

Ионный транспорт в каналах



§ 1. Дискретное описание транспорта

Классическое описание транспорта ионов через биологические мембраны основано на представлении о диффузии не взаимодействующих между собой заряженных частиц в сплошной однородной среде. Электродиффузионные уравнения, полученные в приближении постоянного поля (приближение Гольдмана), составляют теоретическую основу электрофизиологии. Это уравнения [см. (XIX.2.4); (XIX.2.10)], описывающие поток одного вида ионов через мембрану, а также мембранный потенциал в условиях нулевого электрического тока:

$$J = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_o - c_i \exp(zF\varphi/RT)}{1 - \exp(zF\varphi/RT)}, \quad (\text{XXI.1.1})$$

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K_o] + P_{Na}[Na_o] + P_{Cl}[Cl_o]}{P_K[K_i] + P_{Na}[Na_i] + P_{Cl}[Cl_i]}. \quad (\text{XXI.1.2})$$

Уравнения (XXI.1.1) и (XXI.1.2), выведенные в приближении постоянного поля, основываются на следующих постулатах: 1) мембрана представляет собой гомогенную фазу; 2) профиль электрического потенциала в мембране линеен ($d\varphi/dx = \text{const}$); 3) концентрация иона в мембране на границе с раствором пропорциональна концентрации этого иона в среде с коэффициентом пропорциональности γ ; 4) ионы движутся через мембрану независимо, не взаимодействуя между собой.

Если представление о линейной зависимости потенциала от расстояния в первом приближении оправдано по отношению к тонким мембранам с толщиной ≤ 10 нм, то другие предпосылки электродиффузионной теории в случае ионного транспорта нарушаются. \square

Мембрана не является однородной фазой для движения ионов, поскольку перенос ионов через мембраны осуществляется через специализированные участки — ионные каналы, представляющие собой липопротеиновые комплексы сложной структуры.

В узких каналах (натриевый — $0,31 \times 0,51$ нм, калиевый — $0,45 \times 0,45$ нм) невозможна независимая диффузия, а допустимо только однорядное движение ионов. Вследствие узости поры в канале могут происходить сильные ион-ионные взаимодействия.

Различия в поверхностных потенциалах на концах поры могут привести и к различным значениям коэффициента распределения. Возможно также существование локальных неоднородностей электрического поля, связанных с зарядами белковой

молекулы, образующей канал. Наконец, экспериментальные данные показывают, что в натриевом канале входящий и выходящий потоки подчиняются принципу независимости [см. (XIX.2.12.)] в том случае, когда через канал идет Na^+ , но не другие ионы; калиевый канал в гигантском аксоне кальмара вовсе не подчиняется принципу независимости.

Таким образом, существуют явления, которые нельзя объяснить в рамках представлений о свободной диффузии, — это взаимодействие потоков, а также блокировка канала при высоких концентрациях электролита.

В последнее время сформировалась новая теория, в основе которой лежат общие физические принципы.

1. Поступление иона в канал сопровождается замещением воды гидратной оболочки на полярные группы, выступающие полость канала.

2. Особенности взаимодействия иона с молекулярными группами канала учитываются соответствующими профилями потенциальной энергии иона в канале, который представляется рядом последовательных потенциальных ям и барьеров.

3. Ион достаточно долго (по сравнению со временем тепловых колебаний) задерживается в каждой потенциальной яме. Перескок возможен только в пустую яму. Второй ион не может попасть в занятую потенциальную яму из-за электростатического взаимодействия с уже находящимся там ионом.

4. Перескоки между ямами совершаются под действием тепловых флуктуаций. Вероятность перескока зависит от приложенного электрического поля. □

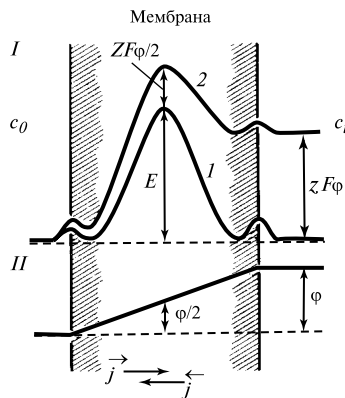


Рис. XXI.1.

Энергетический профиль в трехбарьерной модели канала (I) в отсутствие поля (1) и при наложении на мембрану разности электрических потенциалов (2), и профиль электрического потенциала ϕ на мембране (II):

c_o , c_i — концентрации электролита в окружающем мембрану растворе, E — высота основного центрального барьера, z — валентность иона, F — число Фарадея, \vec{j} и \bar{j} — односторонние потоки иона через канал

Исходя из этих предположений уравнение для потока ионов можно вывести на основе теории абсолютных скоростей реакций Эйринга, если рассматривать транспорт ионов как серию последовательных перескоков через энергетические барьеры в канале. Наиболее простым и достаточно общим оказывается случай, когда в мембране существует всего три кинетических барьера. Боковые барьеры соответствуют входным участкам канала, где происходит первичный процесс дегидратации, центральный барьер — селективной области (селективный фильтр). Если скорость переноса ионов через канал лимитируется центральным энергетическим барьером, который расположен посередине толщины мембраны (рис. XXI.1), то односторонние

ионные потоки определяются уравнениями [см. (XIV.1.1)]

$$\begin{aligned} \vec{j} &= c_o A \exp \left[- \left(\frac{E}{RT} + \frac{\varphi F z}{2RT} \right) \right] = c_o \nu \exp \left(- \frac{z F \varphi}{2RT} \right), \\ \overleftarrow{j} &= c_i A \exp \left[- \left(\frac{E}{RT} - \frac{\varphi F z}{2RT} \right) \right] = c_i \nu \exp \left(\frac{z F \varphi}{2RT} \right). \end{aligned} \quad (\text{XXI.1.3})$$

где A — константа, E — высота барьера в отсутствие электрического поля, ν — константа скорости перехода через основной барьер в отсутствие электрического поля.

Величину $F\varphi/RT$ часто называют безразмерным потенциалом. Вводя $\psi = F\varphi/RT$ в уравнения (XXI.1.3), получим выражение для тока, переносимого ионами данного вида:

$$I = zF(\overleftarrow{j} - \vec{j}) = zF\nu(c_i \exp(z\psi/2) - c_o \exp(-z\psi/2)). \quad (\text{XXI.1.4})$$

В условиях симметричного ионного окружения ($c_o = c_i = c$) вольтамперная характеристика канала описывается формулой

$$\begin{aligned} I &= zF\nu c (\exp(z\psi/2) - \exp(-z\psi/2)) = zF\nu c \operatorname{sh}(z\psi/2); \\ \operatorname{sh} x &= \frac{1}{2}(\exp x - \exp(-x)). \end{aligned} \quad (\text{XXI.1.5})$$

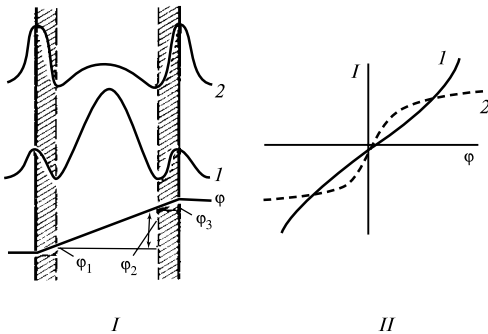


Рис. XXI.2.

Профили энергии в каналах с внутренней лимитирующей стадией (I, 1) и граничной лимитирующей стадией (I, 2) и соответствующие вольтамперные характеристики каналов (II):

I — ток, φ — электрический потенциал; φ_1 , φ_2 , φ_3 — падение напряжения на участках мембраны, соответствующих трем энергетическим барьерам

Таким образом, если ток через канал определяется скоростью переноса ионов через основной энергетический барьер, расположенный в центре мембраны, то вольтамперная характеристика имеет форму гиперболического синуса: с ростом напряжения на мембране проводимость возрастает (согласно приближению постоянного поля, мембрана, находящаяся в симметричном ионном окружении, обладает линейной вольтамперной характеристикой (т. е. проводимость постоянна). \square

По форме вольтамперной характеристики ионного канала можно выявить, какая стадия, граничная или внутренняя, определяет перенос иона через канал. Рис. XXI.2 иллюстрирует соотношение между профилем энергии (I) и формой вольтамперной характеристики канала (II). Если ток через канал определяется

переносом через центральный барьер, то, как видно из (XXI.1.5), вольтамперная характеристика будет наклоняться к оси токов (кривые 1). Если же ток определяется скоростью входа в канал, то при больших напряжениях на мембране все ионы, входящие в канал, будут переноситься через него, а ток стремится к насыщению (кривые 2). Константы скорости переноса ионов через боковые барьеры слабо зависят от электрического поля, поскольку приложенная к мембране разность потенциалов практически вся падает на внутренней части мембраны (падение напряжения φ_2), а падение потенциала на границе незначительно (падение напряжения φ_1 и φ_3). На рис. XXI.2 показано, что суммарный скачок потенциала на мембране складывается из небольших по величине скачков потенциала на границах (φ_1 и φ_3) и основного падения потенциала на внутренней части мембраны.

Как видно из уравнений (XXI.1.3), отношение односторонних потоков равно

$$\vec{j} / \overleftarrow{j} = \frac{c_o}{c_i} \exp\left(-\frac{zF\varphi}{RT}\right), \quad (\text{XXI.1.6})$$

что совпадает с формулой Уссинга [см. (XIX.2.12)], выведенной на основе электродиффузной модели. Это является следствием того, что выражения (XXI.1.3)–(XXI.1.6) были получены для случая разбавленных растворов ионов, когда канал большую часть времени остается пустым и ионы «не мешают» друг другу. Однако и в этом случае симметрия вольтамперной характеристики существенным образом зависит от положения основного барьера относительно середины мембраны. При расположении основного энергетического барьера у одной из сторон мембраны обнаруживается эффект выпрямления: поток ионов в одном направлении существенно зависит от потенциала, а встречный поток слабо чувствителен к изменениям мембранного потенциала.

§ 2. Блокировка и насыщение канала

В теории постоянного поля проводимость мембраны (для иона i), находящейся в симметричном ионном окружении [см. (XIX.2.6)], должна линейно возрастать с повышением концентрации электролита

$$g_i = \frac{z^2 F^2 P_i c_i}{RT}. \quad (\text{XXI.2.1})$$

∇ Теория одnorядного транспорта в канале учитывает нелинейные и немонотонные зависимости проводимости каналов от концентрации. Приведенные формулы (XXI.1.3)–(XXI.1.5) справедливы лишь при низких концентрациях электролита, когда канал большую часть времени остается пустым. При высоких концентрациях ионов оба участка связывания на «входе» и «выходе» меняют свои состояния не только в процессе самого транспорта через канал, но и за счет взаимодействия с омывающими растворами. Иными словами, скорость транспорта в канале должна зависеть от вероятности заполнения ионами участков связывания на границах мембраны, что может приводить к заполнению обоих мест связывания и блокировке канала при высоких концентрациях электролита. Рассмотрим модель канала с двумя центрами связывания и одним основным энергетическим барьером (рис. XXI.3). □

Каждый участок связывания может находиться в одном из двух состояний: заполненном или незаполненном. Вероятность заполнения входного участка канала Θ ионами зависит от их концентрации и может быть найдена из условия равновесия потоков, направленных из раствора в канал и обратно. Так, для левого участка связывания условие равенства потоков имеет вид

$$k_1 c(1 - \Theta) = k_2 \Theta, \quad (\text{XXI.2.2})$$

где c — концентрация иона в среде, $(1 - \Theta)$ — вероятность того, что участок связывания свободен, а k_1 и k_2 — константы. Отсюда следует

$$\Theta = \frac{k_1 c}{k_2 + k_1 c} = \frac{(k_1/k_2)c}{1 + (k_1/k_2)c} = \frac{\gamma c}{1 + \gamma c}, \quad (\text{XXI.2.3})$$

где $\gamma = k_1/k_2$ — коэффициент распределения иона. Соответственно

$$1 - \Theta = (1 + \gamma c)^{-1}. \quad (\text{XXI.2.4})$$

Уравнение (XXI.2.3) показывает, что $\Theta = \gamma c/(1 + \gamma c)$ линейно возрастает с увеличением c в области низких концентраций и выходит на плато при высоких концентрациях.

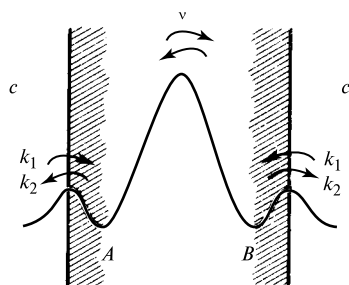


Рис. XXI.3.

Симметричный энергетический профиль модели канала:

c — концентрация электролита в окружающем растворе; k_1, k_2 — константы сорбции и десорбции в участках связывания A и B , ν — константа преодоления основного энергетического барьера

Односторонний поток слева направо в канале можно выразить в виде произведения $\Theta_A(1 - \Theta_B)$, которое отражает вероятность нахождения канала в состоянии 1 0 (левая яма занята ионом, правая — пустая), умноженного на потенциалзависимую константу скорости перехода иона через центральный барьер в состояние 0 1 (левая яма пуста, правая занята ионом):

$$\vec{j} = \Theta_A(1 - \Theta_B)\nu \exp\left(-\frac{\varphi F}{2RT}\right). \quad (\text{XXI.2.5})$$

Так как Θ_A и $(1 - \Theta_B)$ определяются концентрациями электролита по разные стороны мембраны, то, согласно (XXI.2.5), односторонний поток зависит от концентраций иона в обоих омывающих мембрану растворах. Следовательно, принцип независимости ионных потоков в применении к каналам при высоких концентрациях ионов не соблюдается [см. (XIX.2.12); (XXI.1.6)]. \square

Если концентрации транспортируемого иона в обоих омывающих растворах одинаковы и равны c , то односторонний поток равен

$$\begin{aligned} \vec{j} &= \Theta(1 - \Theta)v \exp\left(-\frac{\varphi F}{2RT}\right) = \frac{\gamma c}{1 + \gamma c} \frac{1}{1 + \gamma c} v \exp\left(-\frac{\varphi F}{2RT}\right) = \\ &= \frac{\gamma c}{(1 + \gamma c)^2} v \exp\left(-\frac{\varphi F}{2RT}\right). \quad (\text{XXI.2.6}) \end{aligned}$$

При малых концентрациях, когда $\gamma c \ll 1$, поток иона через канал возрастает пропорционально концентрации, однако с дальнейшим ростом концентрации знаменатель в предэкспоненциальном множителе $\gamma c(1 + \gamma c)^{-2}$ растет быстрее, чем числитель, и поток иона через канал тормозится (рис. XXI.4). Таким образом, для канала с двумя участками связывания («двухместный канал») характерно снижение проводимости при высоких концентрациях иона в окружающих растворах, когда оба центра связывания заполнены (канал находится в состоянии 1 1). Это наблюдается, например, для грамицидиновых каналов, формируемых в БЛМ, в присутствии повышающихся концентраций Cs^+ .

