

Дослідження модулюючої дії серотоніну на поодинокі канали в нейронах виноградної слимака *Helix pomatia*

Влияние серотонина (5-гидрокситриптамина, 5-НТ) на активность одиночных кальциевых каналов изучали на идентифицированных нейронах виноградної улитки. Только один тип одиночных кальциевых каналов, значение проводимости которых 5 пСм, обнаружен у данного типа клеток. Сделан вывод, что увеличение амплитуды кальциевого макротока после приложения 10 мкмоль/л серотонина на уровне одиночных каналов, происходит за счет таких факторов: изменения кинетики активированных каналов; увеличения количества активированных каналов данного типа; увеличения вероятности пребывания канала в открытом состоянии.

Вступ

З'ясування молекулярних механізмів функціонування електрокерованих іонних каналів збуджених мембран є одним з важливих завдань сучасної мембранології. Особливу увагу привертає отримання нових даних про структуру кальцієвих каналів, які поряд з їх широким поширенням у мембрані багатьох збуджуючих утворень, відіграють велику роль у спряженні різноманітних внутрішньоклітинних і мембранних процесів [3]. Кальцієвий струм, який тече крізь ці канали, може помітно змінювати концентрацію іонів кальцію в середині клітини та активувати процеси м'язового скорочення та секреції нейромедіаторів, а також крізь ланцюг біохімічних реакцій впливати на іонні канали мембрани. Самі кальцієві канали також дуже чутливі до зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Наявність розвинутої системи кальцієвих каналів є, зокрема, важливою особливістю соматичної мембрани нервових клітин хребетних і безхребетних тварин [3, 7]. Розробка методу внутрішньоклітинного діалізу (перфузії) сприяла кращому розумінню механізмів, які забезпечують електричну збудженість соматичної мембрани, та, зокрема, дала можливість докладно досліджувати властивості кальцієвих каналів [4]. Великий інтерес представляє вивчення кальцієвої мембранної провідності на рівні поодиноких каналів за допомогою методу «patch-clamp» у конфігурації «cell-attached» [1, 2, 12]. Привертає увагу дія на кальцієву провідність серотоніну (5-НТ), який є природним нейротрансмітером і впливає на функціонування нервових клітин [6]. Тому серотонін і був вибраний для оцінки функціональних і фармакологічних властивостей поодиноких кальцієвих і калієвих каналів.

Методика

Нейрони були виділені механічним шляхом з мозку слимака після його обробки проназою Е (0,2 %, 1 год 30 хв, 37 °С). Експерименти виконані на неідентифікованих нейронах (100-150 мкм у діаметрі), які були виділені з педальних гангліїв. Реєстрацію макрострумів здійснено за допомогою методу внутрішньоклітинної перфузії. Для реєстрації струмів поодиноких каналів використовували метод «patch-clamp» у конфігурації «cell-attached». «Patch-clamp» - реєстрації виконували за допомогою підсилювача ЕРС-9 (фірми «НЕКА-Electronic», ФРН) та програмного забезпечення «Pulse» для комп'ютера Power PC Macintosh 7100/66. Для обробки результатів використовували спеціальну програму «Igor Pro». Піпетки виготовляли з скла пірекс, діаметр кінця після оплавлення був меншим ніж 1 мкм. Опір піпеток становив 20-40 МОм. Для зменшення ємності їх кінці покривали гідроскопічним полімером-сілгардом (фірми «Dow Corning», США).

