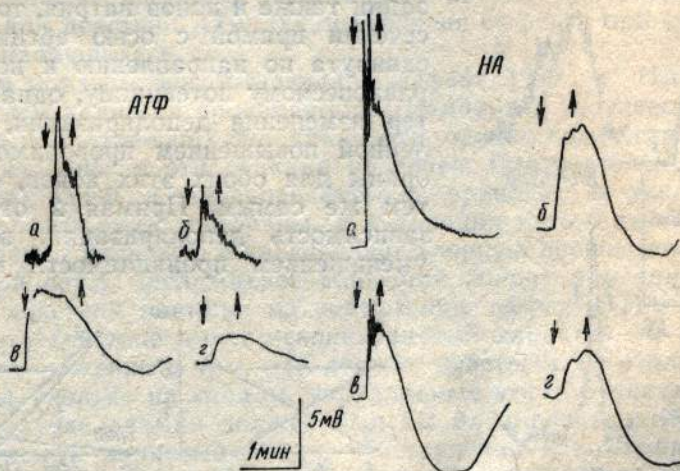


Рис. 2. Действие АТФ и НА растворах с измененным ионным составом.

а, в — в норме, б — в растворе с замещенными ионами натрия и хлора, г — в растворе с замещенными ионами натрия и хлора и удаленными ионами кальция.

либо того и другого одновременно) принимают участие также ионы калия. Эта деполяризация может возникать только при условии, если активация хеморецепторов будет сопровождаться закрыванием калиевых каналов, управляемых этими хеморецепторами. Следовательно, калиевые каналы, управляемые возбуждающими рецепторами, в состоянии покоя открыты и участвуют в формировании потенциала покоя. Необходимо отметить, что в литературе уже имеются данные о том, что возбуждающее действие медиатора может сопровождаться не только увеличением, но и уменьшением ионной проводимости мембраны ГМК [3, 15].

Для дальнейшего уточнения ионной природы возбуждающего действия НА и АТФ была предпринята попытка исследовать зависимость деполяризации от исходного мембранного потенциала. На рис. 3 показано изменение реакции на АТФ и НА при сдвиге мембранного потенциала на 15 мВ в сторону гиперполяризации. Видно, что реакция на АТФ существенно не изменяется, тогда как реакция на НА заметно увеличивается по амплитуде. Потенциал реверсии для норадреналиновой деполяризации, полученный методом экстраполяции, лежит в области $-(10 \div 20)$ мВ.

На основании этих данных можно предположить, что для возбуждающего эффекта АТФ, по-видимому, реализуется случай, когда деполяризация обусловлена изменением проницаемостей в равной степени как для ионов калия, так и для ионов хлора или натрия, поскольку:

- а) об участии этих ионов свидетельствуют опыты с растворами изме-

ненного ионного состава; б) сопротивление мембраны при деполяризации не изменяется; в) сдвиг мембранного потенциала в сторону гиперполяризации не изменяет величину реакции. Рассмотренный случай можно проиллюстрировать рис. 4, А. Прямая 1 отображает зависимость между деполяризацией, вызванной изменением проницаемости мембраны под действием АТФ для ионов хлора и мембранным потенциалом. Прямая пересекает ось абсцисс в точке равновесного хлорного потенциала. При участии в реакции деполяризации также и ионов натрия, точка пересечения прямой с осью абсцисс будет сдвинута по направлению к натриевому равновесному потенциалу, однако характер изменения деполяризации, обусловленной повышением проводимости мембраны для обоих этих ионов, останется тем же самым. Прямая 2 отображает зависимость деполяризации, вызванной уменьшением проницаемости мембраны

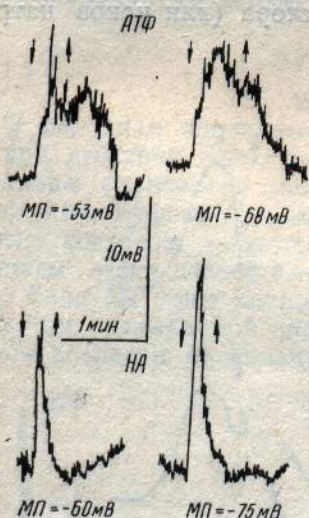
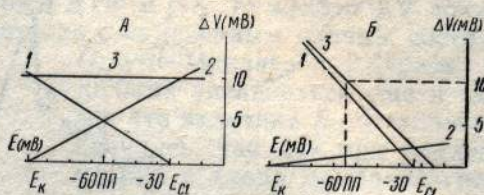


Рис. 3. Зависимость эффекта АТФ и НА от мембранного потенциала.

