

И.В. Кузнецова, Д.А. Евстигнеев, Н.В. Глухова

Изменение электрической активности миелинизированных нервных волокон амфибий под влиянием 4-аминопиридина

*Методом внеклеточной регистрации электрической активности изучали действие блокатора калиевых каналов 4-аминопиридина (4-АП) на миелинизированные нервные волокна амфибий *Rana ridibunda* Pallas. Обнаружено два основных типа реакций на воздействие 4-АП: растягивание потенциала действия (ПД) и возникновение многоимпульсного ответа. В ряде случаев у нервных волокон, отвечающих на одиночное раздражение с 4-АП многоимпульсными ответами, наблюдалась спонтанная активность, выражающаяся в самопроизвольном возникновении пачек ПД. В процессе ритмической стимуляции 4-АП вызывал снижение следовой деполяризации (в начале стимуляции), уменьшение посттетанической деполяризации и возникновение после неё посттетанической гиперполяризации. Методом двоярных стимулов установлена зависимость импульсной и следовой части второго ПД от следовой деполяризации после первого ПД. Эффекты 4-АП на ПД и следовой деполяризации зависели от времени действия блокатора.*

ВСТУПЛЕНИЕ

Первые исследования эффектов 4-аминопиридина (4-АП) на возбудимые ткани проведены на гигантских аксонах таракана [11, 12]. С помощью метода фиксации потенциала установлено подавление калиевого тока под действием 4-АП, а также возникновение спонтанной активности. При исследовании действия 4-АП на гигантские аксоны кальмара методом фиксации потенциала [15] удалось подтвердить селективное уменьшение калиевого тока под его влиянием, появление спонтанной активности, а также описать такие эффекты 4-АП, как зависимость степени блокирования от концентрации блокатора, времени действия и уровня мембранного потенциала (МП). Увеличение времени действия и концентрации блокатора способствовали более сильному угнетению калиевого тока. Зависимость действия 4-АП от МП проявля-

лась в уменьшении блокирующего эффекта при увеличении силы и продолжительности деполяризующих стимулов, а также при уменьшении интервала между ними. Кроме этого, показано [15] увеличение длительности потенциалов действия (ПД) под влиянием 4-АП. Одновременно с исследованиями на аксонах кальмара проводилось изучение действия этого блокатора и на миелинизированные нервные волокна амфибий [14]. Авторы также обнаружили способность 4-АП избирательно подавлять калиевый ток, что выражалось в частичном устранении блокирования при увеличении длительности и частоты деполяризующих стимулов.

Совершенно новый этап исследования 4-АП и его эффектов на различные возбудимые ткани начался после выхода работы Дюбуа [6], в которой установлен важный факт – 4-АП подавляет только быструю компоненту калиевой проводимости (свя-

© И.В. Кузнецова, Д.А. Евстигнеев, Н.В. Глухова

занную с активацией быстрых калиевых каналов) и не эффективен в отношении медленной компоненты, блокируемой тетраэтиламмонием. Путём использования 4-АП удалось установить характер распределения быстрых и медленных калиевых каналов в нодальной, паранодальной и интернодальной областях миелинизированных нервных волокон амфибий [3, 6, 7], что в дальнейшем было использовано для определения функционального значения быстрых и медленных калиевых каналов [6, 13]. Дюбуа [6] показал, что один ПД может вызвать активацию только быстрых калиевых каналов, тогда как для активации медленных калиевых каналов требуется генерация более чем одного ПД, что было подтверждено методом внутриаксональной регистрации электрической активности [13] и установлено, что за реполяризацию ПД миелинизированных нервных волокон амфибий ответственны быстрые калиевые каналы.

Вергун и соавт. [1], используя метод внеклеточной регистрации ПД, существенно дополнили перечень эффектов 4-АП на миелинизированные нервные волокна амфибий. Этот блокатор вызывал значительное увеличение следовой деполяризации (СД), появление повторных ответов и авторитмической активности, увеличивал посттетаническую гиперполяризацию, регистрируемую после 10-секундной ритмической стимуляции, а также вызывал возникновение следовой гиперполяризации (СГ) после ритмической стимуляции нервного волокна низкой (10 Гц) частотой в течение 1 с.

