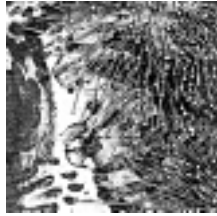


Транспорт ионов в возбудимых мембранах



§ 1. Потенциал действия

Нервные импульсы, возникающие в отдельных волокнах, имеют постоянную амплитуду и форму. Одиночный нервный импульс — потенциал действия — длится примерно 1 мс и распространяется со скоростью от 1 до 100 м/с.

В основе представлений о процессе генерации нервного импульса лежат исследования, выполненные на гигантских нервных волокнах кальмара А. Ходжкиным, А. Хаксли и Б. Катцем. Для измерения потенциала действия внутри аксона вводят тонкий стеклянный капилляр с диаметром кончика менее 0,5 мкм, заполненный концентрированным раствором KCl, что не оказывает заметного влияния на активность аксона.

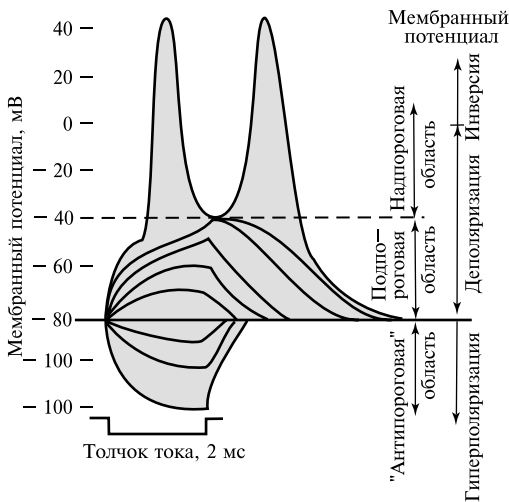


Рис. XXIII.1.

Возникновение импульса в результате местной деполаризации (по Б. Катцу, 1968)

При действии толчка тока фиксированной длительности (2 мс), но различной силы и направления, возникают изменения мембранного потенциала, представленные семейством кривых на графике

При пропускании гиперполяризующих или подпороговых деполаризующих импульсов тока мембрана ведет себя подобно пассивной RC -цепи, заряжаясь экспоненциально от исходного до нового уровня с характерным временем τ , равным произведению сопротивления на емкость мембраны (рис. XXIII.1). При действии надпороговых деполаризующих импульсов наблюдается быстрое смещение значений потенциала внутренней части волокна до уровня $+(40-50)$ мВ и последующий

их возврат с кратковременной стадией следовой гиперполяризации. Амплитуда потенциала действия составляет 100–120 мВ.

Потенциал покоя. Как и протоплазма многих других клеток, аксоплазма содержит в высокой концентрации K^+ и в относительно низкой концентрации Na^+ и Cl^- . Ионы K внутри волокна свободны и не связаны с белками или другими крупными молекулами.

В состоянии покоя мембрана более проницаема для K^+ , чем для Na^+ . Вследствие диффузии K^+ наружу из аксоплазмы внутреннее содержимое нервного волокна в состоянии покоя заряжено отрицательно по отношению к наружному раствору. Эта постоянная разность потенциалов — потенциал покоя — равна 50–70 мВ. Какими факторами определяется это значение? Если бы мембрана была проницаема только для K^+ , равновесная разность потенциалов достигла бы значения, определяемого уравнением Нернста [см. (XVIII.3.1)] для калиевого электрода

$$\varphi_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K_o]}{[K_i]}, \quad (\text{XXIII.1.1})$$

где φ_K — равновесный потенциал для K^+ . При концентрациях K^+ в крови 20 мМ и аксоплазме 400 мМ кальмара рассчитанное значение φ_K равно –75 мВ. Действительно, в интактных аксонах регистрируют потенциалы покоя около –70 мВ. Следовательно, в этих условиях мембрана ведет себя подобно K^+ -электроду. Однако при более низких концентрациях K^+ в среде потенциал покоя уже существенно отличается от расчетных значений равновесного потенциала φ_K .

Как оказалось, зависимость потенциала покоя от концентрации K^+ в среде значительно лучше описывается уравнением Гольдмана (см. (XIX.2.10)], которое выведено в рамках электродиффузионной теории в приближении постоянного поля.

В состоянии покоя распределение Cl^- близко к равновесному, т. е. потоки Cl^- из клетки и внутрь ее одинаковы. В этом случае условие нулевого тока через мембрану [см. (XIX.2.8)] $I_K + I_{Na} + I_{Cl} = 0$ упрощается до $I_K + I_{Na} = 0$ и потенциал покоя вычисляется по формуле

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

Потенциал на мембране в состоянии покоя (XXIII.1.2) приближается к равновесному потенциалу для K^+ , так как проницаемости для K^+ в этих условиях намного больше коэффициента проницаемости для Na^+ ($P_K : P_{Na} = 1 : 0,04$). \square

Генерация импульса. Реверсия мембранного потенциала во время развития импульса вызвана тем, что на гребне спайка потенциала действия мембрана избирательно проницаема для Na^+ , так что отношение ионных проницаемостей становится равным $P_K : P_{Na} = 1 : 20$. Как видно из формулы (XXIII.1.2), в этих условиях ($P_{Na} \gg P_K$) потенциал на мембране приближается к равновесному натриевому потенциалу φ_{Na} . Разность потенциалов на мембране, проницаемой только для Na^+ , выражается формулой Нернста

$$\varphi_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na_o]}{[Na_i]}. \quad (\text{XXIII.1.3})$$

Предельное значение потенциала, вычисленное по (XXIII.1.3), равно +55 мВ, что лишь немного превышает экспериментально наблюдаемые значения обращенного потенциала. Эти выводы сохраняются, если воспользоваться для выражения мембранного потенциала более полной формулой, где учтены потоки Cl^- :

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K_o] + P_{Na}[Na_o] + P_{Cl}[Cl_i]}{P_K[K_i] + P_{Na}[Na_i] + P_{Cl}[Cl_o]}. \quad (\text{XXIII.1.4})$$

В состоянии покоя $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$, а в состоянии возбуждения на пике потенциала действия, когда вновь соблюдается условие нулевого тока через мембрану, $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45$. \square

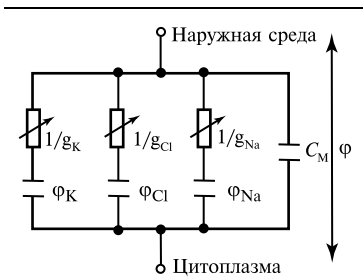


Рис. XXIII.2.