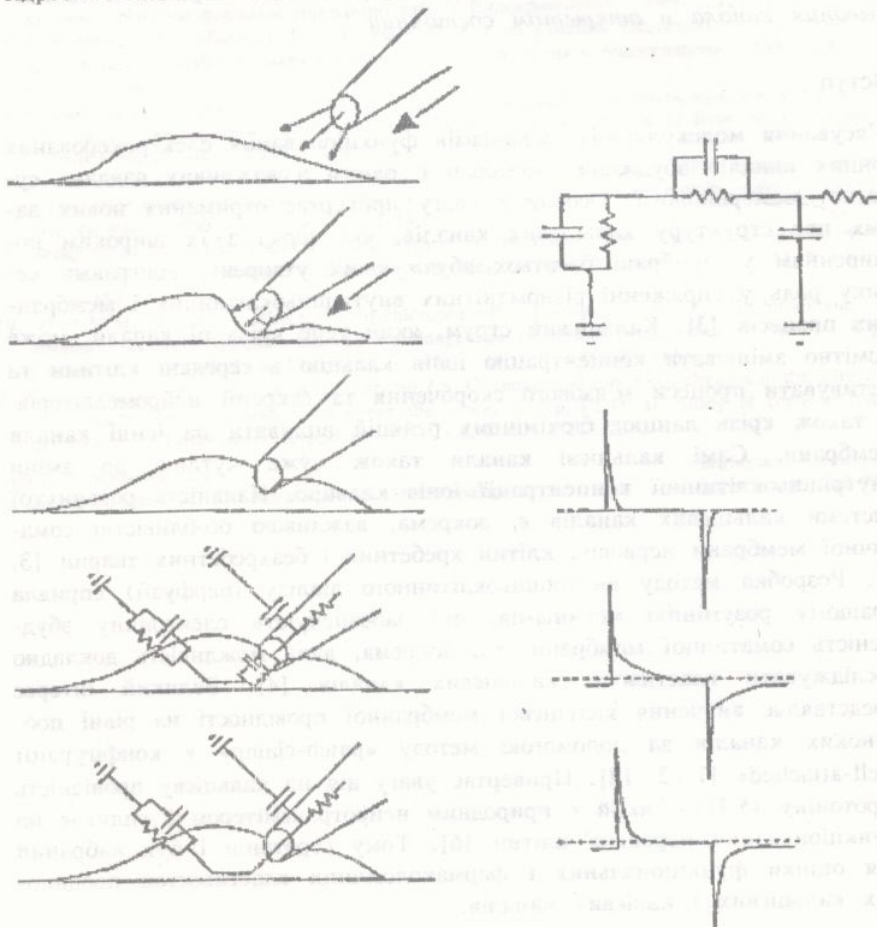


Рис. 1. Схема отримання гігаомного контакту.

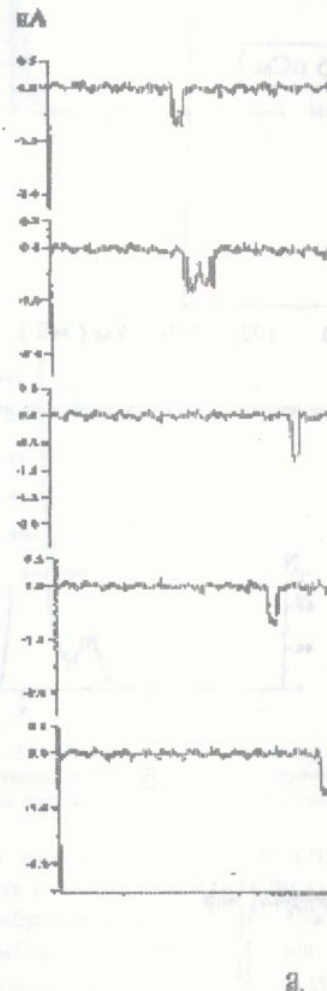


Рис. 2. Активність поодинокого каналу: а - контроль; б - після прикладан

Результати та їх обговорення

Незважаючи на численні спрентативної обробки ганг. стабільного гігаомного контактного слимака [9]. Ці труднобрани ізолюваних нейронів

ка після
ерименти
діаметрі),
рострумів
зії. Для
«patch-
ії вико-
xtronic»,
ower PC
говували
пірекс,
піпеток
кривали
IA).