В связи с тем, что большая часть исследований о действии 4-АП на нервные волокна амфибий проведена методом фиксации потенциала, а исследования с использованием вне- и внутриклеточной регистрации ПД немногочисленны, многие из его эффектов до сих пор остаются либо совсем не исследованными, либо исследованными на других возбудимых образованиях.

Целью настоящей работы стало полное описание эффектов 4-АП на импульсную и следовую часть ПД миелинизированных нервных волокон лягушки *Rana ridibunda* Pallas.

МЕТОДИКА

Проведено 47 опытов на одиночных миелинизированных нервных волокнах озёрной лягушки *Rana ridibunda* Pallas. Препаровку нервного волокна производили таким образом, что изолировали лишь интернодальную его часть, а перехват (N_1), от которого в последующем отводили ПД, оставляли интактным в нервном стволе [2]. Нервное волокно затем переносили в экспериментальную камеру (рис. 1). Для монофазного отведения ПД активность дистального перехвата (N_2) подавляли раствором новокаина (0,2 %). Раздражение перехвата осуществляли через серебряные электроды, расположенные на проксимальном конце нерва, а отведение ПД производили неполяризуемыми каломельными электродами, расположенными по обе стороны от изолированного участка нервного волокна.

Раздражение нервного волокна проводили одиночными (длительностью 0,1 мс), парными и ритмическими (частотой 10, 50, 100 и 300 Гц) прямоугольными стимулами от двухканального электронного стимулятора ЭСТ-10 с радиочастотным выходом. ПД одиночного нервного волокна через катодный повторитель подавали на усилитель постоянного тока УУ-2М и регистрировали с помощью платы аналогоцифрового преобразователя,

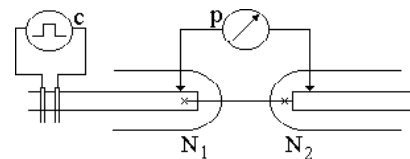


Рис.1. Схема отведения потенциала действия одиночного нервного волокна (с – стимулирующая цепь; р – регистрирующая цепь; N_1 , N_2 – перехваты Ранвье)

встроенного в персональный компьютер. Результаты обрабатывали с помощью программы Mathcad 2000. В экспериментах использовали раствор Рингера следующего состава (ммоль/л): NaCl – 111; KCl – 2,5; CaCl₂ – 1,95; NaHCO₃ – 1,2; буфер HEPES (“Sigma”, США) – 10. Эксперименты проводили при температуре 18–22° С. Статистическая обработка экспериментальных результатов осуществлялась с использованием критерия t Стьюдента. Используемый

в работе блокатор калиевых каналов 4-АП применялся в концентрации 2 ммоль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Приложение к нервному волокну деполяризующего одиночного стимула приводит к возникновению ПД амплитудой $77,852 \text{ мВ} \pm 3,432 \text{ мВ}$ (рис. 2, I, II). Вслед за ПД развивается хорошо выраженная СД, амплитуда которой составляла в среднем