Эквивалентная схема мембраны нервной или мышечной клетки (по Б. Катцу, 1968).

φ_K , φ_{Cl} , φ_{Na} — равновесные потенциалы для K^+ , Cl^- , Na^+ ; g_K , g_{Cl} , g_{Na} — проводимость для K^+ , Cl^- , Na^+ ; C_M — емкость мембраны; φ — мембранный потенциал

Для описания изменений мембранного потенциала при возбуждении помимо приближения постоянного поля [см. (XXIII.1.4)] часто используют и другой подход, основанный на представлении ионных проводимостей мембраны в виде эквивалентной электрической цепи (рис. XXIII.2).

Мембранный потенциал, измеряемый на схеме между точками i и o (внутренняя и наружная среда клетки), создается электродвижущими силами, равными равновесным потенциалам отдельных видов ионов, последовательно соединенными с соответствующими сопротивлениями. Ток в каждой из ветвей равен

$$I_i = g_i(\varphi - \varphi_i), \quad (\text{XXIII.1.5})$$

где g_i — проводимость мембраны для данного вида ионов, φ_i — равновесный потенциал данного вида ионов, а φ — общий потенциал на мембране. Используя условие, что в разомкнутой цепи при постоянном напряжении на мембране сумма токов

равна нулю, можно получить следующее выражение для мембранного потенциала:

$$\varphi = \frac{g_K \varphi_K}{g_m} + \frac{g_{Na} \varphi_{Na}}{g_m} + \frac{g_{Cl} \varphi_{Cl}}{g_m}, \quad (\text{XXIII.1.6})$$

где g_m — суммарная проводимость мембраны: $g_m = g_K + g_{Na} + g_{Cl}$.

Из (XXIII.1.6) видно, что значение мембранного потенциала определяется теми ионами, для которых проводимость мембраны максимальна. Уравнение (XXIII.1.6) во многих случаях лучше описывает зависимости мембранного потенциала от концентрации ионов в среде, чем уравнение (XXIII.1.4).

Эквивалентная схема ионных проводимостей мембраны и основанное на ней уравнение (XXIII.1.6) предполагают, что разные виды ионов проникают через клеточную мембрану по пространственно разделенным путям. Это соответствует современным представлениям о существовании отдельных типов ионных каналов, селективно проницаемых для Na^+ и K^+ .

∇ Процесс возбуждения развивается вследствие зависимости проницаемости мембраны для ионов от мембранного потенциала. При достижении критической деполяризации, когда возрастает проницаемость мембраны для Na^+ , эти ионы устремляются внутрь и вызывают дальнейшую деполяризацию мембраны. Процесс продолжается до тех пор, пока потенциал не сместится до равновесного натриевого потенциала. В этих условиях потоки Na^+ наружу и внутрь сравниваются. Затем происходит увеличение проницаемости для K^+ и ионы K^+ начинают выходить из клетки по градиенту своего электрохимического потенциала. В этом процессе мембрана реполяризуется. Выход K^+ прекращается, когда потенциал на мембране приблизится к равновесному калиевому потенциалу. □

Важным подтверждением мембранной теории возбуждения явились эксперименты по регистрации потенциала действия на перфузируемых аксонах, у которых аксоплазма заменена на подходящий солевой раствор (например, K_2SO_4). Заполненные искусственным раствором аксоны проводят импульсы в течение нескольких часов, хотя в результате перфузии удаляется около 95% аксоплазмы. Опыты с перфузией аксона подтвердили идею о том, что потенциал покоя регулируется ионом K^+ . Так, при перфузии аксона бескалийевым раствором потенциал покоя был близок к нулю. Повышение концентрации K^+ внутри аксона в интервале до 150 мМ сопровождалось повышением потенциала покоя в соответствии с уравнением Нернста.

Аналогичные опыты с изменением концентрации Na^+ в перфузируемом растворе выявили зависимость пикового значения потенциала действия от внутриклеточной концентрации Na^+ . При повышении концентрации Na^+ величина спайка уменьшалась, а при замене 50% калия на натрий в перфузируемом растворе проведение возбуждения прекращалось.

Одно из веских доказательств мембранной теории состоит в том, что проведение импульса связано с заметным возрастанием скорости движения Na^+ и K^+ по градиентам концентрации. Количество входящего Na^+ и выходящего K^+ можно определить с помощью изотопов или методом пламенной фотометрии после многократной стимуляции аксона. Результаты измерений показывают, что в гигантском аксоне каракатицы каждый импульс связан не только с входящим потоком Na^+ ($10,3 \text{ пмоль/см}^2$), но и с выходящим потоком этого же иона ($6,6 \text{ пмоль/см}^2$). Таким образом, суммарный вход Na^+ составляет $3,7 \text{ пмоль/см}^2$, что приблизительно соответствует потере K^+ на один импульс.

Количество входящего Na^+ вполне достаточно для реполяризации мембраны в период потенциала действия. Действительно, чтобы изменить напряжение конденсатора емкостью 1 мкФ на 120 мВ, необходим заряд, равный $0,12 \cdot 10^{-6}$ Кл. Это эквивалентно $1,2 \cdot 10^{-12}$ моль одновалентного катиона, что составляет лишь 1/3 от наблюдаемого входа Na^+ . Таким образом, общее количество входящего Na^+ значительно превышает минимум, необходимый для изменения потенциала на мембране при возбуждении. Превышение минимума объясняется тем, что Na^+ входит не только во время восходящей фазы спайка. Вход Na^+ продолжается и во время ранней фазы спада, когда высока проницаемость и для Na^+ , и для K^+ . В этот период заряд, переносимый входящим Na^+ , с избытком компенсируется выходящим K^+ .