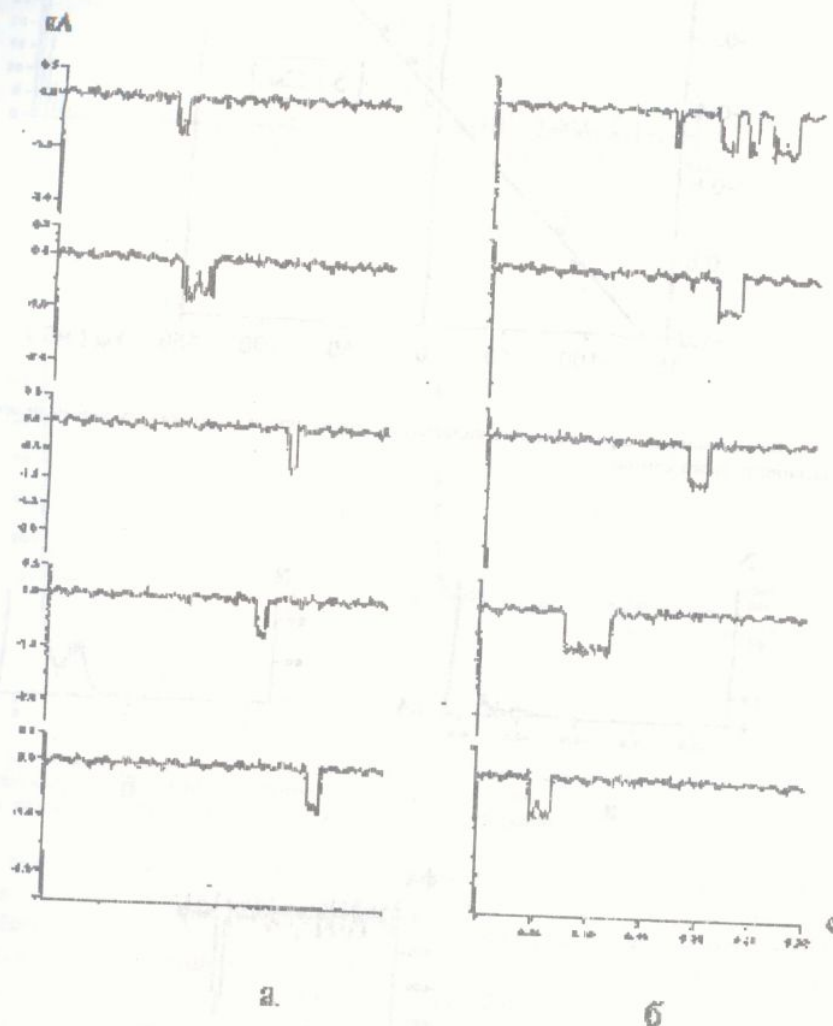


Рис. 2. Активність поодинокого кальцієвого каналу ізольованого нейрона виноградного слимака: а - контроль; б - після прикладання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин.

Результати та їх обговорення

Незважаючи на численні спроби використовувати різні комбінації ферментативної обробки гангліїв слимаків, досить тяжко досягти стабільного гігаомного контакту з дисоційованими нейронами виноградного слимака [9]. Ці труднощі зумовлені властивостями поверхні мембрани ізольованих нейронів виноградного слимака, зокрема залишками