В экспериментах зависимость проводимости канала от концентрации ионов часто характеризуется насыщением, которое обусловлено нахождением в канале только одного иона. Второй ион не может войти в канал из-за электростатического взаимодействия с ионом, уже находящимся в канале. С ростом концентрации электролита односторонний поток через такой «одноместный» канал стремится к насыщению. Аналогичным образом меняется и проводимость. Такие насыщающиеся зависимости проводимости характерны, например, для каналов, образуемых в БЛМ грамицидином в присутствии 5 мМ–5 М растворов NaCl, а также для амфотерициновых каналов при физиологических концентрациях электролита.

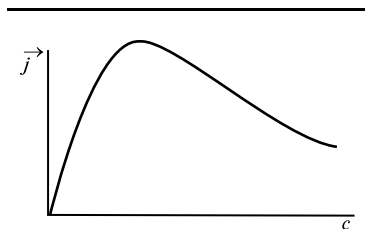


Рис. XXI.4.

Эффект блокировки потока ионов через канал:

c — концентрация электролита,
 \vec{j} — односторонний поток через канал

§ 3. Функции состояния канала

Ионный канал с одним участком связывания может находиться только в двух состояниях: в свободном или заполненном. Канал с двумя участками связывания может находиться в четырех состояниях, между которыми возможны переходы, изображенные на схеме (рис. XXI.5). □

Под функциями состояния канала понимают вероятности нахождения канала в отдельных состояниях (т. е. в состояниях 1 0; 0 1; 1 1; 0 0). Проводимость канала (g) зависит от вероятности нахождения канала в состояниях 1 0 и 0 1, поскольку суммарный поток определяется выражением

$$J = l'F(1\ 0) - l''F(0\ 1), \quad (\text{XXI.3.1})$$

где $F(1\ 0)$ и $F(0\ 1)$ — вероятности состояний 1 0 и 0 1 соответственно, а l' и l'' — потенциалзависимые константы скорости перехода ионов через центральный

барьер:

$$l' = \nu \exp\left(-\frac{\varphi F}{2RT}\right); \quad l'' = \nu \exp\left(\frac{\varphi F}{2RT}\right). \quad (\text{XXI.3.2})$$

В модели однорядного транспорта функции состояния $F(0\ 0)$, $F(1\ 0)$ и другие находят, решая систему дифференциальных уравнений, составленных на основе приведенной кинетической схемы (см. рис. XXI.5, II и § 2 гл. IV). Например, балансное уравнение для функции состояния $F(1\ 0)$ записывается в виде

$$\frac{dF(1\ 0)}{dt} = F(0\ 0)k_1c \exp\left(-\frac{zF\varphi_1}{2RT}\right) + F(0\ 1)\nu \exp\left(-\frac{zF\varphi_2}{2RT}\right) + F(1\ 1)k_{-2} \exp\left(\frac{zF\varphi_3}{2RT}\right) - F(1\ 0) \left[k_{-1} \exp\left(-\frac{zF\varphi_1}{2RT}\right) \nu \exp\left(\frac{zF\varphi_2}{2RT}\right) + k_2c \exp\left(-\frac{zF\varphi_3}{2RT}\right) \right], \quad (\text{XXI.3.3})$$

где φ_1 , φ_2 и φ_3 — падение потенциала на боковых и центральном барьерах ($\varphi_1 + \varphi_2 + \varphi_3 = \varphi$). Аналогичным образом записывают уравнения для $dF(0\ 0)/dt$; $dF(1\ 1)/dt$

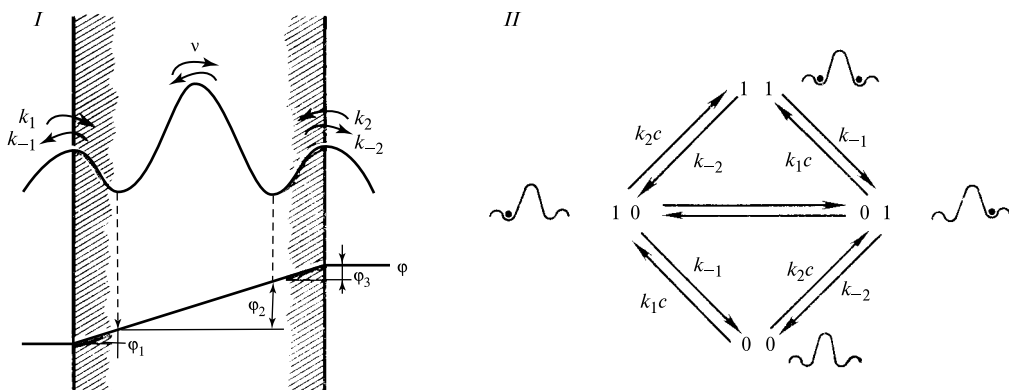


Рис. XXI.5.

Кинетическая схема переходов между отдельными состояниями для трехбарьерного канала. I — профили энергии и потенциала φ ; II — модель переходов:

c — концентрация электролита в водных растворах, k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} — константы преодоления боковых барьеров, l' , l'' — потенциалзависимые константы скорости перехода ионов через центральный барьер, 0 — пустые участки связывания, 1 — заполненные участки связывания (связь между константами l и ν дается уравнением (XXI.3.2))

и $dF(0\ 1)/dt$. Поскольку сумма вероятностей всех состояний канала равна единице, условие нормировки имеет вид

$$F(1\ 1) + F(1\ 0) + F(0\ 1) + F(0\ 0) = 1. \quad (\text{XXI.3.4})$$

Для решения системы в стационарном случае используют метод диаграмм.

§ 4. Ионный канал как динамическая структура

Если один из участков связывания в канале заполнен, то поступление в свободный участок второго иона будет затруднено в связи с необходимостью дополнительных затрат на преодоление энергии кулоновского взаимодействия с уже находящимся в канале ионом. Иначе говоря, попадание иона в левую потенциальную яму приведет к повышению энергетического барьера, соответствующего переходу иона из раствора в правую потенциальную яму (рис. XXI.6).

Таким образом, при учете кулоновских взаимодействий вид энергетического профиля зависит от положения и числа ионов в канале. В связи с изменением высоты барьеров изменяются и константы скорости перехода через отдельные барьеры. Например, константа скорости, соответствующая поступлению второго иона в канал, будет равна

$$k_1^{10} = k_1^{00} \exp(-W/2RT), \quad (\text{XXI.4.1})$$

где W — энергия кулоновского взаимодействия: $W = e^2/\epsilon r$; r — расстояние между потенциальными ямами.

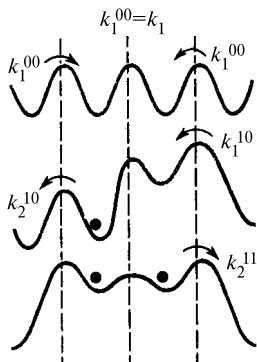


Рис. XXI.6.

Зависимость энергетического профиля от заполнения канала при учете кулоновских взаимодействий

k_1 — константы поступления иона в раствор, k_2 — константы выхода иона из раствора. Верхние индексы соответствуют разным состояниям канала с разным заполнением участков связывания

При изменении числа частиц в канале энергетические профили изменяются таким образом, что вход второго иона в канал по сравнению с входом первого затрудняется, а выход второго иона из канала, напротив, идет очень легко. Подробный анализ модели показывает, что кулоновское ион-ионное взаимодействие значительно ускоряет общий ионный транспорт через канал.

Высота барьеров может претерпевать динамические изменения не только за счет кулоновских взаимодействий ионов в канале, но и в результате конформационных перестроек белка, формирующего ионный канал, которые могут инициироваться перескоками иона между отдельными участками связывания. Сильное электрическое поле иона, попадающего в канал, вызывает поляризацию и переориентацию близлежащих полярных групп. В результате появления такого криформационно неравновесного состояния смещается уровень потенциальной энергии в участке связывания и изменяется высота ближайших барьеров. □

Особенно важное значение могут иметь циклические изменения конформации мембранных белков, обусловленные биоэнергетическими процессами. Такие периодические конформационные перестройки протекают, по-видимому, в АТФазе энергосопрягающих мембран в процессе ее функционирования, в цитохромах при изменении их окислительно-восстановительного состояния, в бактериородопсине галофильных бактерий при возбуждении хромофорной группы (см. гл. XXIV; XXX). Это обстоятельство послужило основой для гипотезы о том, что системы активного транспорта ионов, использующие энергию света, АТФ или разности редокс-потенциалов, представляют собой трансмембранный ионный канал с регулируемой высотой энергетических барьеров (см. § 4 гл. XXII).

§ 5. Транспорт в открытом канале. Теория селективности

Исследования ионной проницаемости возбудимых мембран нервных волокон кальмара привели к выводу о существовании в этих мембранах двух основных типов каналов: селективно пропускающих Na^+ и селективных для K^+ . Следует отметить, что представления о наличии у биологических мембран ионной селективности сложились задолго до работ А. Ходжкина и А. Хаксли. Избирательная проницаемость клеточной мембраны нервов для K^+ и возрастание проницаемости при возбуждении для других ионов предполагались Дж. Бернштейном (1902). В теории пор (теория молекулярного сита) П. Бойля и Е. Конвея (1941) проницаемость мембранных пор для ионов определялась прежде всего гидратационным радиусом ионов. Предполагали, что меньший по размеру гидратированный ион K^+ свободнее, чем гидратированный ион Na^+ , проникает через клеточные мембраны.

Современный взгляд на селективность биомембран основан главным образом на теории ионообменной селективности, созданной Дж. Эйзенманом применительно к ионоселективным стеклянным электродам. Сродство иона к участкам связывания в ионных каналах определяется значением свободной энергии перехода иона из раствора в канал, которое зависит от следующих факторов.

Проникновение иона в пору облегчается тем, что возрастание свободной энергии, обусловленное потерей гидратной оболочки (500–700 кДж/моль), компенсируется понижением энергии при взаимодействии с дипольными группами канала.

Другим важным фактором, облегчающим проникновение иона в канал, является кулоновское взаимодействие транспортируемого катиона с фиксированным анионным центром в просвете канала. Наличие дипольных групп в канале и фиксированных зарядов приводит к тому, что энергия перехода иона из раствора в канал не превышает $\sim 30,5$ кДж/моль. \square

Переход иона из раствора в полость канала можно формально рассматривать как перенос иона из среды с диэлектрической проницаемостью ϵ_s в среду с диэлектрической проницаемостью ϵ_p и последующее приведение иона в контакт с фиксированным отрицательным зарядом. Поэтому изменение свободной энергии при переходе одновалентного иона из среды в полость канала записывается в виде

$$\Delta W = \frac{e^2}{2a} \left(\frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) - \frac{e^2}{(a+c)\epsilon_p}, \quad (\text{XXI.5.1})$$

где $\frac{e^2}{(a+c)\epsilon_p}$ — энергия кулоновского взаимодействия иона радиуса a с фиксированным в стенке канала анионом радиуса c . В целях более компактной записи энергии дегидратации проникающего иона [см. (XVIII.2.6)] и энергии кулоновского взаимодействия, формула (XXI.5.1) приведена в системе СГС. Как видно из (XXI.5.1) и показано на рис. XXI.7, зависимость ΔW от ионного радиуса немонотонна и весьма чувствительна к размеру фиксированного аниона. Соответственно лучше всего связываются в канале ионы, для которых изменение свободной энергии минимально.

Порядок расположения катионов щелочных металлов в рядах селективности меняется в зависимости от предполагаемого радиуса анионного центра. Для самых больших анионных радиусов энергия кулоновского взаимодействия мала и определяющим фактором является взаимодействие катиона с водой. В этом случае сродство катиона к участкам связывания в мембране возрастает с увеличением ионного радиуса в ряду связывания: $Cs > Rb > K > Na > Li$.

Для самых малых анионных радиусов, наоборот, преобладает притяжение катиона к фиксированному отрицательному заряду аниона и тогда образуется ряд

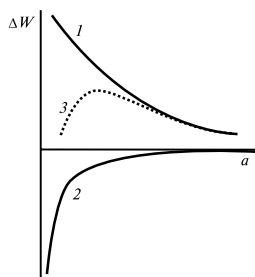


Рис. XXI.7.

Изменение свободной энергии ΔW иона радиуса a при переходе из раствора в мембранную пору с фиксированным анионом:

1 и 2 — кривые зависимости энергии дегидратации и энергии кулоновского взаимодействия от ионного радиуса;
3 — сумма кривых 1 и 2

связывания, в котором катионы меньшего радиуса связываются прочнее, чем крупные: $Li > Na > K > Rb > Cs$. Существуют другие переходные ряды для промежуточных значений радиуса фиксированного отрицательного заряда.