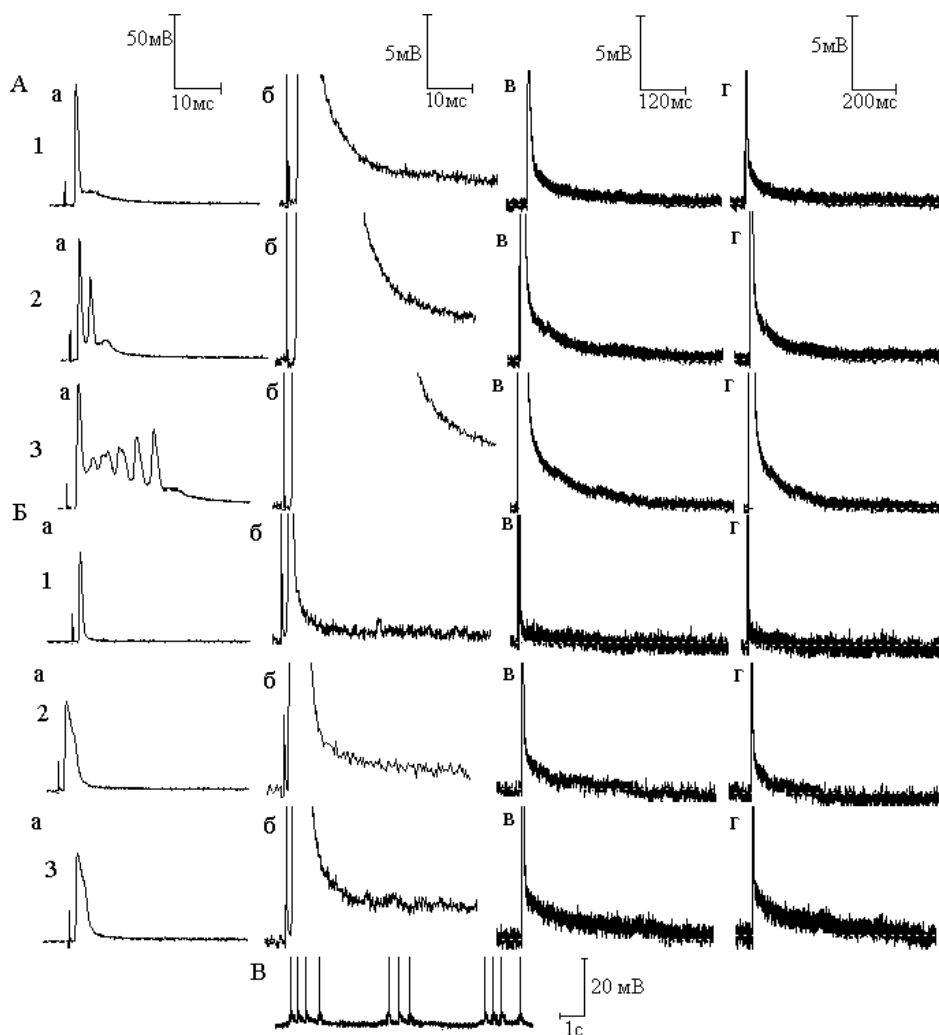


Рис. 2. Различные типы реакций миелинизированных нервных волокон в ответ на воздействие 4-аминопиридина (4-АП). I – возникновение под влиянием 4-АП многоимпульсного ответа: 1 – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б–г) в нормальном растворе Рингера; 2 и 3 – то же через 2 мин (2) и 3 мин (3) действия 4-АП. II – вызванное 4-АП растягивание потенциала действия и увеличение следовой деполяризации: 1 – потенциал действия (а) и следовая деполяризация (б–г) в нормальном растворе Рингера; 2 и 3 – то же через 10 мин (2) и 14 мин (3) действия 4-АП. III – спонтанная активность, вызванная 4-АП на 20-й минуте действия

2,563 мВ \pm 0,375 мВ, а длительность – 172,344 мс \pm 33,474 мс.

Реакция нервных волокон на добавление в раствор Рингера 4-АП была неодинаковой. В большинстве случаев (78 %) 4-АП вызывал возникновение многоимпульсного ответа (см. рис. 2, I), после которого развивалась большая по амплитуде (4,55 мВ \pm 0,349 мВ) СД. Число импульсов, составляющих многоимпульсный ответ, увеличивалось по мере действия блокатора и достигало в некоторых экспериментах тринадцати. Зависимость значения этого числа от времени действия 4-АП показано на рис. 3.

Другой тип реакции нервного волокна на действие 4-АП (см. рис. 2, II) характеризовался тем, что блокирование калиевых каналов только растягивало ПД (в среднем на 2,182 мс \pm 0,345 мс) и увеличивало амплитуду СД (в среднем на 1,731 мВ \pm 0,643 мВ).