После прохождения по аксону одного спайка система возвращается в исходное состояние, за исключением того, что в клетке появился некоторый избыток

ионов Na, вошедших в период деполяризации, и некоторый недостаток ионов K, вышедших на фазе реполяризации. Изменения внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ , вызванные одиночным потенциалом действия, крайне малы, но могли бы оказаться значительными при многократном прохождении нервных импульсов. Для поддержания постоянного уровня внутриклеточных концентраций K^+ и Na^+ в клеточной мембране и существует система Na^+ , K^+ -насоса (см. § 1 гл. XXII), обеспечивающая активное выведение Na^+ в обмен на поступление в клетку K^+ , работающая за счет энергии АТФ.

§ 2. Ионные токи в мембране аксона

Механизмы возбудимости были расшифрованы благодаря измерениям мембранного тока методом фиксации потенциала (К. Коул, 1949). В обычных измерениях потенциала действия проницаемости для Na^+ и K^+ являются функцией двух переменных: значения мембранного потенциала и времени. В методе фиксации потенциала смещения мембранного потенциала находятся под контролем, что дает возможность четко разграничить влияние этих двух факторов за счет подавления автоматического взрывоподобного развития потенциала действия.

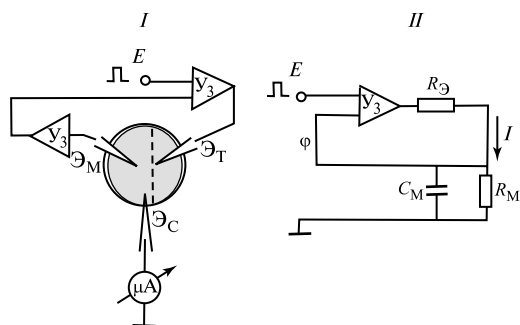


Рис. XXIII.3.

Принципиальная (I) и эквивалентная (II) схемы установки для фиксации мембранного потенциала

Основу установки составляет дифференциальный усилитель U_2 с высоким коэффициентом усиления, на один вход которого подается разность потенциалов между измерительным микроэлектродом \mathcal{E}_H и наружным электродом сравнения \mathcal{E}_C , т. е. мембранный потенциал (измеряется усилителем U_1). На другой вход поступает

командный потенциал E . Если командный потенциал E равен потенциалу покоя φ , то напряжение на выходе дифференциального усилителя равно нулю, и в цепи, включающей токовый электрод \mathcal{E}_T , клеточную мембрану и электрод сравнения, ток не течет. Если же командный потенциал отличается от потенциала покоя, то на выходе дифференциального усилителя возникает напряжение, пропорциональное разности потенциалов $(E - \varphi)$ с коэффициентом пропорциональности $K_0 \sim 10^6$ (K_0 — коэффициент усиления операционного усилителя). При этом в цепи обратной связи через токовый микроэлектрод с сопротивлением $R_\mathcal{E}$, клеточную мембрану и электрод сравнения потечет ток, который смещает потенциал на мембране, приближая его к заданному уровню потенциала E

В методе фиксации потенциала используют электронную управляющую систему с обратной связью, которая обеспечивает поддержание мембранного потенциала на заданном уровне. При этом регистрируется ток, текущий через мембрану. На рис. XXIII.3 представлен способ измерения тока при фиксации потенциала.

При ступенчатом смещении командного потенциала от уровня потенциала покоя напряжение на мембране практически мгновенно устанавливается на новом заданном уровне, равном командному сигналу. Ток, текущий при этом через мем-

брану, измеряется с помощью включенного в цепь усилителя тока, показанного на схеме в виде микроамперметра. □

Данные, получаемые методом фиксации потенциала, интерпретируют обычно на основе эквивалентной схемы возбудимой мембраны (см. рис. XXIII.2). Каждый элемент мембраны нервного волокна содержит мембранную емкость C_m , калиевую батарею φ_K и сопротивление $1/g_K$, а также натриевую батарею φ_{Na} и сопротивление $1/g_{Na}$. Сопротивление утечки $\sim 1/g_l$, и батарея φ_l введены для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не меняются во время активности. Волокно в целом следует рассматривать в виде большого числа подобных элементов, связанных между собой и образующих непрерывный кабель.

В состоянии покоя ток через мембрану не течет. Если потенциал на мембране сместить от уровня потенциала покоя в сторону деполяризации, то проницаемости Na^+ - и K^+ -каналов изменяются определенным образом от одного стационарного состояния к другому. В этом случае в каждом из параллельно соединенных участков текут токи, пропорциональные разности между равновесным потенциалом иона φ_i и поддерживаемым на мембране потенциалом:

$$I_i = g_i(\varphi - \varphi_i), \quad (XXIII.2.1)$$

где g_i — проводимость мембраны для данного вида ионов. Общий ток через мембрану $I_{общ}$ равен сумме емкостного тока и ионного тока, обусловленного движением ионов по отдельным путям:

$$I_{общ} = C_m d\varphi/dt + I, \quad (XXIII.2.2)$$

где C_m — мембранная емкость, $d\varphi/dt$ — скорость изменения мембранного потенциала, $I = \sum I_i$ — трансмембранный ионный ток.

Если потенциал на клеточной мембране не поддерживается на фиксированном уровне, то в период потенциала действия $d\varphi/dt \neq 0$ и через мембрану течет значительный емкостной ток. Важное преимущество метода фиксации потенциала состоит в том, что емкостный ток протекает только в течение очень короткого периода после сдвига мембранного потенциала на заданный уровень. После кратковременного выброса емкостный ток прекращается, так как потенциал на мембране не изменяется ($d\varphi/dt = 0$). Поскольку длительность потенциала действия составляет несколько миллисекунд, важно, чтобы установление потенциала на новом уровне и спад емкостного тока происходили значительно быстрее, например за время порядка десятка микросекунд. Тогда ток, развивающийся после прекращения емкостного тока, будет обусловлен уже только переносом ионов через мембрану.

Физический анализ процесса электрического возбуждения в мембране нервного волокна осложняется распространением нервного импульса по волокну. Чтобы устранить эту трудность и заставить всю мембрану аксона возбуждаться синхронно, внутрь аксона вводят металлический осевой электрод. Введение осевого электрода внутрь аксона позволяет не учитывать кабельные свойства волокна и заменить эквивалентную схему с распределенными емкостью и ионной проводимостью (см. § 8 гл. XXIII) на простую эквивалентную схему (см. рис. XXIII.2).