В случае проникновения через канал органических катионов важен не только их размер, но и способность образовывать водородные связи. Так, из трех изостерических молекул — гидроксиламина, гидразина и метиламина — метиламин практически не проходит через Na^+ -канал, так как не образует водородных связей с атомами кислорода в выступающих группировках канала. □

Наблюдаемая в опытах резкая зависимость проницаемости ионов от их геометрии и размеров говорит о том, что она определяется топографией селективного фильтра, соответствующего наиболее узкому месту. Когда размер иона достигает критического значения, его проницаемость падает до нуля. В целом, однако, структурные факторы, определяющие проницаемость, не сводятся лишь к геометрии иона и селективного фильтра, а должны включать детали химического строения макромолекул канала, а также сопряженных с перемещением ионов движений молекул воды в поре. Метод динамического моделирования внутримолекулярной подвижности (гл. XI, § 3) позволяет изучать динамику движения ионов на коротких временах 10^{-8} – 10^{-9} с, которые близки к разрешающей способности метода.

Моделировались движения молекул воды в узкой части поры канала K^+ ($\sim 0,3$ нм– $0,5$ нм), через которую проходят ионы (Грин, 1991). Оказалось, что наличие в стенках каналов заряженных групп белка (COO^- , NH_2^+) так изменяет характер движения воды внутри поры, переводя воду в связанное состояние, что молекулы воды закрывают узкое место канала и блокируют тем самым прохождение ионов. Подобные механизмы могут лежать в основе управления ионной проницаемостью канала (см. Воротные токи, гл. XXIII).

§ 6. Общие свойства ионных каналов нервных волокон

Среди различных ионных каналов биологических мембран наиболее полно охарактеризованы два основных типа каналов, содержащихся в нервных волокнах: Na^+ -каналы и K^+ -каналы.

Соответствующие данные получены главным образом на основании кинетики прохождения ионных потоков через каналы при различных воздействиях. В результате удалось установить общую схему функционирования каналов, структура

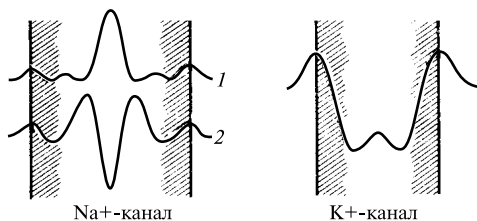


Рис. XXI.8.

Энергетические профили натриевого и калиевого каналов возбудимых мембран:

1 и 2 — альтернативные модели Na^+ -канала

которых представляет собой сложный макромолекулярный комплекс, активно взаимодействующий с проходящим ионом. Однако прямые экспериментальные данные о молекулярном строении каналов были получены сравнительно недавно, а именно они позволяют по-новому осмысливать предлагаемые модели работы каналов. Мы рассмотрим эти вопросы в последующих разделах.

Экспериментальные данные по транспорту ионов в Na^+ -канале адекватно описываются на основе двух различных моделей с отличающимися профилями энергии (рис. XXI.8) (кривые 1 и 2). Входящий и выходящий потоки Na^+ в Na^+ -канале независимы; этот факт соответствует энергетическому профилю с высоким центральным барьером (кривая 1). Однако такая форма энергетического профиля не согласуется с данными о существовании в селективном центре Na^+ -канала фиксированной анионной группы, которое доказывается зависимостью проводимости Na^+ -каналов от pH среды. Протонирование кислотной группы (pK 5,2) приводит к блокированию Na^+ -канала. При физиологических значениях pH состоянию канала с депротонированной кислотной группой больше соответствует профиль, в котором центральный энергетический барьер расщеплен на два (рис. XXI.8; кривая 2). В таком канале фиксированный анионный центр, притягивая катионы, облегчает их вход в канал. Однако тем самым одновременно затрудняется выход из основной потенциальной ямы, который может облегчиться, когда в боковом участке связывания появляется второй катион. Электростатическое отталкивание способствует выходу первого иона, и второй ион может заполнить центральную яму.

Согласно данным Б. Хилле, через Na^+ -канал могут проходить различные органические катионы, размеры которых не превышают $0,3 \times 0,5$ нм, что соответствует минимальному сечению поры. Размеры многих из проникающих ионов такие же, как у частично гидратированного иона Na (рис. XXI.9). Очевидно, ион Na может проходить через селективный фильтр, сохраняя в гидратной оболочке 1–3 молекулы воды. На рис. XXI.9, *Б* приведен энергетический профиль Na -канала.

Органические катионы, способные к проникновению через Na^+ -канал, не содержат метильной ($-\text{CH}_3$) или метиленовой ($-\text{CH}_2-$)-групп. Например, ионы гидроксилламмония ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{OH}$) и метиламмония ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_3$) обладают одинаковыми размерами порядка $0,45 \times 0,38 \times 0,38$ нм. Однако Na^+ -канал оказывается проницаемым для гидроксилламмония и непроницаемым для метиламмония, в молекуле которого содержится CH_3 -группа. Возможно, что вдоль стенок поры расположены атомы кислорода, с которыми атом водорода OH -группы гидроксилламмония может образовывать сильную водородную связь, уменьшая тем самым эффективный размер иона. В результате обеспечивается прохождение иона через пору шириной всего 0,3 нм. Водородные атомы метильной группы метиламмония не могут образовывать водородные связи, поэтому данная группа остается слишком большой по размеру и не проходит через пору.

Величины относительной проницаемости в Na - и K -каналах для ионов составляют соответственно: литий — 0,93; 0,02, таллий — 0,33; 2,3, метиламмоний — 0,007; 0,02.

Предполагаемый энергетический профиль для калиевого канала показан на рис. XXI.8. Такой профиль соответствует условиям, когда наиболее медленной стадией транспорта является переход частиц через границу мембраны. Форма энергетического профиля предполагает также, что десорбция ионов замедлена относительно адсорбции из раствора. Подробный анализ модели с учетом указанных предположений показывает, что канал все время находится в заполненном двухчастичном состоянии. Поэтому выход частицы из канала в раствор сопровождается последовательным сдвигом ионов по всему каналу. А так как число ям в канале равно двум, то «порядок» реакции увеличивается вдвое. В этих условиях формула Уссинга [см. (XIX.2.12)] не соблюдается:

$$\frac{\vec{j}}{j} = \frac{c_i}{c_o} \exp\left(-\frac{2zF\varphi}{RT}\right) = \exp\left(\frac{2zF(\varphi_0 - \varphi)}{RT}\right) = \exp[2(\psi_0 - \psi)], \quad (\text{XXI.6.1})$$

где φ_0 — равновесный нернстовский потенциал. Появление e^2 в отношении односторонних потоков соответствует удвоению порядка реакции при переносе иона через канал.

Эмпирический коэффициент n , появляющийся в так называемой обобщенной формуле Уссинга (для K^+ -канала $n = 2$)

$$\frac{\vec{j}}{j} = \exp\left(\frac{nzF(\varphi_0 - \varphi)}{RT}\right), \quad (\text{XXI.6.2})$$

по данным разных исследователей, варьирует в пределах 1,5–2,5, что хорошо согласуется с теоретической моделью. Теория показывает, что число n в обобщенной формуле Уссинга имеет смысл среднего числа ионов в канале.

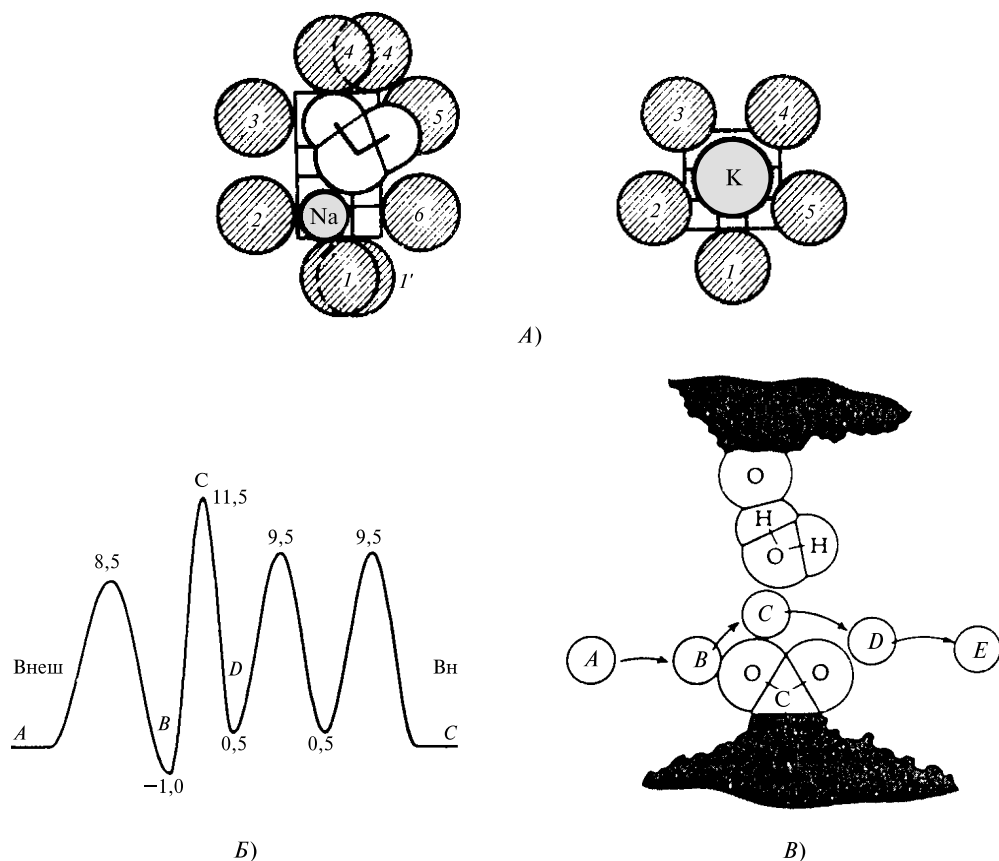


Рис. XXI.9.

Гипотетическая структура селективных фильтров Na- и K-каналов с находящимися внутри ионами (по В. Hille, 1992).

A) Фронтальная проекция селективного фильтра; 1, 1' — COO группа; 2-6 — атомы кислорода; масштабная сетка нанесена в десятых долях нанометра; в Na-канале находится молекула воды.

B) Энергетический профиль Na-канала. Обозначения A, B, C, D и E соответствуют энергиям иона на разных стадиях его перехода через канал. Уровни энергии потенциальных барьеров для иона Na приведены в единицах RT . Для ионов с меньшей проникающей способностью пик C должен быть более высоким; ионам с более сильным связыванием в канале соответствует более глубокая потенциальная яма B.

B) Вид селективного фильтра Na-канала в направлении, параллельном плоскости мембраны. A, B, C, D и E обозначают различные положения ионов в канале. В положении C ион проходит через наибольшее сужение канала — селективный фильтр, в котором присутствует заряженная COO⁻ группа (снизу) и атом кислорода (сверху), а также молекула воды. Темные зоны сверху и снизу изображают устье канала.

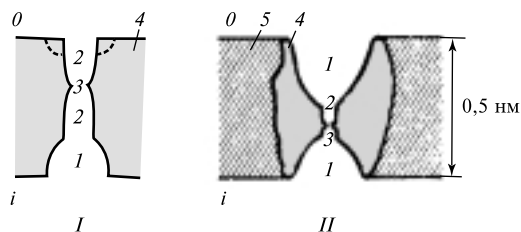


Рис. XXI.10.

Калиевые каналы аксона (I) и саркоплазматического ретикулума (II):

1 — широкое устье диаметром около 1 нм, 2 — узкая часть поры, 3 — критическое сужение (селективный фильтр), штриховыми линиями показан возможный внешний участок связывания тетраэтиламмония, 4 — белковый компонент, 5 — липидный бислой, *o*, *i* — соответственно внешняя и внутренняя стороны мембран

Калиевые каналы содержат широкое устье со стороны цитоплазмы. Это устье может блокироваться тетраэтиламмонием и более крупными его производными, такими как пентилтриэтиламмоний и нонилтриэтиламмоний (рис. XXI.10). Эффективность блокаторов возрастает с ростом длины гидрофобной углеводородной цепи. Если повысить наружную концентрацию K^+ , входящий поток K^+ как бы выталкивает крупные катионы блокаторов во внутренний раствор, в результате чего ускоряется выход каналов из заблокированного состояния. Высокая эффективность ионов-блокаторов с длинной гидрофобной цепью свидетельствует о наличии в устье канала гидрофобных участков. Для того чтобы ионы тетраэтиламмония и нонилтриэтиламмония могли входить в пору, диаметр устья должен быть не менее 0,8 нм. Узкая часть поры проницаема для ионов с размерами от 0,26 до 0,3 нм и непроницаема как для меньших, так и для больших ионов. Ионы, размер которых больше 0,3 нм, не могут проходить через пору по стерическим причинам. Ионы, размер которых меньше 0,26 нм, недостаточно эффективно взаимодействуют с атомами O, которые расположены в стенках поры (см. рис. XXI.9). Ион K^+ эффективно взаимодействует со всеми атомами O, расположенными в стенках поры, и его энергия в поре незначительно больше, чем в воде. Ион Na^+ эффективно связывается только с двумя атомами O в селективном фильтре, другие атомы не могут подойти к Na^+ из-за жесткости стенок поры. По этой причине потенциальная энергия Na^+ значительно выше, чем в воде, и ион не проходит через селективный фильтр K^+ -канала. В целом K^+ -каналы лучше различают ионы, чем Na^+ -каналы.

Проводимость одиночного K^+ -канала в аксонах кальмара составляет около 10 пСм. В мембранах саркоплазматического ретикулума обнаружены высокоспецифичные K^+ -каналы, проводимость которых почти на порядок выше и составляет 130 пСм. Предполагаемое строение таких каналов показано на рис. XXI.10, II. Диаметр широкого устья каналов составляет не менее 1 нм. Узкая часть поры имеет диаметр около 0,7 нм и длину 1 нм. В узкой части канала находится селективный фильтр с диаметром пропускного отверстия 0,4–0,5 нм. Представляется вероятным, что K^+ -каналы с низкой и высокой проводимостью построены по общей схеме, т. е. имеют широкое устье, в котором происходит свободная диффузия ионов, узкую цилиндрическую часть поры, на которой в основном падает трансмембранная разность потенциалов, и селективный фильтр. Различие в проводимостях K^+ -каналов двух типов может быть обусловлено лишь различной длиной узкой части канала.