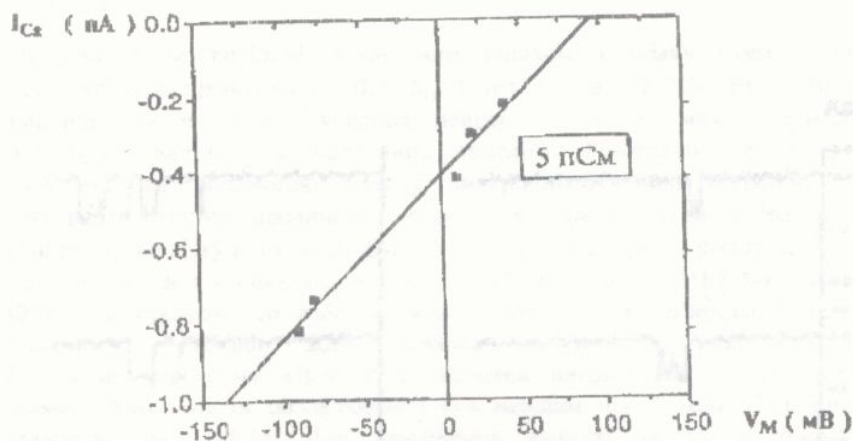


Рис. 3. Вольт-амперна характеристика кальцієвого струму поодинокого каналу мембрани нейрона виноградного слимака.

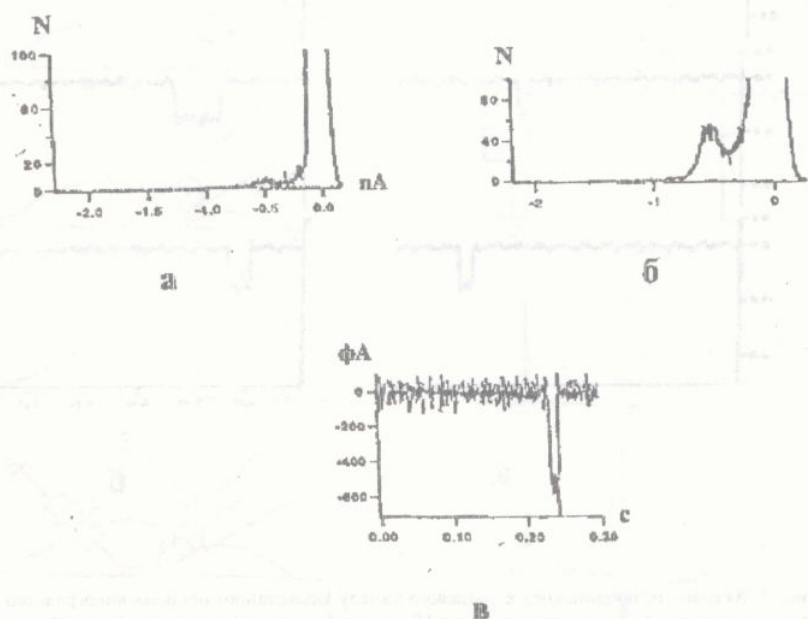
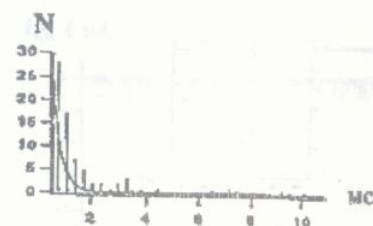
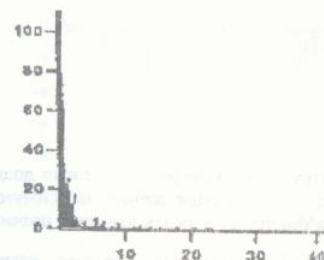


Рис. 4. Гістограми амплітуд поодинокіх кальцієвих струмів при мембранному потенціалі - 30 мВ: а - контроль; б - після додавання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин; в - приклад реєстрації кальцієвого струму крізь поодинокий канал, отриманий у відповідь на деполяризацію мембрани до - 7- мВ.

сполучної тканини на їх поверхні. В разі позитивного ефекту «прилипання» клітин досягався гігаомний контакт між мембраною нейрона та кінцем реєструючої піпетки у конфігурації «cell-attached» (рис. 1).