В ответ на ступенчатую деполяризацию аксона кальмара от потенциала покоя до 0 мВ регистрируется мембранный ток, состоящий из четырех компонентов

(рис. XXIII.4). Емкостный ток I_C представляет собой кратковременный импульс, который в основном заканчивается к моменту выхода напряжения на плато. Некоторые дипольные молекулы в мембране медленно меняют свою ориентацию после наложения ступенчатого напряжения, что приводит к появлению небольшого по амплитуде «хвоста» емкостного тока, который спадает относительно медленно. После спада I_C мембранный ток полностью определяется движением ионов через каналы в мембране.

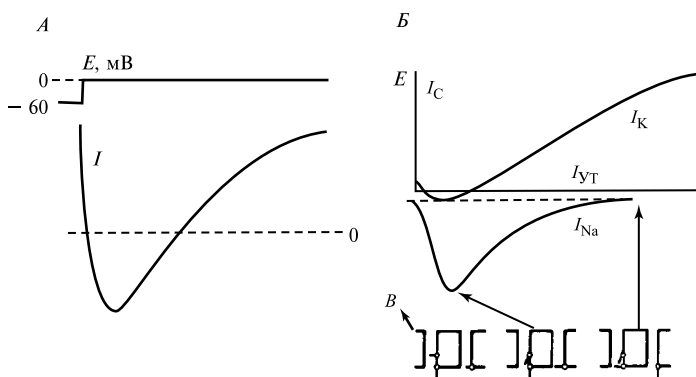


Рис. XXIII.4.

Ток, протекающий через мембрану аксона кальмара при ступенчатое деполяризации от уровня потенциала покоя (-60 мВ) до нуля (А); представление полного тока в виде суммы четырех компонентов (В) и различные состояния воротной системы Na- и K-каналов (по С. М. Armstrong, 1975):

I_C — емкостный ток, I_{Na} — натриевый ток; I_K — калиевый ток, I_{UT} — ток утечки; отклонения вниз соответствуют входящему току, вверх — выходящему

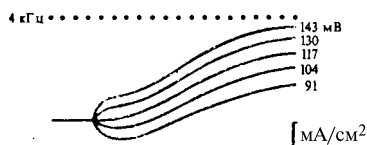


Рис. XXIII.5.

Мембранные токи при различных смещениях мембранного потенциала (температура $3,5^\circ$). Отклонения вверх соответствуют выходящему току; цифрами обозначена величина смещения мембранного потенциала (по А. Л. Hodgkin, 1964).

В ионном токе можно выделить два основных компонента (калиевый и натриевый) и один второстепенный. Последний представляет собой небольшой по значению ток утечки, не меняющийся во времени. Na^+ -ток обусловлен кратковременным потоком Na^+ через Na^+ -каналы. Этот ток быстро уменьшается, и спустя примерно 1 мс сменяется входящим K^+ -током.

Если мембрана деполяризована так, что разность потенциалов равна напряжению натриевой батареи (φ_{Na} равновесный Na^+ -потенциал), то Na^+ -ток отсутствует и наблюдается только K^+ -ток, возникающий с обычной задержкой. При смещении потенциала до положительных значений, превышающих уровень φ_{Na} , Na^+ -ток направлен наружу (рис. XXIII.5).

Ионный ток удается разделить на отдельные компоненты путем замены Na^+ в среде на непроницающие катионы холина. В этом случае кинетическая кривая включает только K^+ -компонент (рис. XXIII.6).

Разделение тока на компоненты наглядно иллюстрируют опыты с использованием ряда фармакологических агентов. Добавление к аксону малых количеств тетродотоксина ТТХ полностью подавляет Na^+ -ток (рис. XXIII.7). Если в аксон

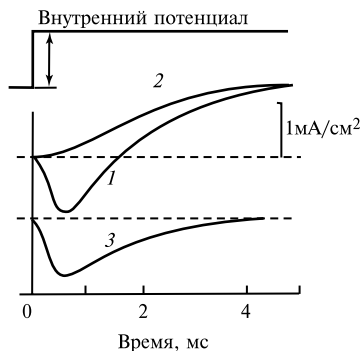


Рис. XXIII.6.

Экспериментальное разделение мембранного тока I на калиевый и натриевый компоненты (по А. L. Hodgkin, 1964):

I — аксон находится в морской воде, $I = I_{\text{Na}} + I_{\text{K}}$; 2 — большая часть натрия заменена холином, $I = I_{\text{K}}$; 3 — разность между 1 и 2, $I = I_{\text{Na}}$, температура $8,5^\circ\text{C}$; отклонение вверх соответствует выходящему току

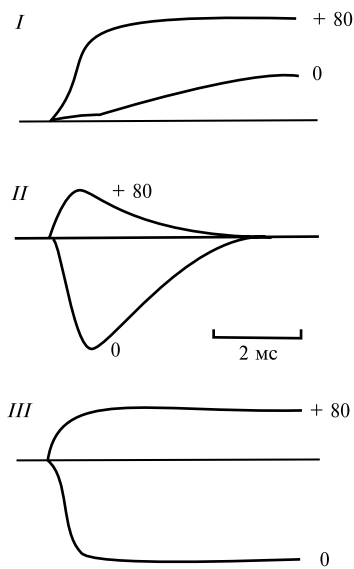


Рис. XXIII.7.