Вне зависимости от типа реакции 4-АП приводил к достоверному ($P < 0,05$) увеличению амплитуды ПД (на 4,86 %) и СД (на 78,03 %), причём амплитуда СД возрастала тем сильнее, чем больше было время действия 4-АП.

Способность нервных волокон отвечать на приложение к ним 4-АП двумя разными способами – возникновением повторных

ответов и удлинением ПД и СД была ранее установлена для миелинизированных нервных волокон млекопитающих [9]. Авторами показано, что повторная активность в ответ на действие 4-АП возникает в сенсорных, тогда как растягивание ПД – в моторных нервных волокнах. В нашей работе отношение миелинизированных нервных волокон к сенсорному и моторному типам не устанавливалось.

В некоторых случаях 4-АП вызывал появление авторитмической активности, выражающейся в спонтанно возникающих ПД, сгруппированных по 3–4 импульса (см. рис. 2, III). Данная активность отмечалась в тех волокнах, которые отвечали на одиночное раздражение при наличии 4-АП многоимпульсными ответами.

Потенциалзависимое действие 4-АП, установленное для многих возбудимых образований, изучалось нами в сериях экспериментов с нанесением на нервное волокно ритмических и парных стимулов.

В процессе ритмической стимуляции нервного волокна, омываемого нормальным раствором Рингера, СД суммируется, образуя при частотах раздражения 50, 100 и 300 Гц деполяризационное плато (рис. 4, I). Плато увеличивалось с ростом частоты стимуляции. После прекращения ритмической стимуляции развивается посттета-

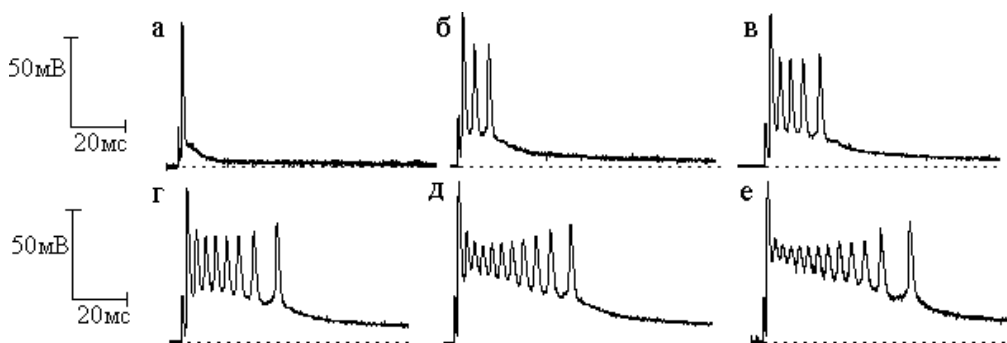


Рис. 3. Увеличение числа повторных ответов по мере выдерживания миелинизированного нервного волокна в растворе с 2 ммоль/л 4-аминопиридина (4-АП): а – потенциал действия в нормальном растворе Рингера; б, в, г, д, е – потенциалы действия, записанные через 6, 11, 16, 20 и 22 мин действия 4-АП соответственно

ническая деполяризация (ПТД), амплитуда которой увеличивается по мере роста частоты прикладываемых стимулов, а длительность – уменьшается. Нередко при частоте раздражения 300 Гц, а в некоторых случаях и при 100 Гц, ПТД сменялась на продолжительную (1–2 с) посттетаническую гиперполяризацию (ПТГ).