Метод локальной фиксации напряжения (пэтч-кламп). Ионные каналы биологических мембран исследуют главным образом с помощью метода локальной фиксации напряжения, называемого также методом пэтч-кламп. В этом методе напряжение фиксируют на микроучастке клеточной поверхности, что позволяет регистрировать токи одиночных ионных каналов. Первые такие измерения, были осуществлены Э. Неером и Б. Сакманом в 1976 г. В качестве измерительного электрода используют стеклянную микропипетку с диаметром отверстия 0,5-1 мкм и электрическим сопротивлением около 5 МОм. С помощью специального устройства в пипетке можно создать пониженное давление и втянуть фрагмент клеточной мембраны в кончик микроприсоски. Клеточная мембрана образует плотный и механически прочный контакт о торцом микропипетки, благодаря чему обеспечивается надежная электрическая изоляция мембранного фрагмента от остальной поверхности клетки и внеклеточного раствора. Сопротивление изоляции достигает 100 ГОм (гигаомный контакт), что обуславливает низкие значения тока утечки и низкий уровень шумов тока. В этих условиях могут быть зарегистрированы изменения тока, связанные с открыванием и закрыванием отдельных ионных каналов.

Благодаря механической прочности контакта между стеклом в торце микропипетки и клеточной мембраной мембранный фрагмент можно отделить от клетки, получив доступ к его внутренней поверхности, либо разрушить мембранную перегородку в кончике пипетки и получить сравнительно низкоомный контакт с внутриклеточной средой. В зависимости от условий различают несколько вариантов измерений: 1) на микроучастке мембраны с прикрепленной клеткой, 2) на изолированном участке мембраны с внешней поверхностью, обращенной внутрь пипетки, 3) на изолированном фрагменте, внешняя поверхность которого обращена наружу, 4) измерение интегральных токов на целой клетке (метод внутреннего диализа). Каждый из вариантов отведения токов имеет свои преимущества. Регистрация в режиме «клетка прикреплена» обеспечивает условия, наиболее близкие к физиологическим для работы ионных каналов. При этом сохраняются механизмы внутриклеточной регуляции канальной активности и связи канала с периферическими слоями цитоплазмы. Опыты на изолированных фрагментах обеспечивают возможность полного контроля ионного состава растворов с обеих сторон мембраны. Метод внутриклеточного диализа позволяет измерять ионные токи через всю клеточную поверхность на клетках малого размера (диаметр 10–20 мкм) в условиях постепенного вымывания компонентов цитоплазмы и их замещения на раствор, заполняющий микроприсоску.

Измерения токов одиночных каналов при различных напряжениях и разном ионном составе окружающих растворов дают сведения о проводимости каналов, среднем времени открытого и закрытого состояний, несут информацию о потенциалозависимости и селективности каналов, и дают основу для построения кинетических моделей функционирования ионных каналов. Этот метод позволяет также исследовать модификации структурно-функциональных характеристик каналов при воздействии различных фармакологических препаратов.

Общая схема Na^+ , K^+ -канала. В главе XXIII мы рассмотрим подробно молекулярные механизмы проводимости Na^+ - и K^+ -каналов и ее изменения в процессе генерации нервного импульса. Сейчас заметим лишь, что открывание каналов обес-

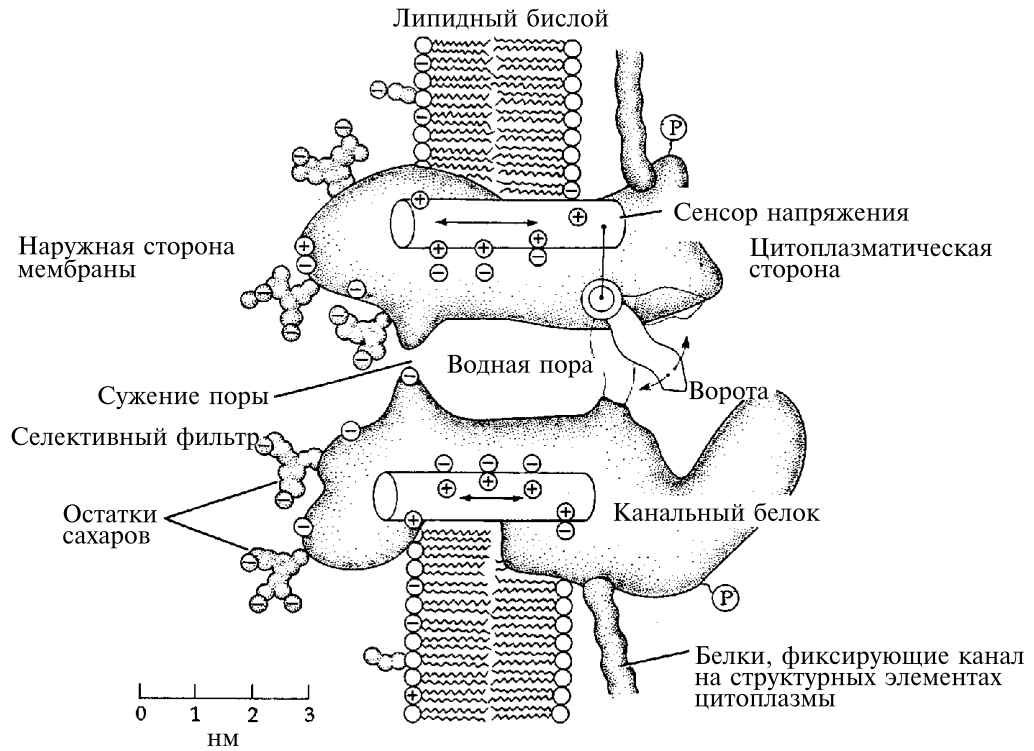


Рис. XXI.11.

Схематическое изображение ионного канала (по В. Hille, 1992).

Канал изображен в виде расположенной в мембране макромолекулы со сквозной полостью посередине. Часть молекулы, обращенная в наружный раствор, несет гликозидные группы. Представления о функциональных участках канала — селективном фильтре, воротах и сенсоре напряжения — основаны преимущественно на методе фиксации напряжения и дополнены данными структурных исследований

печивается специальным молекулярным «воротным» устройством, которое открывает пору при изменении внешнего электрического потенциала.

На рис. XXI.11 (Хилле, 1993) приведена структурно-функциональная схема канала, где воротное устройство открывается о помощью управляющего сенсора, чувствительного к внешнему электрическому полю. «Тело» канала состоит из трансмембранного белка, погруженного в липидный бислой. Как будет показано ниже, макромолекула включает 1900–4000 аминокислотных остатков, уложенных в одну или несколько полипептидных цепей, а также несколько сот сахарных остатков, ковалентно связанных с аминокислотами во внешнем пространстве. Внутренняя поверхность поры включает в основном гидрофильные аминокислоты. Для открытия и закрытия ворот канала требуется обратимое изменение конформации

белка, который тем самым переводит ворота в соответствующую позицию. Вероятность открытия и закрытия канала в свою очередь определяется состоянием сенсора, который в канале электровозбудимых мембран содержит несколько заряженных групп,двигающихся под влиянием приложенного мембранного электрического поля.

Эти индуцированные электрическим полем движения зарядов и вызывают необходимую для работы конформационную перестройку белка канала. Важная особенность работы Na^+ - и K^+ -каналов состоит в том, что при их открытии и закрытии нарастание и исчезновение ионного тока в каждом из них в отдельности происходит скачком и носит пороговый характер (рис. XXI.12).

Однако суммарные изменения тока в совокупности каналов, каждый из которых с определенной вероятностью скачком изменяет свое состояние, усредняются статистически и в целом имеют плавный характер (рис. XXI.12).

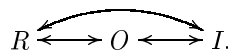
Общим свойством Na^+ -каналов является их способность быстро активироваться и открываться под действием деполяризующего импульса. После прекращения короткого деполяризующего импульса канал быстро закрывается и происходит его выход из активного состояния. Таким образом проводимость канала быстро меняется, увеличиваясь или уменьшаясь в зависимости от приложенного импульса. Наряду с этим существуют и более медленные процессы инактивации Na^+ -каналов, которые лишают каналы способности открываться при активации. Инактивация Na^+ -каналов является причиной потери их возбудимости в условиях продолжительной аноксии или ингибирования метаболических процессов.

Восстановление Na^+ -канала после инактивации может наблюдаться в экспериментах с двумя последовательными деполяризующими (-15 мВ) импульсами. После первого импульса каналы активируются и открываются, а затем закрываются и инактивируются. В течение времени перед приходом второго импульса часть каналов успевает восстановиться после инактивации. Поэтому амплитуда ответа на действие второго импульса зависит от временного интервала, прошедшего после прекращения действия первого импульса. Полное восстановление происходит по экспоненциальному закону ($\tau \sim 4-5$ мс) и в свою очередь зависит от потенциала покоя.

На K^+ -каналах многих клеток наблюдается быстрое увеличение калиевого тока I_K при возбуждении деполяризующим импульсом и открытии (активации) каналов, которое одновременно сопровождается более медленной их инактивацией.

Процесс инактивации K^+ -каналов включает быструю (500 мс) и медленную (10–20 с) фазы. В обычных условиях состояние инактивации исчезает под влиянием потенциала покоя на мембране.

Схему перехода между закрытым R , открытым O и инактивированным I состояниями канала можно представить в виде



Как видно, канал может обратимо инактивироваться I , находясь как в открытом O , так и в закрытом R состояниях. Вопрос о механизмах взаимного влияния этих состояний мы рассмотрим позднее.

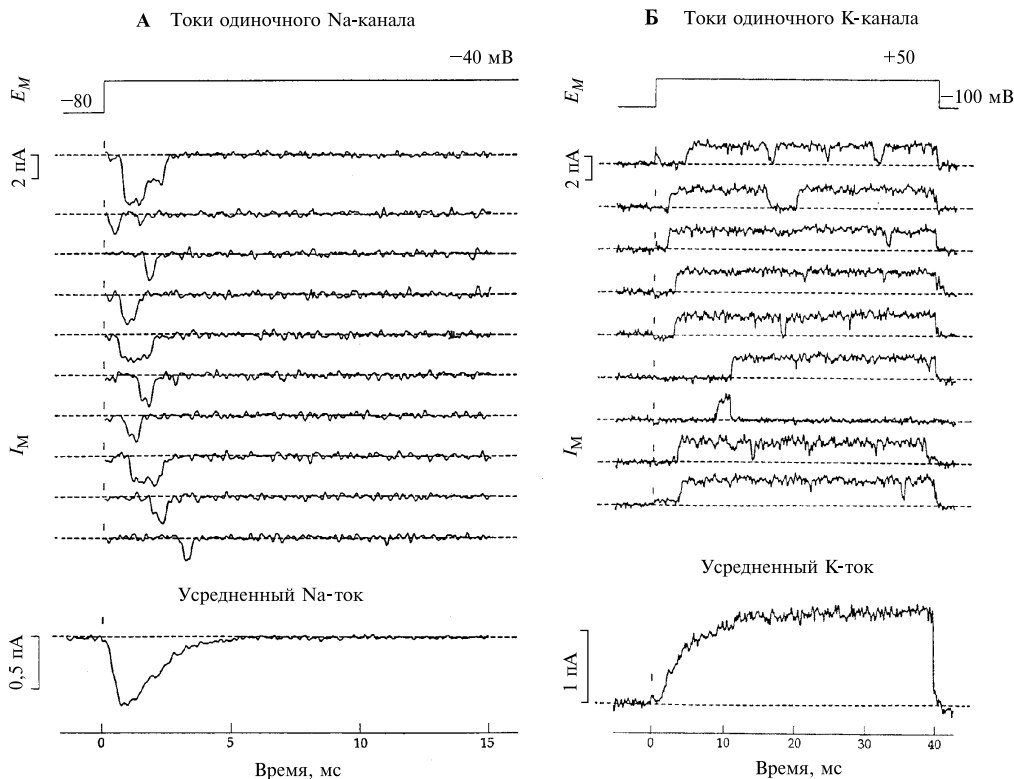


Рис. XXI.12.

Токи одиночных каналов и интегральный ионный ток (по В. Hille, 1992).

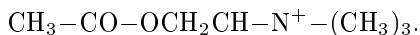
А) Воротная функция одиночных Na-каналов. Пэтч-клэмп регистрация токов одиночных Na-каналов в мышечном волокне мыши при ступенчатом сдвиге напряжения от -80 до -40 мВ. Регистрация в конфигурации «клетка прикреплена» в условиях деполяризации волокна ионами Cs. В верхней части рисунка изображены 10 последовательных записей токов при полосе пропускания фильтра 3 кГц. Верхняя запись тока отражает одновременное открывание двух каналов, остальные записи соответствуют открыванию лишь одного канала. Исследуемый мембранный фрагмент (пэтч) возможно содержит > 10 Na-каналов. Нижняя часть рисунка изображает токовую кривую, полученную в результате усреднения токов по ансамблю.

Б) Воротная функция одиночных K-каналов. Пэтч-клэмп регистрация токов одиночных K-каналов в гигантском аксоне кальмара при ступенчатых сдвигах напряжения от -100 до $+50$ мВ. Во избежание контакта с окружающими шванновскими клетками аксон был надрезан, и микропипетка прижата к цитоплазматической поверхности мембраны. В верхней части рисунка приведены 9 последовательных записей токов через каналы с проводимостью 20 пСм. Нижняя кривая изображает результат усреднения токов одиночных каналов по ансамблю (усреднение 20 записей).