Влияние тетродотоксина ТТХ, тетраэтиламмония ТЭА и проназы на ионные токи в мембране аксона, вызываемые смещением мембранного потенциала до 0 и до $+80$ мВ:

I — калиевый ток в аксонах, обработанных ТТХ; II — натриевый ток в аксонах, перфузируемых раствором с добавлением 15 мМ ТЭА; III — то же, что и II , после введения в перфузируемый раствор проназы (2 мг/мл); цифрами у кривых отмечены значения потенциала внутреннего раствора

кальмара инъецирован или введен с помощью перфузии тетраэтиламмоний ТЭА до концентрации 15 мМ, то практически полностью подавляется K^+ -ток. Опыты с использованием ТТХ и ТЭА свидетельствуют о том, что Na^+ - и K^+ -каналы — раздельные структуры, как и предполагается эквивалентной схемой, предложенной в работах А. Ходжкина и А. Хаксли. □

Дальнейшее подтверждение существования двух типов каналов получено в опытах с применением проназы. Оказалось, что перфузия аксона раствором с проназой

не оказывает влияния на кинетические кривые K^+ -тока, но существенно изменяет кинетику Na^+ -тока. Обработка проназой приводит к подавлению стадии инактивации Na^+ -тока (рис. XXIII.7, III), т. е. к исчезновению стадии быстрого уменьшения Na^+ -тока после достижения пикового значения. Значение тока остается большим на протяжении всего импульса напряжения. Эквивалентная схема, используемая при интерпретации данных в опытах по фиксации потенциала (см. рис. XXIII.2), предполагает, что токи, текущие по Na^+ - и K^+ -каналам, подчиняются уравнениям

$$I_{Na} = g_{Na}(\varphi - \varphi_{Na}); \quad I_K = g_K(\varphi - \varphi_K). \quad (XXIII.2.3)$$

Если во время развития ионного тока скачком сместить мембранный потенциал на новый уровень, то ток также изменится скачком. Построенные таким способом мгновенные вольт-амперные характеристики мембраны аксона оказались линейными: мгновенный сдвиг ионного тока был пропорционален величине смещения потенциала, что соответствует уравнению (XXIII.2.3). Из соотношений (XXIII.2.3) видно,

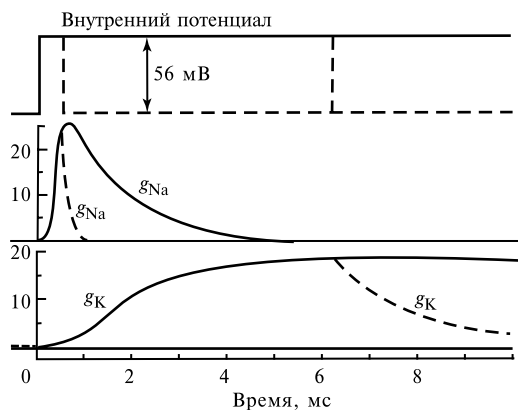


Рис. XXIII.8.

Изменение натриевой и калиевой проводимости во времени при деполяризации мембраны на 56 мВ (по А. Л. Hodgkin, 1964)

Сплошными линиями показана проводимость при длительной деполяризации, штриховыми — проводимость при реполяризации мембраны через 0,6 и 6,3 мс

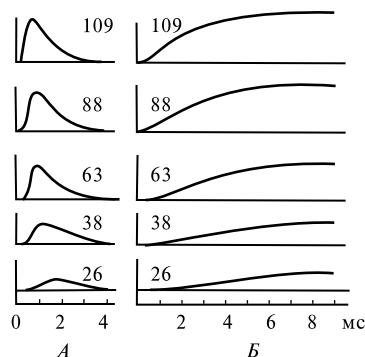


Рис. XXIII.9.

Изменение натриевой (А) и калиевой (Б) проводимости мембраны аксона при различных смещениях мембранного потенциала от уровня потенциала покоя

Цифрами обозначена величина деполяризации (мВ)

что изменение тока Na^+ и K^+ во времени в режиме фиксации напряжения обусловлено изменением проводимостей g_{Na} и g_K , поскольку величина $(\varphi - \varphi_i)$ остается постоянной в течение всего импульса.

Разделив суммарный ионный ток на отдельные компоненты, нетрудно найти кинетические кривые изменений проводимости для каждого иона:

$$g_i = I_i / (\varphi - \varphi_i). \quad (XXIII.2.4)$$

На рис. XXIII.8 показаны вычисленные по (XXIII.2.4) изменения проводимости, вызванные быстрым смещением потенциала внутри волокна от уровня потенциала покоя (-56 мВ) до нуля в экспериментах, приведенных на рис. XXIII.6. Как видно, при ступенчатой деполяризации мембраны Na^+ -проводимость начинает изменяться от чрезвычайно малой величины, быстро нарастает до 25 мСм/см², а затем экспоненциально уменьшается. Проводимость для K^+ нарастает по S-образной кривой и выходит на постоянный уровень через 5–6 мс. Изменения проницаемости для K^+ и Na^+ градуальны и обратимы. Натриевая проводимость восстанавливается примерно в 10 раз быстрее, чем калиевая.

Na^+ -проводимость может быть уменьшена двумя разными способами. Если мембранный потенциал вернуть на исходный уровень через короткий промежуток времени, то система, регулирующая Na^+ -проницаемость, быстро возвращается к состоянию покоя. Второй импульс, нанесенный сразу же после первого, вызывает в этом случае повторное увеличение Na^+ -проводимости. Если же деполяризация продолжительна, Na^+ -проводимость уменьшается более медленно вследствие процесса, называемого инактивацией. Для того чтобы второй импульс после инактивации Na^+ -каналов мог снова вызвать изменение проницаемости для Na^+ , мембрана в течение нескольких миллисекунд до начала второго импульса должна быть реполяризована. Этот период необходим для выхода из состояния инактивации (см. XXI, § 7).

На рис. XXIII.9 представлено семейство кривых, показывающих зависимость проводимости от амплитуды сдвига потенциала и времени после ступенчатого изменения напряжения на мембране. В области порога возбуждения увеличение деполяризации мембраны на 4–6 мВ вызывает быстрое возрастание проводимости.

§ 3. Описание ионных токов в модели Ходжкина—Хаксли

∇ На основе опытов по фиксации напряжения в аксоне кальмара А. Ходжкин и А. Хаксли сформулировали ряд важных принципов. 1. Перенос Na^+ и K^+ осуществляется различными невзаимодействующими структурами. 2. Изменение токов являются следствием изменения проницаемости мембран (для Na^+ и K^+). 3. Пропускная способность мембраны управляется электрическим полем. □

А. Ходжкин и А. Хаксли предложили удовлетворительное математическое описание экспериментально наблюдаемой кинетики изменений натриевой и калиевой проводимости при различных смещениях мембранного потенциала (рис. XXIII.9). Модель предполагает, что проводимость мембраны для ионов Na и K регулируется некоторыми управляющими частицами, перемещающимися в мембране при изменениях электрического поля.