а

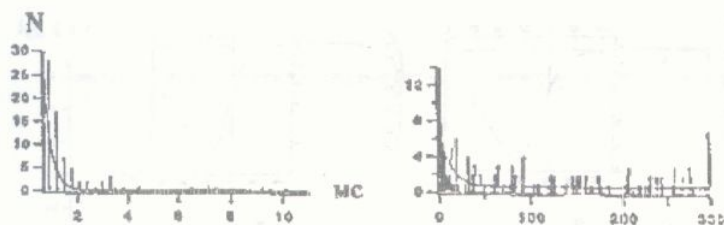


б

Рис. 5. Вплив 10 мкмоль/л серотоніну на г) станах: а, б - гістограми, які отримали після додавання 10 мкмоль/л серотоніну.

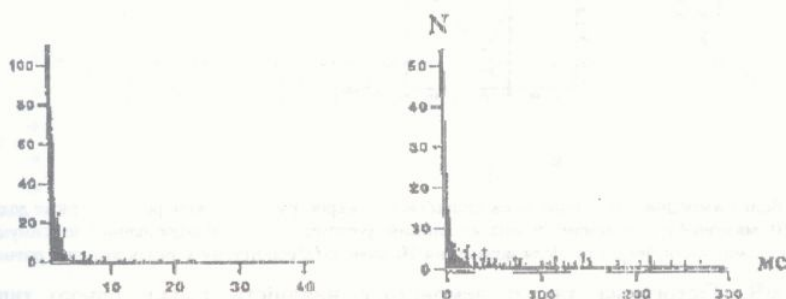
Ми використовували при стимуляції для знаходження кін мембранних потенціалів. Стиму мембранного потенціалу від -1 знаходилися у відкритому стан

Рис. 2, а ілюструє струми іримані на ізольованих нейронах -30 мВ та 100 моль/л кальцію. активність має пачечний характер активність кальцієвих канал дозволяє проаналізувати їх про амперної залежності ми використували підтриманням мембрани підтриманням мембрани. Реєстрації виконували протягом кожна при частоті 0,33 Гц. вольт-амперної кривої до осі а. Вольт-амперна крива та амплітуда чення амплітуди для поодинокі:



а

б



в

г

Рис. 5. Вплив 10 мкмоль/л серотоніну на кальцеві канали у відкритому (а, в) та закритому (б, г) станах: а, б - гістограми, які отримали за контрольних умов; в, г - гістограми, які отримали після додавання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин.

Ми використовували при стимуляції фрагменту мембрани «RAMP-стимуляцію» для знаходження кальцевих каналів у тестуючій ділянці мембранних потенціалів. Стимуляцію здійснювали за допомогою зміни мембранного потенціалу від -100 до $+100$ мВ. Кількість каналів, які знаходилися у відкритому стані, досягала 5-6.

Рис. 2, а ілюструє струми поодиноких кальцевих каналів, які отримані на ізольованих нейронах слимаків при мембранному потенціалі -30 мВ та 100 моль/л кальцію у розчині, що був у піпетці. Канальна активність має пачечний характер, що добре узгоджується з даними про активність кальцевих каналів [2]. Вольт-амперна характеристика дозволяє проаналізувати їх провідність (рис. 3). Для побудови вольт-амперної залежності ми використовували стимуляцію фрагменту мембрани підтриманням мембранного потенціалу на певному рівні. Реєстрації виконували протягом 200 стимуляцій тривалістю 300 мс кожна при частоті $0,33$ Гц. Провідність каналу, згідно з нахилом вольт-амперної кривої до осі абсцис, становить 5 пСм (див. рис. 3). Вольт-амперна крива та амплітудна гістограма показують однакові значення амплітуди для поодиноких каналів, рівні $0,5$ пА при потенціалі

ніталі - 30
ючин; в -
відь на де-

гу «при-
нейрона
(рис. 1).