§ 7. Молекулярное строение каналов

Интенсивное изучение химического строения каналов началось в биофизике в конце 1960-х годов. К этому времени стало ясно, что для выяснения механизмов активации и инактивации каналов, их селективности, блокировки, прохождения ионов через пору и других функциональных свойств необходимо знание структуры макромолекул, входящих в состав канала. В середине 70-х годов было установлено, что Na^+ -канал представляет собой трансмембранный белок, погруженный в липидный бислой. Этот же вывод был получен и в отношении другого типа каналов, изменение проводимости которых достигается не за счет изменения электрического потенциала на мембране, а в результате действия химических нейромедиаторов.

Ацетилхолиновый рецептор. Наиболее изученными являются активируемые ацетилхолином каналы нервномышечных соединений позвоночных (двигательная концевая пластинка). Пришедший к синапсу нервный импульс вызывает освобождение в синаптическую щель нейротрансмиттера ацетилхолина:



Последующая диффузия молекул ацетилхолина приводит к их связыванию в постсинаптической мембране с рецепторными молекулами. Вследствие этого происходит деполяризация постсинаптической мембраны (до 0 мВ), открытие в результате этого Na^+ -каналов и возникновение в мышечном волокне распространяющегося потенциала действия.

Обратное восстановление поляризованного состояния достигается под действием фермента ацетилхолинэстеразы, который гидролизует ацетилхолин до ацетата и холина. Ацетилхолиновый рецептор (электрического органа ската) представляет собой комплекс, состоящий из четырех типов субъединиц (α , β , γ и δ) с молекулярной массой соответственно 40, 50, 60 и 65 кДа, которые входят в комплекс в соотношении $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Две α -субъединицы несут на себе два места связывания ацетилхолина. Интактный ацетилхолиновый рецептор может быть встроен в липидную мембрану, где он проявляет все основные свойства ионного канала: ион-селективность и проводимость, чувствительность к действию ингибиторов.

Аминокислотная последовательность первых 54 остатков ацетилхолинового рецептора была определена химическим путем. Она оказалась сходной для всех четырех типов субъединиц белка, которые, очевидно, кодируются гомологичными генами. Полная структура белка была определена известными методами геной инженерии. Так, знание частичной аминокислотной последовательности позволило вначале провести клонирование и секвенирование копий ДНК, соответствующих информационной РНК (мРНК) субъединиц белка ацетилхолинового рецептора. Такая комплементарная ДНК (кДНК) получалась, как известно, на основе мРНК с помощью обратной транскриптазы. Затем транскрипты ДНК включались в ДНК плазмид для последующего введения в клетки *Escherichia coli* и получения банка кДНК, содержащего в качестве случайных отдельные участки исходной мессенджер-последовательности. Дополнительно синтезировались искусственные молекулы ДНК, которые кодировали небольшую часть уже известной аминокислотной последовательности белка-рецептора. Отбор нужных плазмид из всего исходного набора проводили путем гибридизации ДНК плазмид с этими искусственно синте-

зированными молекулами ДНК. Тем самым отбирались способные к гибридизации молекулы ДНК плазмид и определялась последовательность их оснований, которая уже включала и дополнительные, новые, кодирующие белок участки.

Повторяя эту процедуру, удалось в конце концов правильно расшифровать весь кодирующий участок и на основе триплетного кода определить первичную аминокислотную последовательность субъединиц белка ацетилхолинового рецептора.

На рис. XXI.13 приведена гипотетическая схема топографической организации отдельной субъединицы ацетилхолинового рецептора, содержащей сегменты M_1 – M_4 . Как видно, полипептидная цепь пересекает мембрану четыре раза. Сегменты M_1 , M_2 , M_3 , M_4 соответствуют участкам первичной аминокислотной последовательности, уложенным в α -спиральные структуры. Каждый из сегментов содержит 20–30 аминокислот при общем числе их 430–500 в каждой из четырех субъединиц α , β , γ , δ , входящих в состав всего рецептора.

Наибольшая функциональная роль принадлежит сегменту M_2 и его ближайшему гидрофобному окружению. В нижней части рис. XXI.13 показаны участки субъединиц α , β , γ , δ , несущие отрицательно заряженные аминокислоты (Асп[–], Глю[–], Глн[–]). Изменение (уменьшение) заряда этих участков путем замены аминокислот методами генной инженерии приводило к уменьшению потока катионов через канал. По-видимому два внутренних и один наружный отрицательно заряженных участка влияют на проводимость поры канала. Сама пора образована сегментом M_2 каждой из отдельных субъединиц. Отметим, что модификация отрицательных зарядов вблизи других сегментов M_3 , M_4 не приводит к подобным результатам по изменению проводимости канала.

Na-, K-, Ca-каналы. Методы генной инженерии позволили расшифровать структуру белков других каналов. Оказалось, что основным носителем функциональных свойств в Na- и Ca-каналах являются большие α (в Na-канале) и α_1 (в Ca-канале) субъединицы, состоящие из четырех повторов (рис. XXI.14) по 300–400 аминокислот в каждом. В свою очередь, каждый из этих повторов включает в себя 6 трансмембранных α -спиральных сегментов ($S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6$)

Особая роль среди них в обеспечении функциональных свойств канала принадлежит сегменту S_4 , который несет положительные заряды от 4 до 8 на каждом третьем остатке аргенина или лизина. Этот сегмент S_4 , возможно, играет роль сенсора в воротном механизме канала. В Na- и Ca-каналах одна большая субъединица достаточна для обеспечения работы канала. По-видимому в этих каналах пора образуется между трансмембранными сегментами S_1 – S_6 , принадлежащими четырем различным внутренним повторам одной субъединицы. В отличие от Na- и Ca-каналов, в белковой субъединице K-канала повтор встречается не 4 раза, а только один раз (рис. XXI.14) (Дрозофила *Shaker A*). Этот повтор представляет собой единственный кластер трансмембранных сегментов, аналогичных сегменту S_4 с положительными зарядами. В основе структуры K-канала типа *Shaker* лежит тетрамер, образованный четырьмя аналогичными субъединицами. Пора K-канала расположена не в α -спиральных участках, а в пептидной петле между S_5 и S_6 сегментами.

Имеется большое количество разных K-каналов, в том числе и полученных клонированием генов K-канала *Shaker*. Они отличаются друг от друга разными типами субъединиц, кодирующихся гомологичными генами (для млекопитающих около 10). Различные комбинации этих субъединиц в составе тетрамеров K-канала

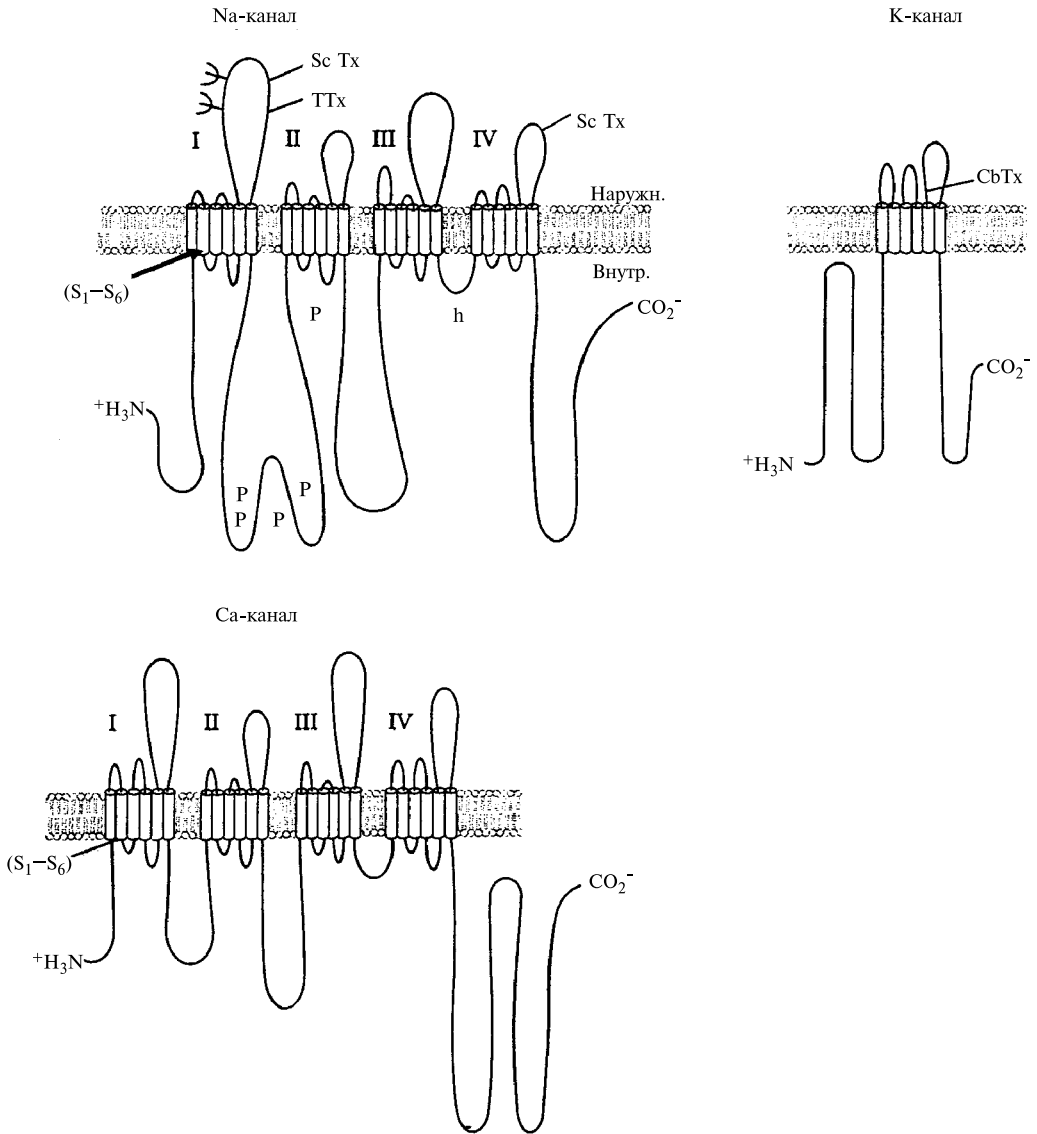


Рис. XXI.14.

Предсказание топологии мембранных белков (по В. Hille, 1992).

Предполагаемое внутримембранное расположение пептидных цепей главных субъединиц потенциалзависимых ионных каналов. Мембранные фрагменты обозначены индексами I, II, III и IV. Показаны также участки, в которых располагаются гликозидные группы (ψ), участки фосфорилирования P , а также зоны взаимодействия с токсинами скорпиона (ScTx), харибдотоксином (CbTx), сенсор напряжения (+) и функциональный блок (n), ответственный за инактивацию проводимости.

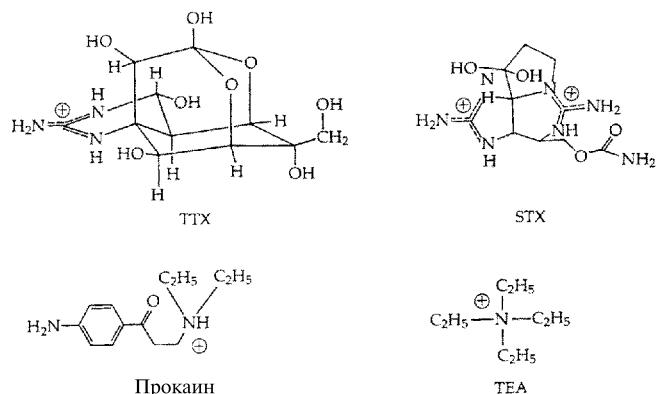


Рис. XXI.15.

Химическая структура блокаторов ионных каналов (по В. Hille, 1992).

Тетродотоксин (ТТХ) и сакситоксин (STX) относятся к природным токсинам, специфически блокирующим Na-каналы. Ион тетраэтиламмония (ТЕА) является простым четвертичным производным аммония, блокирующим К-каналы. Действие всех перечисленных агентов является обратимым.

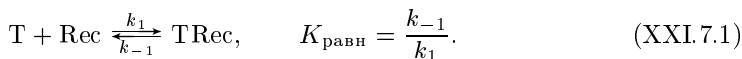
обеспечивают их структурное разнообразие.

Механизмы блокирования каналов. Блокировка каналов различными фармакологическими агентами применяется для изучения структуры канала и механизма его функционирования. Существуют два типа блокировки: 1) связывание непосредственно в поре канала, предшествующее прохождению через нее иона; 2) аллостерическое связывание агента макромолекулярными структурами в канале, которое стабилизирует конформацию поры в закрытом состоянии и препятствует тем самым открыванию канала. Оба вида блокирования могут одновременно иметь место при действии химических веществ.

Обратим внимание на очевидную аналогию с конкурентным (за место в активном центре) и аллостерическим типами ингибирования ферментативного процесса (гл. XIV).

Наибольшую роль в исследовании селективного ингибирования определенных видов ионной проводимости сыграли вещества: тетродотоксин ТТХ, сакситоксин STX, тетраэтиламмоний ТЕА (рис. XXI.15)

ТТХ содержится в органах рыб семейства *Tetraodontidae*. Он воздействует на наружную поверхность мембраны, подавляя возникновение потенциалов действия в нервах и мышцах (см. гл. XXIII, § 3) и блокируя селективно натриевый ток. Аналогичное действие оказывает и STX, содержащийся в жгутиковых. Ион ТЕА селективно подавляет калиевый ток, удлиняя фазу падения потенциала действия (см. XXIII, § 3). Блокирование канала инициируется связыванием агента с рецептором, который представляет собой определенный элемент молекулярной структуры канала. Считается, что молекула блокатора Т связывается обратимо с рецептором в реакции

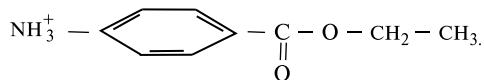


К-каналы блокируются миллимолярными концентрациями ТЕА, введенными во внутриклеточное пространство. Было показано, что рецептор находится в поре, но становится доступным для молекул со стороны аксоплазмы только тогда, когда канал (ворота) открывается под действием деполяризующего импульса. При этом

ингибирование выходящего К-тока (i_K) выражено гораздо сильнее, чем входящего. В закрытом состоянии канала ионы аммония не могут достичь рецептора со стороны аксоплазмы. Восстановление проводимости происходит в результате диссоциации комплекса (TRec) под действием входящих снаружи ионов K^+ , которые вытесняют ингибитор из поры и выталкивают его в аксоплазму. Если канал, где ингибитор предварительно связался с рецептором в поре, закроется, то выталкивания ингибитора в аксоплазму не произойдет. В этом случае восстановление проводимости задерживается (медленная фаза) до тех пор, пока ворота канала не откроются вновь.