Такое перемещение можно представить в виде перескоков положительно заряженных частиц между двумя потенциальными ямами через энергетический барьер с константами скоростей α и β (рис. XXIII.10), которые зависят от высоты энергетического барьера и, следовательно, являются потенциалозависимыми. Повышение электрического потенциала с левой стороны мембраны приводит к увеличению константы α и уменьшению константы β .

При ступенчатом изменении разности потенциалов на мембране происходит перераспределение частиц между двумя состояниями. При этом изменяются до новых

равновесных значений вероятности заполнения правой и левой потенциальных ям: x и $(1 - x)$ соответственно.

Процесс изменения вероятности (x) заполнения правой ямы после ступенчатого сдвига потенциала может быть описан дифференциальным уравнением

$$dx/dt = \alpha(1 - x) - \beta x. \quad (\text{XXIII.3.1})$$

Задаваясь граничными условиями: $x = x_0$ при $t = 0$ и $x = x_\infty$ при $t = \infty$, получим

$$x = x_\infty - (x_\infty - x_0) \exp[-t(\alpha + \beta)]. \quad (\text{XXIII.3.2})$$

Уравнение показывает, что накопление частиц в правой части мембраны происходит по экспоненциальному закону с постоянной времени τ , где $\tau = 1/(\alpha + \beta)$.

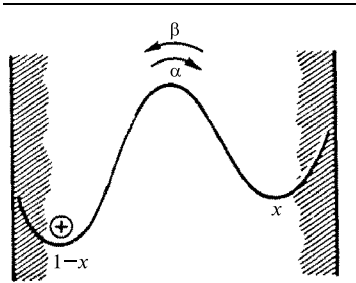


Рис. XXIII.10.

Модель, демонстрирующая перемещение заряженных частиц в мембране при изменениях электрического поля:

x — вероятность нахождения частицы в правой стороне мембраны; $(1 - x)$ — вероятность нахождения частицы а левой стороне мембраны; α и β — потенциалзависимые константы перехода заряженных частиц через мембрану

Изменения калиевой проводимости. Если бы канал открывался в результате перехода слева направо только одной активирующей частицы, то проводимость ионных каналов менялась бы во времени также по экспоненте, т. е. можно было бы записать $g_i = x\bar{g}_i$, где \bar{g}_i — максимальная проводимость для ионов типа i . Однако наилучшее соответствие кинетической кривой калиевой проводимости в аксоне кальмара достигается при допущении, что для открывания калиевых каналов необходим приход к определенному участку мембраны четырех активирующих частиц.

Пусть n обозначает вероятность того, что одна частица, управляющая K^+ -проницаемостью, находится в правой части мембраны. Тогда вероятность p того, что там находится одновременно четыре частицы, равна n^4 . Поэтому K^+ -проводимость мембраны в любой момент времени равна

$$g_K = \bar{g}_K n^4, \quad (\text{XXIII.3.3})$$

где n определяется уравнением типа (XXIII.3.1) и может варьировать в пределах от 0 до 1:

$$dn/dt = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n. \quad (\text{XXIII.3.4})$$

Частицы, управляющие проницаемостью K^+ -каналов, называют n -частицами.

Рассмотрим простой случай, когда в исходном состоянии все n -частицы находятся с левой стороны мембраны ($n = 0$) и K^+ -каналы закрыты. После наложения большой разности потенциалов со знаком плюс по левую сторону мембраны все n -частицы перетекают в правую яму. Кинетика накопления n -частиц в правой части мембраны описывается экспонентой [см. (XXIII.3.2)]

$$n(t) = n_\infty - (n_\infty - n_0) \exp(-t/\tau_n), \quad (\text{XXIII.3.5})$$

где $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$. Так как в рассматриваемом случае $n_0 = 0$, а $n_\infty = 1$, то

$$n(t) = 1 - \exp(-t/\tau_n).$$

Величина K^+ -проводимости, пропорциональная четвертой степени n , растет уже не по экспоненте, а с большим периодом задержки. Быстрое изменение величины n^4 начинается лишь после того, как значения n превысят 0,7.

Приведенный пример поясняет и способ определения кинетических параметров активации K^+ -проводимости. Для определения постоянной времени активации τ_n необходимо произвести нормировку кинетических кривых проводимости, т. е. построить зависимости $g_K(t)/\bar{g}_K = n^4$. Затем, извлекая корень четвертой степени, построить зависимость $n(t)$ и определить постоянную времени экспоненты $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$ для данного уровня мембранного потенциала.

Если приложенная к мембране разность потенциалов недостаточно велика, то не все управляющие частицы переместятся с левой стороны мембраны; это означает, что параметр n не достигнет предельного значения ($n = 1$) и K^+ -проводимость установится на уровне меньше максимальной \bar{g} . Величину n_∞ определяют из эксперимента по формуле

$$n_\infty = (g_\infty/\bar{g})^{1/4}, \quad (\text{XXIII.3.6})$$

где g_∞ — стационарный уровень K^+ -проводимости при данном потенциале, \bar{g} — максимальная K^+ -проводимость. Из уравнения (XXIII.3.4) следует, что в равновесии (dn/dt)

$$n_\infty = \alpha_n/(\alpha_n + \beta_n).$$

Таким образом, из семейства кинетических кривых K^+ -проводимости (см. рис. XXIII.9, Б) можно отыскать значения констант скоростей α и β при разных потенциалах, используя систему уравнений

$$\tau = 1/(\alpha + \beta); \quad n_\infty = \alpha/(\alpha + \beta). \quad (\text{XXIII.3.7})$$

Как видно из (XXIII.3.7), $\alpha = n_\infty/\tau$.

Изменения натриевой проводимости. Кинетические кривые Na^+ -проводимости имеют более сложную форму (см. рис. XXIII.9, А): проводимость нарастает до максимума — активация, а затем снижается — инактивация. Изменение Na^+ -проводимости удалось описать на основе предположения о наличии активирующих m -частиц и инактивирующих h -частиц. Предполагают, что для открывания канала необходимо поступление в определенный участок мембраны трех m -частиц. Переход через мембрану одной инактивирующей частицы вызывает блокировку канала. Таким образом, изменения Na^+ -проводимости описывают уравнением

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h, \quad (\text{XXIII.3.8})$$

где \bar{g}_{Na} — максимальная Na^+ -проводимость, m — вероятность нахождения в заданном участке мембраны одной m -частицы, h — вероятность того, что инактивирующая частица в этом участке отсутствует. При наложении поля, перемещающего заряженные частицы с левой стороны мембраны (рис. XXIII.10) на правую, m возрастает в пределах от 0 до 1, а h снижается (в пределе до 0).