Добавление 4-АП в дозе 2 ммоль/л приводило к противоположному поведению СД в начале ритмического раздражения: резко увеличенная введением 4-АП СД

снижалась в ритмическом ряду, причём скорость этого снижения увеличивалась с частотой стимуляции (см. рис. 4). Снижение СД в ритмическом ряду наблюдалось в течение первых 70–130 мс, после чего оно прекращалось, образуя плато (при частоте 50, 100 и 300 Гц). Наибольшая СД в начале ритмической стимуляции частотой 10 Гц была ранее установлена [1] и отнесена за счёт потенциалзависимого блокирования калиевых каналов. Кроме того, такая же закономерность выявлена в

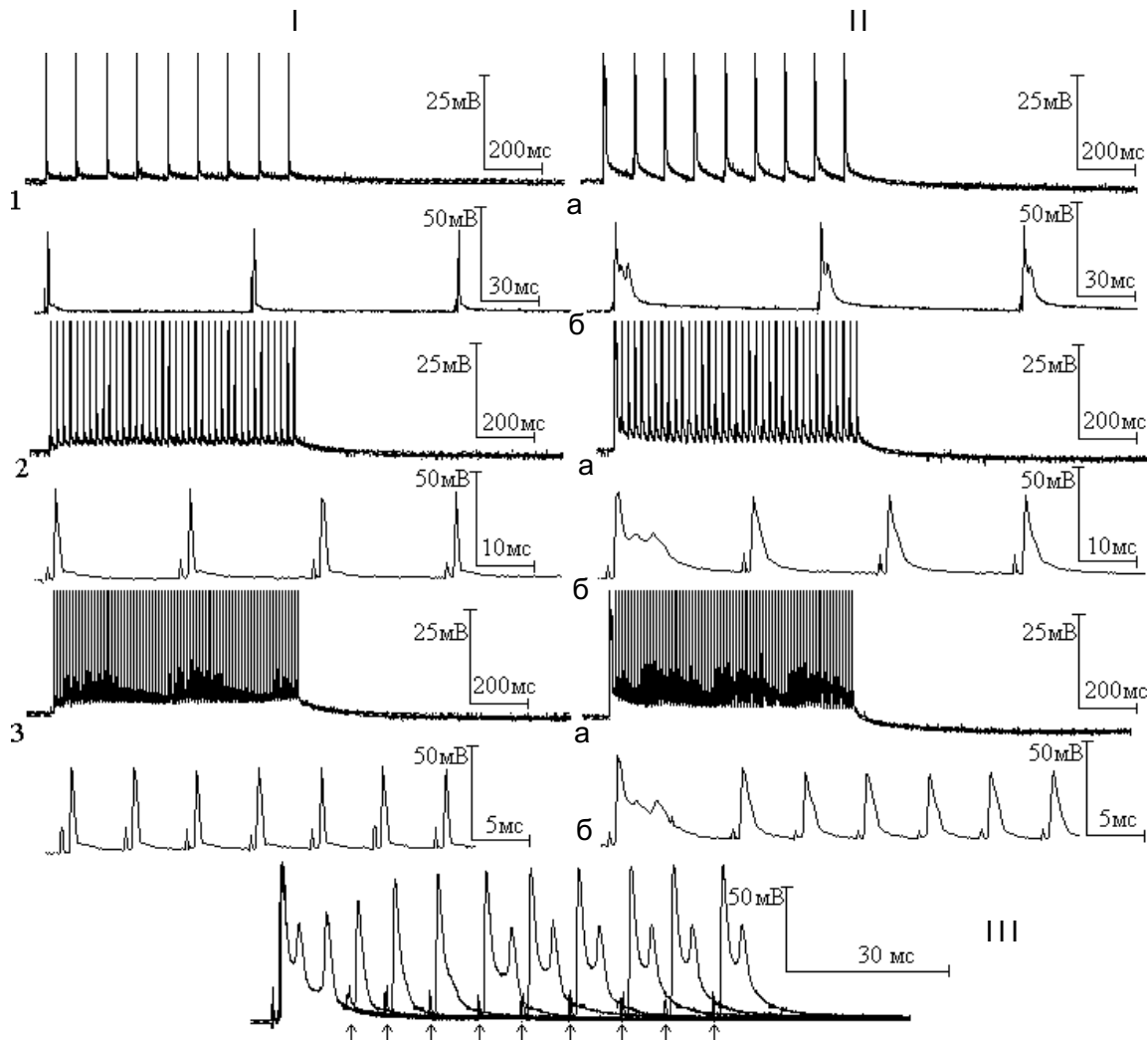


Рис. 4. Изменение формы потенциалов действия под влиянием 4-аминопиридина (4-АП) при приложении к нервным волокнам ритмических и парных стимулов. I – потенциал действия при ритмическом раздражении частотой 10 (1 а, б), 50 (2 а, б) и 100 (3 а, б) Гц в нормальном растворе Рингера. II – то же через 10 мин действия 4-АП. III – потенциалы действия, возникающие в ответ на кондиционирующий и тестирующий стимулы (осциллограммы наложены); момент нанесения тестирующего раздражения показан стрелочками