Молекулы веществ ТТХ и STX содержат гуанидиновые части, ионы гуанидина проникают в клетку через Na-каналы. Возможно, что рецептор находится в селективном фильтре и содержит одну или две отрицательно заряженных групп (COO^-), заряды которых изменяются при разных рН.

Действие ТТХ на Na-каналы имеет общие черты с влиянием ТЕА на K-каналы, поскольку в обоих случаях эффект зависит от взаимодействия с аминокислотными остатками рецептора вблизи устья канала. Местные анестетики (третичные амины) используются в клинике и их действие основано на блокировке Na-каналов. Они оказывают это действие при протонировании аминогруппы и переходе молекулы в заряженное состояние



Для большинства местных анестетиков pK_a находится в пределах 7–9. Блокировка осуществляется только заряженными молекулами, проникающими во внутреннее устье открытого Na-канала. Рецептор находится между воротами и селективным фильтром канала. В нейтральной форме местные анестетики могут проникать внутрь нервного волокна, растворяясь в липидном матриксе мембраны с последующим протонированием внутри волокна. В этом случае они могут взаимодействовать и с закрытыми каналами. На рис. XXI.16 изображена схема действия анестетиков, которые вытесняются из комплекса с рецептором ионами Na^+ и H^+ , проникающими в канал снаружи. Образование комплекса в свою очередь влияет на эффективность воротного механизма, оставляя ворота открытыми и сильно замедляя процесс инактивации канала. Так, блокатор *N*-метилстрихнин, введенный в открытые каналы, блокирует их и фиксирует ворота в открытом положении, так что они не могут закрыться до тех пор, пока блокатор не покинет канал. Таким образом, доступ блокатора к рецептору возможен лишь при открытых воротах. При закрытии ворот после образования TRec-комплекса анестетик оказывается запертым в канале. Влияние анестетиков ТТХ, STX на воротный механизм не прямое, а обусловлено их связью с другими молекулами, способствующими закрытию ворот (аллостерический механизм).

Ингибирование воротного механизма. Процесс инактивации легко ингибируется при действии химических агентов, проникающих в каналы со стороны аксоплазмы. Замедление инактивации может привести к тому, что продолжительность потенциала действия (открытый Na-канал) продлится до нескольких минут. Эффект наблюдается при введении проназы (смесь протеолитических эндопептидаз),

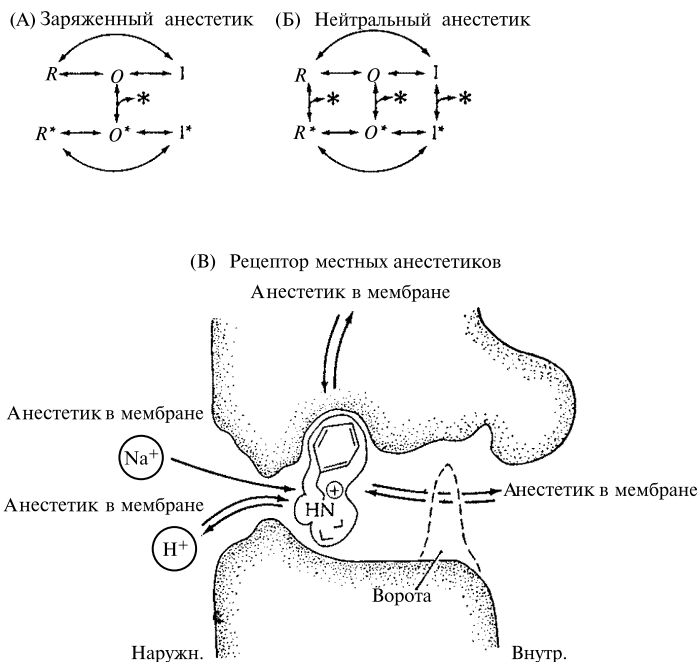


Рис. XXI.16.

Гипотетическая схема блокирования ионного канала местными анестетиками (по В. Hille, 1992).

(А) Состояния Na-канала и переходы, вызванные взаимодействием с заряженными молекулами анестетика: *R* — состояние покоя (resting state), *O* — открытое состояние (open state), *I* — инактивированное состояние (inactivated state). Заряженные (гидрофильные) молекулы анестетика способны проникать через канал лишь при открытых воротах.

(Б) Молекулы незаряженного анестетика могут связываться и освобождаться даже при закрытых воротах.

(В) Два пути по которым анестетики могут проникнуть к рецептору в просвете канала. Гидрофильный путь блокируется закрыванием ворот. Внеклеточные Na^+ и H^+ могут взаимодействовать со связанными молекулами анестетика через область селективного фильтра.

когда Na-каналы остаются открытыми при действии продолжительного деполяризующего импульса, теряя способность к инактивации и закрытию.

По-видимому местом действия ингибиторов инактивации воротного механизма Na-каналов являются пептидные петли между повторами III и IV (рис. XXI.14) с доступными аминокислотными остатками — аргинином, тирозином, триптофаном, гистидином. Рецептор для их связывания отличен от такового для TTX или STX. Местные анестетики конкурируют с ними за место связывания.

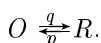
Другой ингибитор α -токсин скорпиона (пептид) обратимо связывается с рецептором в наружной части канала, удлиняя продолжительность потенциала действия. Его связывание возможно в открытом и закрытом, но не в инактивированном, состояниях. Отсюда следует, что в нормальных условиях инактивация Na-каналов не только вызывает закрытие ворот, но сопровождается изменениями наружной части структуры канала, где расположен рецептор.

Таким образом, существуют различные вещества, модифицирующие воротный механизм закрытия — открытия каналов. Так, ферменты (проназа) необратимо действуют со стороны цитоплазмы и необратимо повреждают структуры, ответственные за инактивацию канала. Другие ингибиторы (пептидные токсины) действуют снаружи, замедляя инактивацию каналов. Растворимые в липидах токсины угнетают активацию (открытие) каналов, замедляют инактивацию и уменьшают ионную селективность канала. Наконец, изменения pH, внутриклеточной концентрации двухвалентных ионов, ионной силы влияют на работу воротного механизма. Таким образом, в процесс инактивации вовлекаются структурные элементы, расположенные снаружи канала и в области ворот. Активация же зависит от структур, глубоко погруженных в липидную часть мембраны и недоступных внешним химическим агентам. На рис. XXI.17 показаны места действия различных ингибиторов на Na-каналы.

§ 8. Флуктуации проводимости мембран

Электрические флуктуации в мембранах обусловлены изменением числа открытых каналов вследствие случайных процессов их формирования и распада. Анализ флуктуаций проводимости позволяет оценить две основные характеристики канала: среднее время жизни канала в открытом состоянии и проводимость одиночного канала. \square

Суммарная проводимость мембрана определяется статистическим наложением проводимости отдельных каналов, каждый из которых может находиться с определенной вероятностью в закрытом или открытом состояниях. В 70-х годах были развиты методы регистрации и статистического анализа флуктуаций проводимости мембран, позволяющие оценить вклад в этот процесс и получить характеристики проводимости одиночных каналов. Переход канала между открытым O и закрытым R состояниями представляет собой в кинетическом отношении реакцию первого порядка с вероятностями закрытия q и открытия p в единицу времени. Среднее статистическое время пребывания одиночного канала в открытом состоянии τ_0 обратно пропорционально вероятности его перехода в закрытое состояние q , $\tau_0 = 1/q$



Достижение равновесного распределения между открытыми n_O и закрытыми n_R каналами в макроскопической системе с большим числом каналов происходит согласно уравнению кинетики

$$\begin{aligned} \dot{n}_O &= pn_R - qn_O, & n_O + n_R &= N \\ \dot{n}_R &= -pn_R + qn_O, \end{aligned}$$

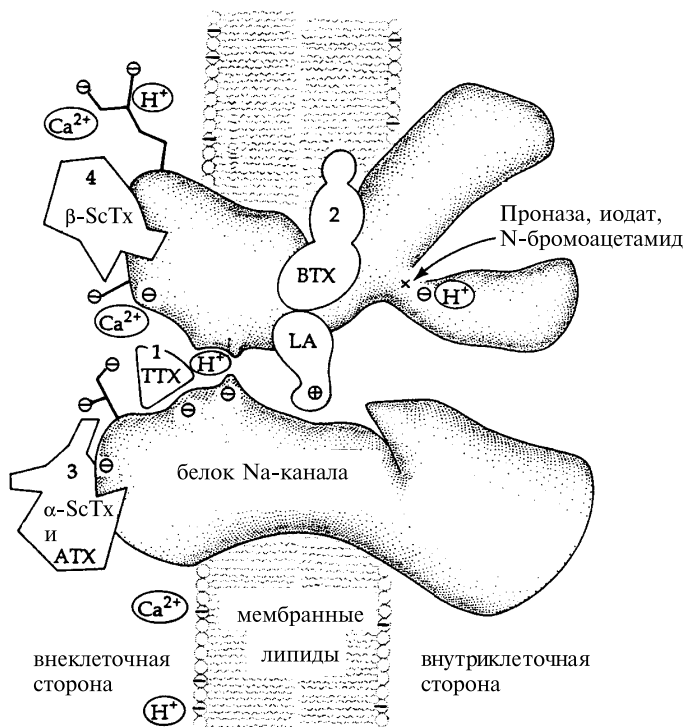


Рис. XXI.17.

Рецепторы токсинов в натриевом канале (по В. Hille, 1992).

Гипотетическая схема организации Na-канала:

1 — участок связывания тетродотоксина и сакситоксина; 2 — участок связывания липофильных модификаторов воротной функции (батрахотоксин BTX); 3 — место связывания пептидных токсинов скорпиона ScX и актинии ATX (модификаторы инактивации); 4 — участок связывания β -токсинов скорпиона (β -ScTx) (модификаторы активации). Кроме того показаны внутренние участки мембраны, подвергающиеся воздействию химических модификаторов инактивации (проназа, иодат), участок связывания местных анестетиков (LA) внутри гидрофильной поры и отрицательные поверхностные заряды, притягивающие двухвалентные катионы и ионы Na в устье канала.

по экспоненциальному закону

$$n_O(t) = \bar{n}_O - (\bar{n}_O - n_O^0) \exp[-(p + q)t],$$

где \bar{n}_O — равновесное, n_O^0 — начальное значения величины n_O ; среднее время достижения равновесных значений \bar{n}_O и \bar{n}_R в макроскопической системе составляет

$$\tau = \frac{1}{p + q}.$$

При обычных температурах происходят флуктуаций числа открытых и закрытых каналов около их равновесных значений, соответствующие флуктуациям проводимости мембраны. Можно показать (флуктуационно-диссипативная теорема Кубо), что небольшие спонтанные флуктуации будут затухать с характерным

временем $\tau = 1/(p + q)$. Таким образом, информация о кинетике микроскопических переходов между состояниями одиночного канала может быть получена при наблюдении флуктуаций значений равновесных параметров макроскопической системы.

Соответствующий математический анализ флуктуаций проводимости мембраны проводится с целью определения ряда параметров, характеризующих свойства одиночного канала: время открытого состояния ($\tau_0 = 1/p$) и скорости переходов между разными состояниями; проводимость одиночного канала. Напомним, что проводимость мембраны (XIX.25) характеризует зависимость потока ионов (ток) от потенциала на мембране $g = dI/d\phi$. В случае линейных вольтамперных зависимостей тока от потенциала на мембране проводимость равна $\operatorname{tg} \alpha$, где α — угол наклона прямой $I(\phi)$. При фиксированных потенциалах флуктуации тока и его среднее значение соответствуют флуктуациям и среднему значению проводимости на мембране.

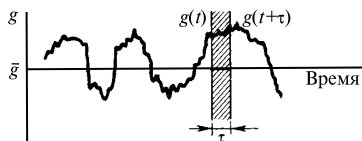


Рис. XXI.18.

Изменение проводимости мембраны как функция времени

Если значение проводимости мембраны в момент t равно $g(t)$, то через небольшой промежуток времени значение проводимости $g(t + \tau)$ будет иметь близкую величину; иначе

говоря, величина в момент времени $(t + \tau)$ будет «коррелировать» с величиной в момент времени t . Однако через достаточно большой промежуток времени уже невозможно предсказать величину $g(t + \tau)$, основываясь на ее первоначальной величине $g(t)$, т. е. $g(t + \tau)$ и $g(t)$ становятся полностью независимыми

Причина флуктуаций состоит в том, что макроскопический ток через мембрану есть результат наложения микроскопических токов, идущих через одиночные каналы, которые ведут себя стохастически и открываются и закрываются с определенной вероятностью.

Если каналы в мембране открываются и закрываются независимо, то изменения проводимости мембраны представляют собой стохастический процесс. Значения проводимости g колеблются около некоторого среднего значения \bar{g} с дисперсией σ^2 или среднеквадратичным отклонением σ :

$$\sigma^2 = \langle (g - \bar{g})^2 \rangle \quad (\text{XXI.8.1})$$

(рис. XXI.18). Анализ этого процесса проводят с помощью функций корреляции [см. (XI.1.9)–(XI.1.15)].