44, № 5-6

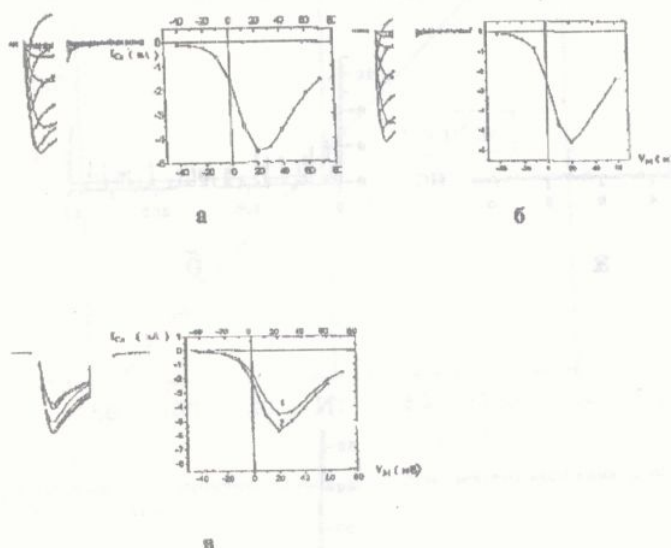


Рис. 6. Вольт-амперна характеристика кальцієвого макроструму: а - контроль; б - після додавання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин; в - співвідношення максимумів кальцієвого макроструму до та після додавання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин.

- 30 мВ. Гістограма також демонструє наявність тільки одного типу кальцієвих каналів (див. рис. 3; 4, а).

Для аналізу кінетики поодиноких кальцієвих каналів були побудовані часові гістограми відкритого та закритого станів. На рис. 5, а зображено часову гістограму відкритого стану кальцієвого каналу, яка описується одною експонентою ($\tau_{\text{в}} = 0,2$ мс). Часова гістограма закритого стану каналу відображена двома експонентами - швидкою ($\tau_{23} = 11,5$ мс) та повільною ($\tau_{13} = 0,2$ мс).

Попередні дослідження показали наявність модулюючої дії серотоніну відносно кальцієвого макроструму у педальних нейронах завдяки участі цАМФ-залежного каскаду фосфорилування [5-11]. Приклад цього підсилення показано на рис. 6.

Після аплікації серотоніну не відбувається безпосереднього контакту між позаклітинним розчином і ділянкою мембрани, яку досліджували (див. рис. 2). Тому дія серотоніну може бути пояснена лише участю системи цитоплазматичних вторинних посередників. Струми поодиноких каналів перед і після прикладання агоніста у позаклітинний розчин мають однакові значення амплітуди. Разом з тим значно збільшилася кількість подій, які відповідали таким значенням амплітуди: 67 подій проти 8 у контролі (для обох випадків використовували 200 кривих реєстрацій струму). Амплітудна гістограма свідчить про те, що кількість відкриттів каналів змінилася після дії серотоніну (див. рис. 2, б; 4, в). Амплітудна гістограма доводить також те, що, по-перше, 5-НТ не змінює кількості працюючих каналів. Якщо декілька активованих каналів потрапили в одну ділянку мембрани, яку досліджували,