Кинетика перераспределения частиц через мембрану при наложении электрического поля описывается одностипными уравнениями

$$dm/dt = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m, \quad dh/dt = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h, \quad (\text{XXIII.3.9})$$

где α и β — константы скорости, зависящие только от мембранного потенциала (при постоянной температуре и концентрации Ca^{2+}). Решение этих уравнений имеет вид

$$\begin{aligned} m(t) &= m_\infty - (m_\infty - m_0) \exp(-t/\tau_m), \quad \text{где } \tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m); \\ h(t) &= h_\infty - (h_\infty - h_0) \exp(-t/\tau_h), \quad \text{где } \tau_h = 1/(\alpha_h + \beta_h). \end{aligned} \quad (\text{XXIII.3.10})$$

Значения m_∞ и h_∞ определяются из граничных условий

$$m_\infty = \alpha_m / (\alpha_m + \beta_m); \quad h_\infty = \alpha_h / (\alpha_h + \beta_h). \quad (\text{XXIII.3.11})$$

В результате анализа кинетических кривых активации и инактивации Na^+ -проводимости А. Ходжкин и А. Хаксли построили графические зависимости параметров α_m , β_m , α_h , β_h , α_n , β_n , а также m_∞ , n_∞ и h_∞ от мембранного потенциала (рис. XXIII.11, 12) и выбрали эмпирические соотношения, описывающие ход указанных зависимостей.

Исходя из эмпирических зависимостей, представленных на рис. XXIII.11, можно показать, что отношение констант скоростей переходов m -частиц через мембрану зависит от потенциала в соответствии с формулой

$$\frac{\beta_m}{\alpha_m} \simeq \exp\left(-\frac{3,9F\varphi}{RT}\right) \sim \exp\left(-\frac{4F\varphi}{RT}\right). \quad (\text{XXIII.3.12})$$

Из приведенных на рис. XXIII.11, 12 кривых видно, что стационарный K^+ -ток имеет место в широкой области потенциалов, тогда как стационарный Na^+ -ток ограничен узкой областью, где m^3 и h одновременно отличны от нуля. На основе рассмотренной математической модели А. Ходжкину и А. Хаксли удалось с высокой точностью воспроизвести нервный импульс, генерируемый мембраной аксона в различных экспериментальных условиях. После незначительной модификации модели был имитирован процесс электрического возбуждения в миелинизированных нервных волокнах (Б. Франкенхаузер) и в соме нервных клеток (П. Г. Костюк, О. А. Крышталь).

∇ Разделение трансмембранных токов на отдельные компоненты сыграло чрезвычайно важную роль для понимания механизмов электровозбудимости мембран: охарактеризованы селективность, потенциалзависимость, кинетика включения и выключения внутримембранных путей — ионных каналов. В основном в результате этих работ были созданы общие представления о структурно-функциональной организации Na^+ - и K^+ -каналов, управляемых изменениями электрического поля (рис. XXI.11); выделены функциональные элементы ионных каналов, ответственные за механизмы селекции, — селективный фильтр, активации — «активационные ворота» и инактивации — «инактивационные ворота» (гл. XXI, §§ 6, 7). □

Модель Ходжкина—Хаксли рассматривает активацию и инактивацию каналов как полностью независимые друг от друга процессы, которые определяются лишь

перемещением заряженных частиц. Общий ток через мембрану состоит из трех компонент

$$I_i = m^3 h \bar{g}_{Na} (\varphi - \varphi_{Na}) + n^4 \bar{g}_K (\varphi - \varphi_K) + \bar{g}_2 (\varphi - \varphi_2), \quad (\text{XXIII.3.13})$$

где \bar{g}_2 — проводимость фоновой утечки. Таким образом, все свойства электрической возбудимости мембраны описываются соответствующими зависимостями коэффициентов от h , m , n . Вместе с тем несмотря на успех предложенной модели, она не рассматривает молекулярных механизмов открытия и закрытия каналов, лишь формально объясняя их перемещением гипотетических заряженных частиц. В свете представлений (гл. XXI, § 7) о макромолекулярной структуре канала непосредственное влияние на эти процессы должны оказывать конформационные перестройки в канале, которые, хотя и проявляются в наблюдаемых температурных зависимостях, но не отражены в модели.

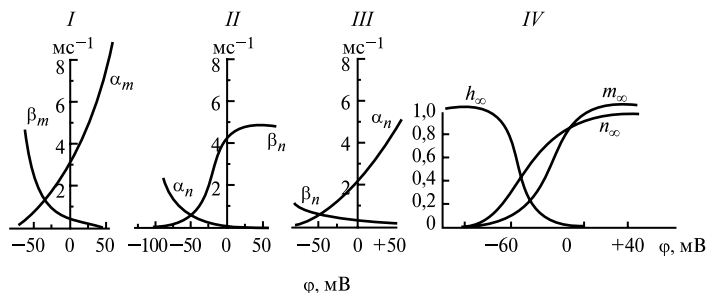


Рис. XXIII.11.

Зависимость констант α и β от мембранного потенциала (I, II, III) и стационарных значений m , h , n от мембранного потенциала (IV) (по В. С. Маркину и др., 1981)

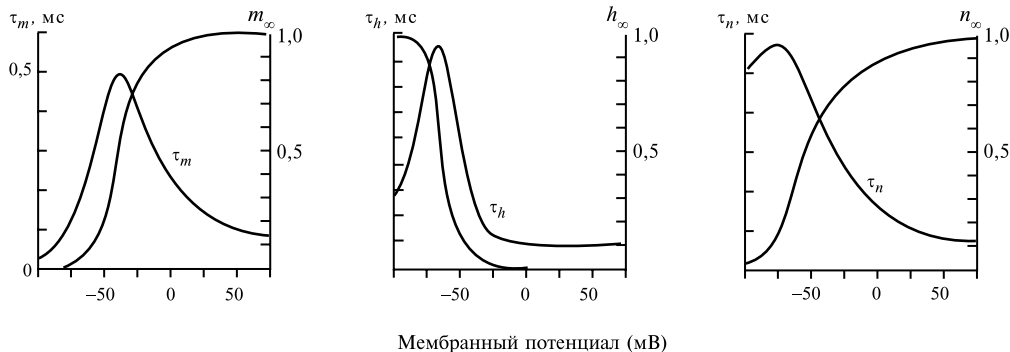


Рис. XXIII.12.