Величина временного интервала, через который $g(t + \tau)$ перестает коррелировать с $g(t)$, является мерой скорости, характеризующей затухание корреляции. Временная зависимости случайных флуктуаций может быть охарактеризована так называемой автокорреляционной функцией, которая определяется как среднее от произведения флуктуирующей величины $g(t)$ в момент времени t на ее значение через промежуток времени τ [см. (XI.1.9)]:

$$C(\tau) = \langle g(t)g(t + \tau) \rangle. \quad (\text{XXI.8.2})$$

Для простоты обычно полагают, что значение проводимости флуктуирует вокруг нуля (т. е. проведено вычитание среднего значения). Значение автокорреляционной функции при $\tau = 0$, по определению, равно дисперсии флуктуирующего сигнала σ^2 [см. (XI.1.11)]. Оно всегда больше нуля, поскольку для $\tau = 0$ все усредняемые произведения являются квадратами и, следовательно, положительны. Однако при увеличении τ часть усредняемых произведений будет положительна, а часть — отрицательна. Поэтому при достаточной величине τ суммирование таких произведений приведет к их компенсации. Следовательно, функция $C(\tau)$ уменьшается и приближается к нулю, если τ становится очень большим по сравнению со средним временем флуктуаций.

Шумы процессов открывания-закрывания каналов. Предположим, что в мембране существует большое число статистически независимых каналов, которые открываются и закрываются по принципу «все или ничего» и остаются открытыми в течение промежутков времени, малых по сравнению с временами их жизни в закрытом состоянии. Если времена их открытого состояния распределены экспоненциально со средним временем τ_0 ($N = N_0 \exp(-t/\tau_0)$), то автокорреляционная функция оказывается простой экспоненциальной функцией [см. (XI.1.13)] с постоянной времени τ_0 и начальной амплитудой σ^2 (рис. XXI.19) среднеквадратичного смещения проводимости

$$C(\tau) = \sigma^2 \exp(-\tau/\tau_0). \quad (\text{XXI.8.3})$$

Фурье-образ, или энергетический спектр, связан с автокорреляционной функцией соотношением (XI.1.15):

$$P(\omega) = (2/\pi) \int_0^{\infty} C(\tau) \cos(\omega\tau) d\tau. \quad (\text{XXI.8.4})$$

Энергетический спектр характеризует распределение энергии флуктуаций как функцию частоты и может быть измерен в эксперименте с помощью частотных анализаторов (рис. XXI.20). Если автокорреляционная функция имеет вид, даваемый уравнением

$$C(\tau) = C_0 \exp(-\tau/\tau_0), \quad (\text{XXI.8.5})$$

то можно вычислить энергетический спектр:

$$P(\omega) = \frac{2}{\pi} C_0 \int_0^{\infty} \exp(-\tau/\tau_0) \cos(\omega\tau) d\tau; \quad P(\omega) = \frac{2}{\pi} C_0 \frac{\tau_0}{1 + \omega^2 \tau_0^2}. \quad (\text{XXI.8.6})$$

В экспериментах на БЛМ результаты измерений интенсивности шума на данной частоте f ($f = 2\pi\omega$) выражают обычно в форме безразмерных единиц $\varepsilon(f)$:

$$\varepsilon(f) = \frac{S_{V_n}(f) - S_{V_e}(f)}{S_{V_e}(f)}, \quad (\text{XXI.8.7})$$

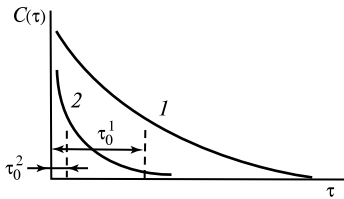


Рис. XXI.19.

Автокорреляционные функции, соответствующие медленным (1) и быстрым (2) флуктуациям:

τ_0 — характерное время экспоненты, совпадающее со средним временем жизни канала в открытом состоянии

где $S_{V_n}(f)$ — интенсивность флуктуаций напряжения V на частоте f при пропускании через мембрану постоянного электрического тока (неравновесное состояние — n), а $S_{V_e}(f)$ — интенсивность флуктуаций напряжения в отсутствие тока (равновесное состояние — e). Величина $\varepsilon(f)$ не зависит ни от степени модификации мембраны антибиотиком, ни от площади мембраны, и поэтому удобна для сравнения результатов, полученных на разных мембранах с разным электрическим сопротивлением.

Тепловой шум. Для систем, находящихся в термодинамическом равновесии, флуктуации напряжения связаны с импедансом системы теоремой Найквиста (1928):

$$S_{V_e}(f) = 4k_B T \operatorname{Re} Z(f). \quad (\text{XXI.8.8})$$

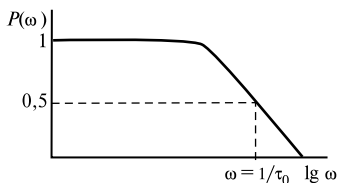
В этом выражении $Z(f)$ — импеданс, т. е. комплексное сопротивление системы для переменного тока, включающее действительную и мнимую части:

$$Z = R_s + iX_s = \operatorname{Re} Z + i \operatorname{Im} Z,$$

где $R_s = \operatorname{Re} Z$ — активное сопротивление (действительная часть импеданса), а $X_s = \operatorname{Im} Z$ — реактивное сопротивление (мнимая часть импеданса).

Рис. XXI.20.

Зависимость спектральной плотности флуктуации от частоты беспорядочного процесса



Энергетический спектр (распределение спектральной плотности флуктуаций) $P(\omega)$ имеет вид кривой Лоренца [ср. (XIII.3.16)]. Спектральная плотность флуктуаций представлена как функция логарифма частоты. Спектр флуктуаций — прямая линия на частотах от нуля до частоты порядка $1/\tau_0$, линия резко идет вниз в области частот $\sim 1/\tau_0$. Видно, что беспорядочный процесс является эффективным широкополосным источником частот вплоть до частоты $1/\tau_0$

Теорема Найквиста описывает спектральную плотность теплового шума в проводниках, обусловленного тепловым движением заряженных частиц. Для мембран, эквивалентная схема которых обычно изображается в виде параллельного соединения сопротивления R и емкости C , зависимость реальной части импеданса от частоты описывается соотношением

$$\operatorname{Re} Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} = \frac{R}{1 + 4\pi^2 (fCR)^2}. \quad (\text{XXI.8.9})$$

Соотношение (XXI.8.9) выводится из условия, что суммарная проводимость для параллельной цепи $1/Z$ равна сумме проводимости активного сопротивления $1/R$ и проводимости конденсатора:

$$1/Z = 1/R + i \frac{1}{1/\omega C} = 1/R + i\omega C.$$

Отсюда следует, что

$$Z = \frac{R}{1 + i\omega CR} = \frac{R(1 - i\omega CR)}{1 + \omega^2 C^2 R^2} = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - i \frac{\omega CR^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}.$$

В полученном выражении импеданс представлен в виде суммы его действительной (активная) и мнимой (реактивная) составляющих. Учитывая (XXI.8.9), формулу (XXI.8.8) можно записать в виде

$$S_{V_e}(f) = \frac{4k_B T R}{1 + 4\pi^2(RCf)^2}. \quad (\text{XXI.8.10})$$

В режиме фиксации потенциала, когда измеряются флуктуации тока I , соответствующая спектральная плотность будет иметь вид

$$S_I(f) = 4k_B T / R. \quad (\text{XXI.8.11})$$

Таким образом, флуктуации тока, обусловленные тепловым шумом, не зависят от частоты. По этой причине тепловой шум часто называют «белым» шумом. \square

Тепловые флуктуации напряжения на БЛМ, находящейся в симметричных растворах электролита, при отсутствии тока достаточно хорошо описываются соотношениями (XXI.8.8) и (XXI.8.10).

Если ионные каналы проводимостью h_0 имеют только два состояния, соответствующие открытому и закрытому каналу, со средними временами состояний τ_0 и τ_3 соответственно, то для линейного участка вольтамперной характеристики мембраны справедливо соотношение

$$\varepsilon(f) = \frac{\tau^2 h_0 \bar{V}^2}{k_B T \tau_0} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2}, \quad (\text{XXI.8.12})$$

где \bar{V} — среднее падение напряжения на БЛМ, а $\tau = \tau_0 \tau_3 (\tau_0 + \tau_3)^{-1}$.

При условии, что среднее время закрытого состояния канала намного больше характерного времени открытого состояния $\tau_3 \gg \tau_0$, формула (XX.8.12) упрощается:

$$\varepsilon(f) = \frac{\tau_0 h_0 \bar{V}^2}{k_B T} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau_0)^2}, \quad (\text{XXI.8.13})$$

Именно эту формулу используют обычно для расчета параметров каналов, спектры шума которых можно описать лоренцевской кривой.

Запись флуктуаций проводимости мембраны концевой пластинки мышцы лягушки приведена на рис. XXI.21. В покоящемся состоянии при фиксированном напряжении -100 мВ флуктуации невелики. Однако при возбуждении мембраны путем введения в нее ацетилхолина ток и флуктуации резко возрастают. Частотно-энергетический спектр этих флуктуаций (рис. XXI.20) приведен на рис. XXI.22. Форма лоренцевой кривой спектральной плотности флуктуаций $S(f)$ описывается как

$$S(f) = \frac{S(0)}{1 + (f/f_c)^2} = \frac{S(0)}{1 + (2\pi f \tau_0)^2},$$

где f — частота флуктуаций, $S(0)$ и f_c — константы, соответствующие спектральной плотности при нулевой частоте, f_c — значение частоты, при которой амплитуда уменьшается в 2 раза, $\tau_0 = 1/2\pi f_c$ — время релаксации флуктуаций. Из кривых рис. XXI.22 можно найти значение τ_0 , которое, как видно, увеличивается при

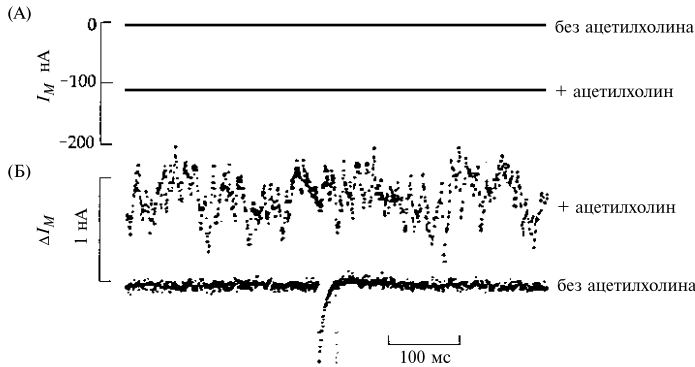


Рис. XXI.21.
Флуктуации тока в си-
наптической мембране
(по В. Hille, 1992)

Токи, измеряемые на мышечном волокне лягушки в условиях фиксации напряжения. Верхние кривые — измерения тока при малом коэффициенте усиления; нижние кривые — измерения при высоком коэффициенте усиления. В покоем нервномышечном окончании ток, регистрируемый при слабом усилении, равен нулю. Запись, сделанная при высоком коэффициенте усиления, отображает низкий уровень шума и одиночный импульс входящего тока, вызванный спонтанным выделением нейротрансмиттера из одиночного пресинаптического пузырька. При аппликации низкой концентрации ацетилхолина на малом усилении регистрируется большой постоянный входящий ток. Записи, сделанные при высоком усилении выявляют флуктуации, вызванные стохастическим открытием большого числа каналов. Температура 8°C .

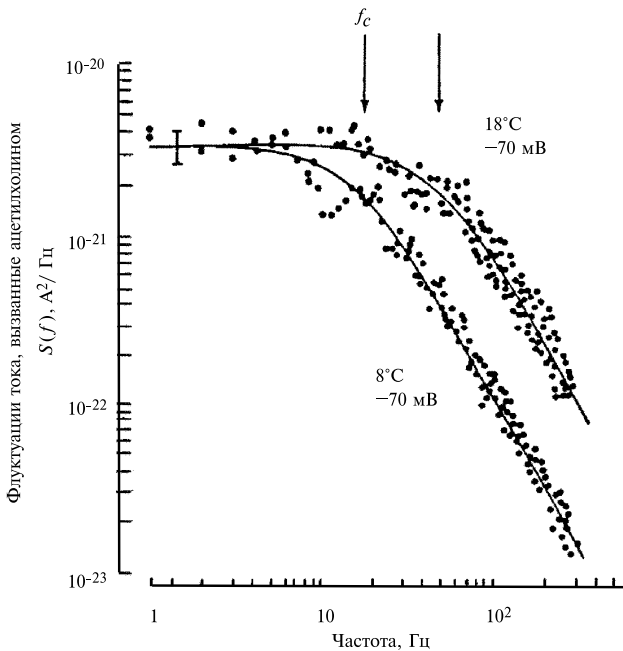


Рис. XXI.22.
Спектр флуктуаций то-
ка, вызванных действием
ацетилхолина на мышеч-
ное волокно лягушки (по
С. R. Anderson, С. F. Ste-
vens, 1973)

Спектральная плотность флуктуаций $S(f)$ представлена как функция частоты в двойном логарифмическом масштабе. Стрелками отмечена частота среза лоренцовых кривых (сплошные линии). Деполяризация волокна и повышение температуры приводят к повышению частоты среза.

охлаждении объекта и гиперполяризации. При -50 мВ и 20° С оно составляет $\tau_0 = \frac{1}{p+q} \sim 1$ мкс. Поскольку в опытах использовались низкие концентрации ацетилхолина, когда вероятность открытия канала p очень мала ($p \ll q$), то в этих условиях время τ_0 соответствует времени нахождения канала в открытом состоянии

$$\tau_0 = \frac{1}{p+q} \simeq \frac{1}{p}.$$

Время жизни разных каналов может варьировать в широких пределах от миллисекунд до секунд.

Из этих опытов также следует, что доля открытых каналов зависит от потенциала на мембране и уменьшается при деполяризации.