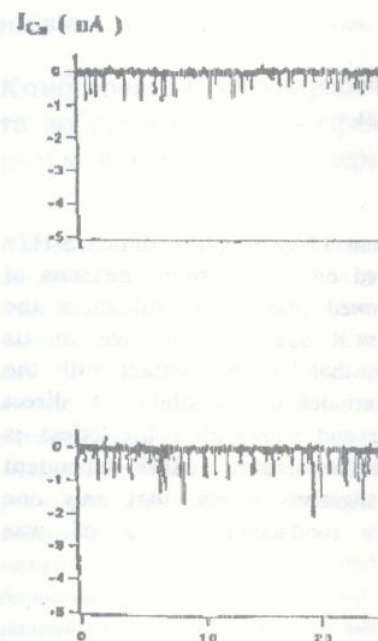


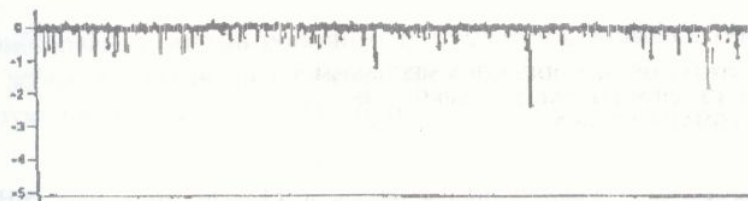
Рис. 7. Індуковане серотоніном підвищення відкритого стану; 200 послідовних кривих тривалістю 300 мс кожна, отримані у ві контроль; б - після додавання 10 мкмоль/л серотоніну.

то у цьому випадку спостерігалася удвічі (див. рис. 4, б; 7, б) інших типів кальцієвих каналів вказує на те, що після прикладання агоніста значення амплітуди не змінилося (див. рис. 4, а).

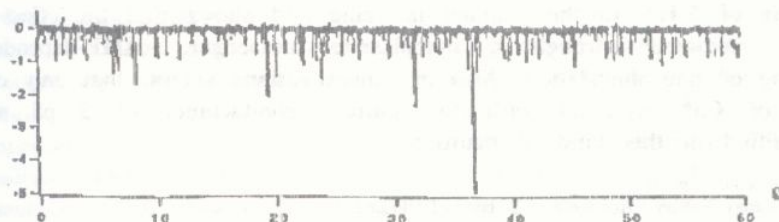
Для характеристики кінетики після прикладання 5-НТ, ми виміряли час закритого стану каналу (рис. 5). Константа τ_0 збільшилася у 1,5 рази до 0,3 мс (див. рис. 5, в). Щодо того їх значення відносно контролю $\tau_0 = 0,4$ мс; $\tau_{23} = 5,96$ мс (див. рис. 5, г).

Таким чином, при зовнішній зміні кінетики активації кальцієвих вторинних посередників. Врахувавши струму поодиноких кальцієвих

I_{Ca} (пА)



а



б

Рис. 7. Індуковане серотоніном підвищення частоти знаходження кальцієвого каналу у відкритому стані; 200 послідовних кривих реєстрацій кальцієвих струмів поодиноких каналів тривалістю 300 мс кожна, отримані у відповідь на деполаризацію мембрани до -30 мВ: а - контроль; б - після додавання 10 мкмоль/л серотоніну у позаклітинний розчин.

то у цьому випадку спостерігали збільшення кількості активованих каналів удвічі (див. рис. 4,б; 7,б). По-друге, 5-НТ не індує з'явлення інших типів кальцієвих каналів (рис. 4,б,в). Амплітудна гістограма вказує на те, що після прикладання 5-НТ, місце знаходження піку, який відповідає значенню амплітуди струму поодинокого каналу $0,5$ пА, не змінилося (див. рис. 4, а, б).

Для характеристики кінетичних властивостей кальцієвих каналів після прикладання 5-НТ, ми побудували гістограми відкритого та закритого станів каналу (рис. 5). Після прикладання 5-НТ часова константа τ_0 збільшилася у $1,5$ разів порівняно з контролем, і становила $0,3$ мс (див. рис. 5, в). Щодо часових констант для закритого стану, то їх значення відносно контролю зменшилося і становило: $\tau_{13} = 0,4$ мс; $\tau_{23} = 5,96$ мс (див. 5, г).

Таким чином, при зовнішньому прикладанні 5-НТ відбуваються зміни кінетики активації кальцієвих каналів, опосередковані системою вторинних посередників. Враховуючи постійне значення амплітуди струму поодиноких кальцієвих каналів, а значить і їх провідності,

можна зробити висновок, що у досліджуваних нейронах функціонує тільки один тип кальцієвих каналів.