миелинизированных нервных волокнах ящерицы при воздействии аналога 4-АП – 3,4-диаминопиридина [4].

Под влиянием 4-АП ПТД, регистрируемой после завершения ритмического раздражения, уменьшалась, а в некоторых случаях сменялась ПТГ. Снижение ПТД увеличивалось с увеличением частоты раздражения. 4-АП вызывал значительное увеличение ПТГ в тех опытах, где она наблюдалась исходно. На рис. 4 представлена ПТГ уже при частоте стимуляции 100 Гц; её максимальная амплитуда составила 1,481 мВ. Под влиянием 4-АП ПТГ появилась при частоте раздражения 10 Гц и была равной 2,51 мВ. При частоте стимуляции 50 Гц ПТГ составила 2,66 мВ, а при частоте 100 Гц имеющаяся в норме ПТГ увеличилась на 286 % (до 4,23 мВ). Подобные результаты относительно усиления СГ при ритмической стимуляции под влиянием 4-АП были получены на миелинизированных нервных волокнах крыс [4]. Особенностью этих нервных волокон является то, что после одиночного ПД развивается небольшая по длительности СД, сменяющаяся СГ, которая нарастает в процессе ритмической стимуляции и ещё более увеличивается под влиянием 4-АП. После окончания ритмического раздражения развивается большая по амплитуде ПТГ, также увеличивающаяся под влиянием 4-АП.

При изменении скорости развёртки таким образом, чтобы были видны первые ПД в ритмическом ряду (рис. 4, II), причина снижения СД в начале ритмического раздражения стала очевидной. Оказалось, что первый ПД в пачке ритмических стимулов частотой 10 Гц имел на нисходящей фазе дополнительные два импульса и представлял собой типичный многоимпульсный ответ с большой по амплитуде СД. Вторым же ПД, возникающий во время СД первого ПД, имел только один дополнительный импульс, а третий ПД, хотя и имел дополни-

тельный импульс, но вдвое меньшей амплитуды по сравнению с аналогичным импульсом на нисходящей фазе второго ПД. СД после второго и третьего ПД не увеличивалась, как это наблюдается в норме, а, напротив, уменьшалась. При частоте стимуляции 50 Гц первый ПД имел обычную форму с двумя дополнительными импульсами, а вот уже второй ПД резко отличался от аналогичного ПД при частоте стимуляции 10 Гц. Он возникал в момент более выраженной СД и не имел на своей нисходящей фазе дополнительных импульсов. При частоте раздражения 100 Гц первый ПД имел обычную форму, а второй ПД не возник – раздражающий стимул пришёл на нисходящую фазу второго дополнительного импульса. Таким образом, имелась зависимость формы второго ПД и величины следовой части после него от межстимульного интервала. Аналогичная закономерность наблюдалась в экспериментах на волокнах, реагирующих на 4-АП растягиванием ПД. Зависимость действия 4-АП от частоты раздражения у этого типа волокон проявлялась в уменьшении длительности ПД по мере сокращения межстимульного интервала.