Рис. 4. Зависимость суммарной реакции, а также вклада различных ионов от мембранного потенциала (МП).

А — при действии АТФ, Б — при действии НА, 1 — вклад ионов хлора, 2 — калия, 3 — суммарная реакция, ПП — потенциал покоя. Величины равновесных потенциалов E_K и E_{Cl} даны по Кастилсу [10].



для ионов калия, от потенциала на мембране. Поскольку углы наклона обеих прямых к оси абсцисс одинаковы, изменение проводимостей для обоих ионов также будет одинаковым, т. е. $\Delta G_K = -\Delta G_{Cl}$ (или $\Delta G_K = -\Delta G_{Cl} - \Delta G_{Na}$). Тогда суммарный эффект выразится прямой 3, которая не имеет пересечения с осью абсцисс, следовательно, суммарный эффект не должен иметь равновесного потенциала.

При действии НА, по-видимому, изменяется проницаемость мембраны как для ионов калия, так и хлора. Ионы натрия, по всей вероятности, не участвуют в деполяризации мембраны, вызываемой НА, т. к. потенциал реверсии данной реакции лежит гораздо ближе к равновесному потенциалу хлора, но не натрия. Хлор вносит вклад в реакцию в большей степени, чем калий. Такой вывод можно сделать на основании следующих данных: а) опыты с измененным ионным составом растворов показывают, что деполяризующий эффект НА обусловлен изменением проницаемости как для калия, так и для хлора; б) сопротивление мембраны при возбуждении уменьшается; в) сдвиг мембранного потенциала в сторону гиперполяризации приводит к увеличению норадреналиновой деполяризации. Такая ситуация реализуется при условиях, показанных на рис. 4, Б. Поскольку $\Delta G_{Cl} > -\Delta G_K$, прямая, выражающая суммарный эффект, пересечет ось абсцисс правее хлорного равновесного потенциала.

В пользу предположения о преобладающем повышении проницаемости мембраны для ионов хлора при деполяризации говорит тот факт,

что в некоторых мышечных полосках, которые имели заведомо низкий потенциал покоя, т.е. были в силу каких-то причин деполяризованы, не наблюдалось возбуждающего действия норадреналина, а в ответ на его приложение проявлялась гиперполяризация. Однако после смещения мембранного потенциала в сторону более отрицательных значений удалось вызвать нормальный возбуждающий эффект норадреналина. Из этого следует, что потенциал реверсии реакции действительно лежит в области хлорного равновесного потенциала. Интересно отметить, что при действии АТФ такая реверсия эффекта при сдвиге потенциала не наблюдалась.

Таким образом, возбуждающий эффект АТФ и НА обусловлен уменьшением калиевой проницаемости мембран и увеличением хлорной (и, возможно, натриевой) проницаемости, однако количественный вклад каждого из ионов в эти реакции различен. Следовательно, активация тормозящих АТФ и адренорецепторов приводит к увеличению калиевой проводимости мембраны, а активация возбуждающих рецепторов уменьшает калиевую и увеличивает хлорную проводимость.

В этой связи заслуживает внимания вопрос о механизме блокирующего действия апамина на тормозящие эффекты НА и АТФ. Поскольку это действие имеет неконкурентный характер, то было высказано предположение о том, что апамин действует не столько на сами рецепторы, сколько на каналы, управляемые этими рецепторами [2, 7]. В таком случае апамин должен был бы блокировать открытый хемочувствительный калиевый канал, участвующий в возбуждающем действии НА и АТФ. Если бы это было так, то в растворе с удаленными ионами натрия и хлора деполяризующее действие этих веществ должно было бы полностью отсутствовать. Если встать на ту точку зрения, что апамин индуцирует эффекты деполяризации, перестраивая АТФ и α -адренорецепторы из тормозных в возбуждающие, то в этом случае ионная природа и количественный вклад каждого из ионов в оба эффекта были бы совершенно одинаковы. Поскольку активация тормозных рецепторов приводит к изменению проницаемости только для калия, то после модификации этих рецепторов апамин деполяризующий эффект должен быть обусловлен этим же ионом. Выявленное в опытах участие ионов хлора и натрия в деполяризующем действии АТФ и НА также свидетельствует о предсуществовании на мембране гладкомышечных клеток возбуждающих АТФ и α -адренорецепторов. И, наконец, решающим доказательством этого является отсутствие гиперполяризации на приложение самого апамина, т.к. модификация рецептора должна была бы перевести часть калиевых каналов из закрытого состояния в открытое.