E.A. Lukyanetz, A.V. Sotkis

THE INVESTIGATION OF MODULATION MECHANISM
OF SINGLE CALCIUM CHANNELS BY SEROTONINE
IN HELIX POMATIA NEURONS

The influence of a neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) on single Ca^{2+} channel activity was studied on unidentified neurons of the snail *Helix pomatia*. Our findings showed that 5-HT influences the channel molecule in indirect manner, as it appeared effective at its application by adding to the bath solution, that had no contact with the tested membrane fragment. This finding excludes the possibility of direct binding of 5-HT to the channel molecule and shows that the effect is really mediated through a cytoplasmic messenger, cAMP-dependent cascade of phosphorylation. Also our investigations shows, that only one type of Ca^{2+} channel with the unitary conductance of 5 pS was identified in this kind of neurons.

A.A. Bogomoletz Institute
of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Colquhoun D., Sigworth F.J. Fitting and statistical analysis of single channel recordings // New York: Plenum Press, 1993. - P. 191-263.
2. Hamill O.P., Marty A., Neher E. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // Pflügers Arch. - 1991. - P. 85-100.
3. Jähnel U. L-type calcium channel activity in human atrial myocytes as influenced by 5-HT // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. - 1993. - 348. - P. 396-402.
4. Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko A.I. Effects of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // Nature. - 1987. - 327, No 5528. - P. 691-693.
5. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. Study of the cAMP influence of calcium currents in mollusc neurons possessing different sensitivity of their calcium conductance to serotonin action // Neurophysiology. - 1990. - 22, No 5. - P. 605-612.
6. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. Effects of serotonin and cAMP on calcium current in different neurons of *Helix pomatia* // Pflügers Arch. - 1992. - 420. - P. 9-15.
7. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A. Intracellular mechanisms of calcium channel modulation by serotonin in identified *Helix pomatia* neurons // J. Zool. - 1994. - 44. - P. 513-523.
8. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A. Mechanisms of antagonistic action of internal Ca^{2+} on serotonin-induced potentiation of calcium currents in *Helix* neurons // Pflügers Arch. - 1993. - 424. - P. 73-83.
9. Kostyuk P.G., Shuba Ya. M., Savchenko A.N. Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons // Ibid. - 1988. - 411. - P. 661-669.
10. Lukyanetz E.A., Kostyuk P.G. Two distinct receptors operate the cAMP cascade to up-regulate L-type Ca^{2+} channels // Ibid. - 1996. - 432. - P. 174-181.
11. Lukyanetz E.A. Investigation of the effect of intracellular calcium on the cAMP-mediated increase in the calcium current // Neurophysiology. - 1991. - 23, No 7. - P. 228-234.
12. Lux H.D., Nagy K. Single channel Ca^{2+} currents in *Helix pomatia* neurons // Pflügers Arch. - 1981. - 391. - P. 252-254.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,
Київ

Матеріал надійшов
до редакції 10.04.97

УДК 612.766.1+577.3

Н.А.Бобко, О.В.Карпенко, В.І.Чернюк

Комбінований вплив роботи
та добових ритмів на ефективність
розумової діяльності оператора

На основании многократного
операторов блочных щитов у
ансов) выявлено, что эффект
потока выражено снижается
как на протяжении утренней
тически на постоянном уров
особенностями суточных рит
мых показателей эффективно
ростные функции деятельнос
шения других, в то время к
направленные изменения от
большой чувствительностью
развитию утомления в ночн
ность проявления естествен
фессионально важных показ
торов связывается с повыш
торов на функциональное со
чувствительность к утомлен
информации, чем качества, и
но поддерживаемому уровню
ния качества умственной де

Вступ

Коливання активності псих
реєструються за умов виробни
виробничої діяльності (робоча
інших факторів [11-14, 17]. У
факторів проявляється неодна
вати особливості спільного впли
біоритмів на ряд показників
торів за умов змінної праці.

Методика

Обстежували операторів елект
вимоги до психофізіологічних
фесійно важливою їх функцією
роботи інформації, у тому
частина інформації візуальної