Проводимость одиночного канала. Если в равновесных условиях количество открытых каналов флуктуирует во времени, то это вызывает соответствующие флуктуации макроскопической проводимости мембраны. В экспериментах измеряются импульсы тока через мембрану, которые характеризуют среднее квадратичное отклонение σ^2 от среднего значения \bar{I} :

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (I_k - \bar{I})^2 = \frac{\sum I_k^2}{n} - \frac{2\bar{I} \sum I_k}{n} + \bar{I}^2 = \frac{1}{n} \sum_k I_k^2 - \bar{I}^2, \quad (\text{XXI.8.14})$$

где $\sum I_k / n = \bar{I}$.

Рассмотрим одиночный канал, который открывается с вероятностью p , и пропускает ток i . Средний ток, проходящий через такой канал, равен ip , а величина квадрата тока i^2p . Из (XXI.8.14) следует, что

$$\sigma_i^2 = i^2p - i^2p^2 = i^2p(1-p) = i^2pq, \quad (\text{XXI.8.15})$$

где q — вероятность того, что канал закрыт. Для N независимых каналов макроскопическая флуктуация тока I равна

$$\sigma_I^2 = N(i^2p - i^2p^2) = Ni^2pq, \quad (\text{XXI.8.16})$$

а средний ток на мембране

$$I = Nip. \quad (\text{XXI.8.17})$$

Из последних двух выражений следует, что $\sigma_I^2 = Iiq$. Отсюда ток i через одиночный канал можно найти как

$$i = \frac{\sigma_I^2}{Iq} = \frac{\sigma_I^2}{I(1-p)}, \quad (\text{XXI.8.18})$$

т. е. i зависит от флуктуаций σ_I^2 тока I на мембране. Если $p \ll q$, что часто соответствует реальным условиям, то

$$i = \frac{\sigma_I^2}{I}.$$

Таким образом можно найти величину тока i , проходящего через одиночный канал, измеряя среднее значение и флуктуации тока I через мембрану.

Проводимость мембраны g (XIX.2.5) характеризует зависимость потока ионов (тока) от потенциала на мембране

$$g = dI/d\varphi.$$

Аналогичная зависимость справедлива и для проводимости одиночного канала h_0 :

$$h_0 = di/d\varphi.$$

Отсюда следует, что проводимость одиночного канала можно найти по наклону прямой вольтамперной зависимости $i(\varphi)$. На рис. XXI.23 приведен пример такой зависимости.

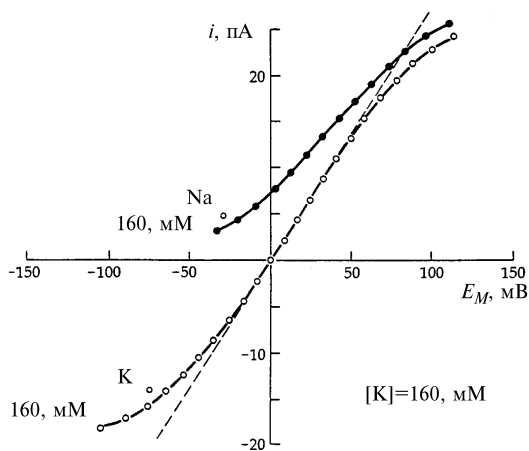


Рис. XXI.23.

Измерение проводимости одиночного канала (по Y. Yellen, 1984).

Вольтамперная характеристика одиночного Ca-зависимого K-канала в хромаффинных клетках крупного рогатого скота. Изолированный фрагмент мембраны в конфигурации «outside-out» помещали в 160 мМ KCl или NaCl, а микропипетка содержала 160 мМ KCl. В симметричных растворах KCl наклон пунктирной прямой соответствует проводимости 265 пСм.

Метод локальной фиксации потенциала (гл. XXI, § 6) позволяет осуществлять непосредственную запись тока через одиночные каналы (рис. XXI.24), что дает прямую информацию о его флуктуациях около среднего значения. Проводимость h_0 отдельных Na-каналов варьирует от 4 до 24 пСм и слегка возрастает с температурой ($Q_{10} \approx 1,0-2,5$). Плотность Na-каналов в мембране достигает величин 500–2000 на один $\mu\text{м}^2$.

Сходные значения h_0 характерны и для K-каналов, среди которых исключение составляют большие K-каналы млекопитающих ($h_0 \approx 100-300$ пСм).

§ 9. Кальциевая проводимость электровозбудимых мембран

Исследования на различных мышечных волокнах показали участие ионов Ca в генерации потенциала действия. Так, на мышечных волокнах ракообразных при помещении их в безнатриевые растворы и блокировании K^+ -проводимости ТЭА наблюдались длительные потенциалы действия, зависящие от Ca^{2+} в среде.

В гладкомышечных клетках млекопитающих потенциалы действия и соответствующие ионные токи сильно зависят от наружной концентрации Ca^{2+} и подавляются ионами Mn, Co и La, которые прочно связываются с рецептором Ca^{2+} -канала.

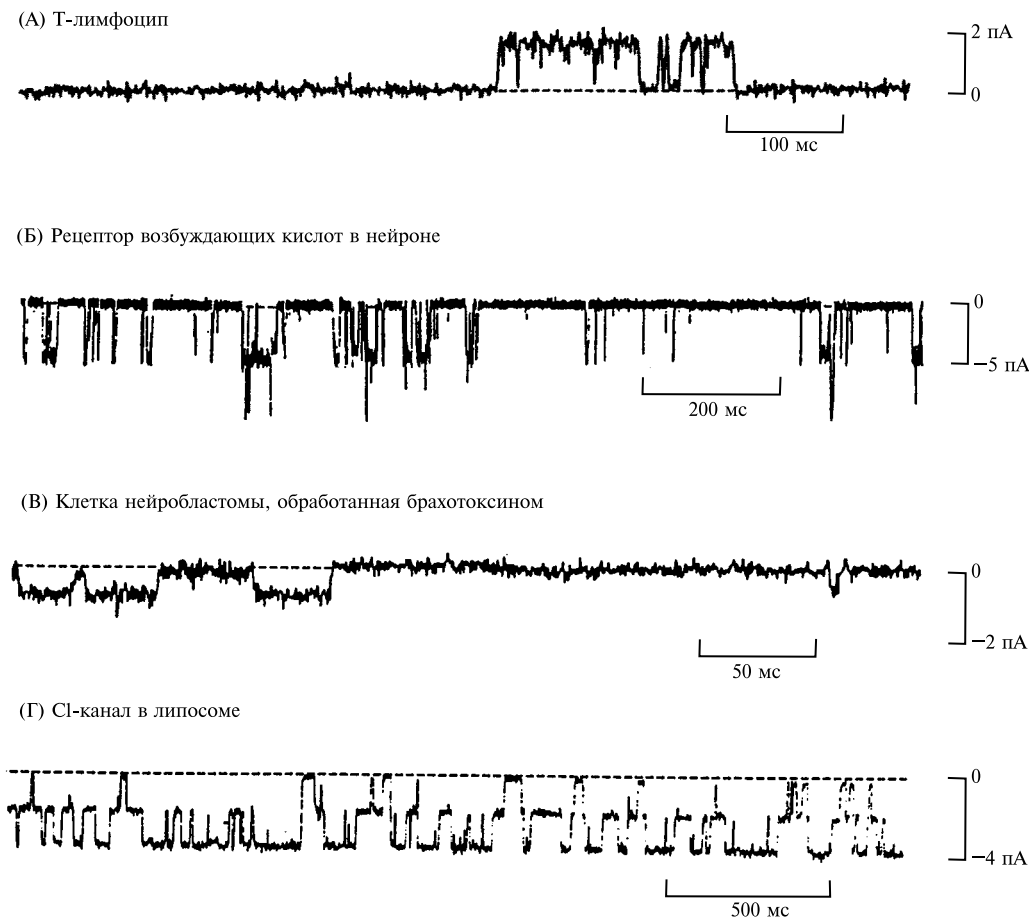


Рис. XXI.24.

Регистрация токов одиночных каналов методом «пэтч-кламп» (по В. Hille, 1992). Записи тока отражают открывание и закрывание одиночных каналов.

(А) Токи К-каналов в Т-лимфоцитах человека. При потенциале $+40$ мВ ток направлен наружу (выходящий ток).

(Б) Ток каналов рецептора возбуждающих аминокислот в нейронах мозжечка крысы. При потенциале фиксации -80 мВ ток имеет входящее направление.

(В) Токи Na-канала в клетках нейробластомы. Потенциал фиксации -80 мВ.

(Г) Переключения Cl-канала между тремя состояниями с проводимостями 0, 14 и 28 пСм. Канал, выделенный из электрического органа угря *Torpedo*, был реконструирован в липидную везикулу. Полагают, что этот канал содержит две параллельные поры.

Потенциалы действия гладкомышечных клеток не подавляются ТТХ и сохраняются при полном удалении из среды Na^+ .

С использованием белка экворина, светящегося в присутствии следовых количеств Ca^{2+} , удалось показать, что поступление Ca^{2+} в аксон при возбуждении происходит в две фазы. Первая фаза совпадает по времени с входящим Na^+ -током и блокируется ТТХ. Вторая фаза, длительностью несколько секунд, нечувствительна к ТТХ и ТЭА, но подавляется при введении в среду Mn , а также, верапамила и ингибитора Ca^{2+} -канала — *D-600*. Очевидно, быстрый Ca^{2+} -ток обусловлен переносом Ca^{2+} по Na^+ -каналам, а медленный — активацией небольшого числа специфических Ca^{2+} -каналов. Ca^{2+} -каналы обнаружены также в пресинаптических мембранах отростков нейронов.

Механизмы электрической возбудимости изолированных нейронов моллюсков имеют существенные особенности в сравнении с механизмом потенциала действия в мембране аксона. Развитие методов внутриклеточного диализа изолированных нейронов позволило охарактеризовать систему ионных каналов сомы нервной клетки (П. Т. Костюк, О. А. Крыштал). В нейронах, диализируемых трисфосфатом, выходящие токи подавлены и наблюдается только входящий ток, включающий два кинетических компонента. Быстрый входящий ток обусловлен активацией Na^+ -каналов, а медленный входящий ток — активацией Ca^{2+} -каналов. Входящий Ca^{2+} -ток нечувствителен к действию ТТХ и ТЭА, но подавляется ионами Cd , Mn , Co , Ni , La , а также верапамилом и *D-600*. Кроме того, входящий Ca^{2+} -ток подавляется при внутриклеточном диализе нейрона раствором, содержащим анионы *F* в концентрации около 20 мМ.

Выходящие токи в мембране нейронов моллюсков также включают два компонента. Быстрый выходящий ток переносится K^+ ; этот ток подавляется при внутриклеточном введении ТЭА, а также при добавлении в среду 4-аминопиридина в концентрации около нескольких миллимоль. Переносчиком задержанного выходящего тока, видимо, также являются ионы K^+ , транспортируемые по другой системе ионных каналов.

В нейронах позвоночных, как и в нейронах моллюсков, существуют входящий Na^+ -ток и медленный входящий Ca^{2+} -ток, а также быстрый и задержанный выходящие K^+ -токи.

С работой Ca^{2+} -зависимых ион-транспортных систем тесно связана электрическая возбудимость эмбриональных клеток. Так, потенциалы действия яйцеклеток морского червя *Chaetopterus* до начала деления являются Ca^{2+} -зависимыми, а на стадии реснитчатого эмбриона становятся Na^+ -зависимыми. В опытах с фиксацией мембранного потенциала на ооцитах оболочников, морских ежей и мышей показано, что во всех случаях имеются быстрый входящий ток Na^+ и медленный входящий ток Ca^{2+} , причем Ca^{2+} -ток блокируется при внутриклеточном введении F^- .

⚠ Роль Ca^{2+} в электрической возбудимости клеток не исчерпывается переносом тока по Na^+ - и Ca^{2+} -каналам. Сорбируясь на мембране в области входного участка канала, ионы Ca могут затруднять доступ в канал другим ионам за счет изменения поверхностного заряда.

Кальций регулирует активность ряда ферментов, обеспечивающих поддержание функционально активного состояния канала. Так как внутриклеточная концен-

трация Ca^{2+} очень низка (10^{-8} М), она может измениться даже за счет небольших потоков, связанных с генерацией потенциала действия.

Механизм регуляторного действия Ca^{2+} на внутриклеточном уровне в настоящее время активно изучается. Взаимодействуя с кальмодулином, Ca^{2+} может действовать на систему циклических нуклеотидов, активируя фосфодиэстеразу и понижая концентрацию цАМФ. Тем самым Ca^{2+} влияет на цАМФ-зависимое фосфорилирование канальных белков и функциональное состояние канала. Существуют данные, что Ca^{2+} -зависимая активация аденилатциклазы, другого основного фермента системы циклических нуклеотидов, представляет важное звено в механизме мембранной рецепции: рецепторы, взаимодействуя с соответствующим медиатором, вызывают поступление Ca^{2+} в цитоплазму и, как следствие, повышение внутриклеточного уровня цАМФ. \square

В возбудимых клетках харовых водорослей Ca^{2+} выступает в качестве активатора хлорных каналов. При деполяризации плазмалеммы ионы Са поступают по $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^{+}$ -каналам из среды в цитоплазму и активируют Cl^{-} -каналы плазмалеммы и тонопласта, в результате чего Cl^{-} начинает выходить из клетки в среду. Поступление в клетку Ca^{2+} и выход из нее Cl^{-} определяют появление быстрого и медленного компонентов входящего тока, которые разделяются по потенциалам реверсии, а также по чувствительности к ряду ингибиторов.

Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может быть обусловлено не только поступлением его из среды, но и выбросом из внутриклеточных органелл. Так, предполагают, что цАМФ может вызывать выброс Ca^{2+} из митохондрий, которые служат депо кальция.

Ионы Са не принимают непосредственного участия в воротном процессе. Мышечные волокна продолжают генерировать потенциалы действия и сокращаться даже после понижения наружной концентрации Ca^{2+} до $\sim 10^{-9}$ М.