Апамин, по-видимому, является эффективным блокатором только тормозных АТФ и α -адренорецепторов. Что касается вопроса о том, является ли АТФ медиатором нехолинергического возбуждения, то, несмотря на то, что ионный механизм, подобный вышеописанному, предполагается и для ВСП, опыты со смещением мембранного потенциала пока не позволяют говорить об идентичности медиатора нехолинергического возбуждения и АТФ.

S. M. Tishkin, L. V. Baidan, M. F. Shuba

IONIC MECHANISM OF EXCITATORY ACTION OF ATP AND NORADRENALINE IN SMOOTH MUSCLE CELLS

Summary

ATP and noradrenaline were found to cause depolarization in circular smooth muscle cells of guinea pig caecum treated by apamin. The depolarization does not disappear in solutions with sodium, chlorine and calcium ions deficiency. When the membrane potential was shifted towards hyperpolarization, the amplitude of ATP effect does not change, while the amplitude of noradrenaline effect increases. Both ATP and noradrenaline are supposed to alter the potassium, chlorine and/or sodium permeability of the membrane, but the contribution of these ions in these two cases is different. The permeability of chlorine and/or sodium ions increases, while the permeability of potassium ions decreases. A hypothesis is advanced that exciting ATP- and α -adrenoreceptors are present on the membrane of smooth muscle cells under study.

Список литературы

1. Владимирова И. А., Шуба М. Ф. Влияние стрихнина, гидрастина и апамина на синаптическую передачу в гладкомышечных клетках.— *Нейрофизиология*, 1978, 10, № 3, с. 295—299.
2. Владимирова И. А., Шуба М. Ф. Действие апамина на тормозящий эффект норадреналина в гладких мышцах.— *Физиол. журн.*, 1980, 26, № 4, с. 547—552.
3. Кочемасова Н. Г., Шуба М. Ф. Действие адреналина и норадреналина на электрофизиологические свойства мышечных клеток мочеточника.— *Физиол. журн. СССР*, 1972, 58, № 8, с. 1287—1294.
4. Шуба М. Ф. Электрофизиологические свойства мембраны гладких мышечных клеток.— В кн.: Протоплазматические мембраны и их функциональная роль. Киев, 1965, с. 90—108.
5. Шуба М. Ф. О механизме действия адреналина на электрические свойства гладких мышц.— В кн.: Биофизика мышечного сокращения. М., 1966, с. 126—231.
6. Шуба М. Ф., Клевец М. Ю. Ионный механизм гальмивної дії адреналіну та норадреналіну на гладкі м'язові клітини.— *Фізіол. журн.*, 1967, 13, № 1, с. 3—11.
7. Banks B. E. C., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. H., Jenkinson D. H. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability.— *Nature*, 1979, 282, N 3, p. 415—417.
8. Bolton T. B., Bülbring E. Adrenoreceptors in visceral smooth muscle cells.— In: Recent Advances in the Pharmacology of Adrenoreceptors. North-Holland, 1978, p. 7—13.
9. Bülbring E. Postjunctional adrenergic mechanisms.— *Brit. Med. Bull.*, 1979, 35, N 3, p. 285—295.
10. Casteels R. The relation between the membrane potential and the ion distribution in smooth muscle cells.— In: Smooth Muscle. London, 1970, p. 70—100.
11. Ginsborg B. L. Ion movements in junctional transmission.— *Pharm. Rev.*, 1967, 19, N 1, p. 289—316.
12. Maas Ad. J. J., den Hertog A. The effect of apamin on the smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli.— *Eupor. J. Pharm.*, 1979, 58, N 2, p. 151—156.
13. Manthey G. The effect of calcium on the desensitization of membrane receptors at the neuromuscular junction.— *J. Gen. Physiol.*, 1966, 49, N 8, p. 963—976.
14. Paton W. D. M., Rotschild A. M. The changes in response and in ionic content of smooth muscle produced by acetylcholine.— *Brit. J. Pharm.*, 1965, 24, N 3, p. 437—448.
15. Shuba M. F., Gurkovskaya A. V., Klevetz M. I., Kochemasova N. G., Taranenko V. M. Mechanism of the excitatory action of catecholamines on the membrane of smooth muscle.— In: Physiology of Smooth Muscle. New York, 1976, p. 347—357.
16. Shuba M. F., Vladimirova I. A. New data on nerve muscle transmission of excitation and inhibition in smooth muscles.— In: Physiology and Pharmacology of Smooth Muscle. Varna, 1979, p. 112—119.
17. Tomita T., Watanabe H. A comparison of the effects of adenosine triphosphate with noradrenaline and with the inhibitory potential of the guinea-pig taenia coli.— *J. Physiol.*, 1973, 231, N 2, p. 167—177.

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

Поступила в редакцию
30.V 1980 г.