В неосложнённом большом числом стимулов виде зависимость блокирования 4-АП от межстимульного интервала может быть изучена методом сдвоенных стимулов. На рис. 4, III представлен типичный эксперимент, где путём наложения изображений показан эффект нанесения первого (кондиционирующего) и второго (тестирующего) раздражений в присутствии 2 ммоль/л 4-АП. Момент нанесения тестирующего стимула показан стрелочкой. Как можно видеть, амплитуда и форма вторых ПД, возникающих в ответ на приложение тестирующих стимулов, зависит от момента времени, когда наносилось раздражение. В момент наибольшей СД первого ПД второй ПД имел наименьшую амплитуду и не характеризовался дополнительными

импульсами на нисходящей фазе. По мере удаления от первого потенциала и уменьшения СД постепенно происходило восстановление амплитуды и формы ПД, характерных для первого ПД. Тестирующий стимул, наносимый после завершения СД первого ПД, вызывал возникновение ПД точно такой же амплитуды и формы, что и первый ПД. Итак, амплитуда второго ПД, количество импульсов после него и их амплитуда тем меньше, чем более выражена была СД первого ПД.

До этого данные о зависимости блокирования 4-АП от величины межстимульного интервала были получены на миелинизированных нервных волокнах амфибий только методом фиксации потенциала [14], а на миелинизированных нервных волокнах млекопитающих уже известны из опытов с непосредственной регистрацией ПД [8, 10].

Методом фиксации потенциала [14] показано, что нанесение второго деполяризующего стимула на небольшом расстоянии от первого, когда мембрана волокна ещё остаётся деполяризованной, приводит к частичному высвобождению от блокирования и увеличению доли калиевых каналов, способных пропускать калиевый ток. На второй такой стимул калиевый выходящий ток с 4-АП всегда был больше по сравнению с регистрируемым во время первого деполяризующего стимула. На миелинизированных волокнах млекопитающих Коксисом и Ваксманом [10] обнаружено, что нанесение второго (тестирующего) стимула сразу же после (через 2 мс) многоимпульсного ответа, что соответствовало наиболее выраженной СД, вызывает возникновение ПД без повторных ответов. Нанесение тестирующих стимулов в более поздние периоды времени они не проводили. В другом исследовании [8], также проведённом на миелинизированных нервных волокнах млекопитающих, содержатся данные об эффекте нанесения сдвоенных стимулов во время СД и СГ. Во

время СД тестирующий стимул вызывал ПД без повторных ответов, тогда как кондиционирующий стимул приводил к возникновению многоимпульсного ответа. ПД, вызванные тестирующими стимулами, были меньшей амплитуды в сравнении с ПД, возникшим на кондиционирующий стимул. Нанесение тестирующего стимула во время СГ выражалось в возникновении многоимпульсного ответа, имеющего импульсы большей амплитуды и в большем количестве по сравнению с ответом на кондиционирующий стимул.

Итак, блокирование калиевых каналов 4-АП приводит либо к растягиванию ПД, либо к возникновению многоимпульсного ответа. Степень продления ПД и количество возникающих повторных ответов в многоимпульсном ответе зависят от времени выдерживания нервного волокна в растворе Рингера, содержащем 4-АП. Некоторые волокна проявляли способность генерировать самопроизвольно возникающие ПД, сгруппированные в пачки по 3–4 импульса. Характерным эффектом действия 4-АП было небольшое увеличение амплитуды ПД, наблюдаемое в 80 % случаев. По мере увеличения частоты стимулов и уменьшения расстояния между ними следующие друг за другом ПД уменьшались по своей длительности и теряли способность к генерации повторных ответов. Это связано с тем, что с ростом частоты каждый последующий стимул наносился в момент большей деполяризации мембраны (максимальных величин СД), что способствовало частичному высвобождению от блокирования. Зависимость блокирующего эффекта 4-АП от выраженности СД показана также методом нанесения парных стимулов. Нанесение тестирующих стимулов в разные моменты развития СД после первого ПД позволило установить, что минимальные амплитуды второго ПД и импульсов на его нисходящей фазе соответствовали времени наиболее выраженной СД после

первого ПД. Длительность развивающейся после ритмического раздражения ПТД уменьшалась и сменялась возникновением ПТГ. В тех экспериментах, где ПТГ имела исходно (чаще при частоте раздражения 300 Гц), под влиянием 4-АП наблюдалось её значительное увеличение.

I.V. Kuznetzova, D.A. Evstigneev, N.V. Gluhova

TRANSFORMATION OF ELECTRICAL ACTIVITY IN THE MYELINATED NERVE FIBRES OF AMPHIBIA BY 4-AMINOPYRIDINE

Using the extracellular recording we studied the effect of 4-aminopyridine (4-AP), a potassium channel blocker on the electrical activity of the myelinated nerve fibres of amphibia *Rana ridibunda* Pallas. Two main types of the reaction on 4-AP were established: extension of the action potential and multi-spike response. In some cases the nerve fibres with multi-spike response generated spontaneous activity without stimulation in the form of bursts of action potentials. During repetitive stimulation 4-AP decreased after-depolarization (at the beginning of the stimulation), the posttetanic after-depolarization and the development of posttetanic after-hyperpolarization. Using the paired stimulation it was established that the spike and after-depolarization of the second action potential depended on the size of after-depolarization after the first action potential. The effects of 4-AP were strongly time-dependent.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вергун О.В., Крончева С.Н., Валкина О.Н. 4-аминопиридин увеличивает следовые потенциалы и вызывает спонтанную активность одиночных миелинизированных нервных волокон // Биол. мембраны. – 1995. – **12**, № 1. – С. 69–72.
2. Катальмов Л.Л. Особенности следовой деполяризации нерва и одиночного нервного волокна лягушки // Нейрофизиология. – 1974. – **6**, № 10. – С. 532–541.
3. Chiu S., Ritchie J. Evidence for the presence of potassium channels in the internode of frog myelinated nerve fibres // *J. Physiol.* – 1982. – **322**. – P. 485–501.
4. David G., Modney B., Scappaticci K.A. et al. Electrical and morphological factors influencing the depolarizing after-potential in rat and lizard myelinated axons // *Ibid.* – 1995. – **489**, № 1. – P. 141–157.
5. Dubois J.M. Evidence for existence of three types of potassium channels in the frog Ranvier node membrane // *Ibid.* – 1981. – **318**. – P. 279–295.
6. Dubois J.M. Potassium current in the frog node of Ranvier // *Prog. Biophys. Molec. Biol.* – 1983. – **42**. – P. 1–20.
7. Grissmer S. Properties of potassium and sodium channels in frog internode // *J. Physiol.* – 1986. – **381**. – P. 119–134.
8. Honmou O., Utzschneider D.A., Rizzo M.A. et al. Delayed depolarization and slow sodium currents in cutaneous afferents // *J. Neurophysiol.* – 1994. – **71**, № 5. – P. 1627–1637.
9. Kocsis J.D., Bowe C.M., Waxman S.G. Different effects of 4-aminopyridine on sensory and motor fibers: pathogenesis of paresthesias // *Neurology.* – 1986. – **36**. – P. 117–120.
10. Kocsis J.D., Waxman S.G. Ionic channel organization of normal and regenerating mammalian axons // *Progr. Brain Res.* – 1987. – **71**. – P. 89–101.
11. Pelhate M., Hue B., Chanelet J. Effects de la 4-aminopyridine sur le systeme nerveux d'un insecte: la blatte (*Periplaneta americana* L.) // *C. R. Seances Soc. Biol.* – 1972. – **166**. – P. 1598–1600.
12. Pelhate M., Pichon Y. Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach // *J. Physiol.* – 1974. – **242**. – P. 90–91.
13. Poulter M.O., Padjen A.L. Different voltage-dependent potassium conductances regulate action potential repolarization and excitability in frog myelinated axon // *Neuroscience.* – 1995. – **68**. – P. 497–504.
14. Ulbricht W., Wagner H.H. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization // *Pflüg. Archiv.* – 1976. – **367**. – P. 77–87.
15. Yeh J.Z., Oxford G.S., Wu C.H., Narahashi T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes // *Biophysical J.* – 1976. – **16**. – P. 77–81.

Гос.целевой бюджет экол. фонд Ульянов.области

Материал поступил в редакцию 19.05.2004