Потенциал-зависимые параметры модели Ходжкина—Хаксли

Постоянные времена τ_m , τ_h и τ_n и стационарные состояния m_∞ , h_∞ и n_∞ , рассчитанные из эмпирических уравнений модели Ходжкина—Хаксли для мембран гигантского аксона кальмара при $6,3^\circ\text{C}$. Деполаризация мембран приводит к увеличению m_∞ и n_∞ и уменьшению h_∞ . Постоянные времена релаксации принимают максимальные значения в области потенциала покоя и становятся короче при любом сдвиге от потенциала покоя (по В. Hille, 1970).

§ 4. Токи ворот

Простейшая физическая интерпретация уравнений Ходжкина—Хаксли, описывающих зависимость проводимости возбудимых мембран от потенциала, предполагает наличие в мембране подвижных заряженных частиц m , n и h , которые перераспределяются в мембране под действием электрического поля и переводят канал в проводящее или непроводящее состояние.

Если в мембране действительно находятся заряженные частицы, способные перемещаться в электрическом поле, то, очевидно, можно зарегистрировать ток, обусловленный перемещением этих воротных частиц. Недавно удалось экспериментально обнаружить движение воротного заряда, или воротный ток. □

Суть эксперимента состоит в следующем. Если мембрана представляет собой идеальный диэлектрик, то при наложении ступенчатого импульса напряжения через нее в первые моменты времени протекает емкостный ток, или ток смещения,

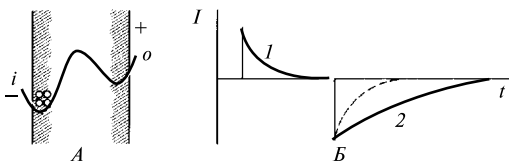


Рис. XXIII.13.

Асимметричный ток смещения в мембране, содержащей подвижные заряженные частицы.

A — асимметричное распределение частиц в мембране в исходном состоянии; *B* — кинетика емкостного тока при наложении гиперполяризующих (1) и деполяризующих (2) импульсов напряжения

Штриховая линия — изменения емкостного тока при отсутствии в мембране подвижных зарядов; *i*, *o* — внутренняя и наружная стороны мембраны

значение и кинетика которого не зависят от полярности приложенного импульса. Иная ситуация возникает в том случае, если в мембране содержатся заряженные частицы, способные перемещаться в электрическом поле, причем в исходном состоянии распределение подвижных частиц асимметрично. Предположим для определенности, что в исходном состоянии все воротные частицы находятся на левой (внутренней) стороне мембраны, имеющей более низкий потенциал (рис. XXIII.13). Если мембрану гиперполяризовать, наложив ступенчатый импульс напряжения той же полярности, что и существующий потенциал, то через нее потечет емкостный ток точно такой же, как и в отсутствие воротных частиц. Однако при наложении напряжения противоположной полярности помимо основного компонента емкостного тока возникает дополнительный ток, обусловленный смещением воротных частиц слева направо. Значение этого тока может оказаться весьма малым по сравнению с основным компонентом тока.

Комбинируя методы внутриклеточной перфузии, фиксации потенциала и синхронного накопления сигнала, К. Армстронг и Ф. Безанилла обнаружили на гигантском аксоне кальмара малый асимметричный ток смещения, связанный предположительно с активацией Na^+ -каналов.

Основная трудность регистрации воротных токов состоит в том, что необходимо исключить или свести к минимуму влияние ионных токов, обычного емкостного тока шумов. Для исключения ионного тока аксон кальмара перфузировали снаружи и изнутри растворами, содержащими непроницающие ионы, а также блокаторы ионных токов — тетродотоксин и тетраэтиламмоний. С помощью ЭВМ производили суммацию кривых тока, полученных в режиме фиксации потенциала в ответ на приложение к мембране одинакового числа равных по амплитуде гиперполяризующих и деполяризующих импульсов. Любопытным в результате этой операции емкостный ток является асимметричным и может быть воротным током. □

Воротный ток в сравнении с током Na^+ показан на рис. XXIII.14. В приведенном опыте 95% Na^+ в наружном растворе заменены на ионы триса. Из рис. XXIII.14 видно, что Na^+ -току, значение которого в этих условиях значительно меньше, чем обычно, предшествует кратковременный выходящий ток (воротный ток). Если из

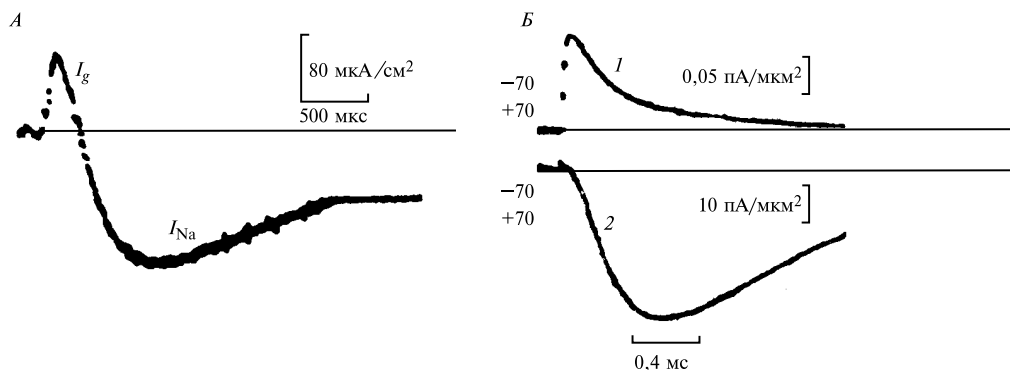


Рис. XXIII.14.

Воротный ток I_g и натриевый ток I_{Na} в аксоне кальмара (по С. М. Armstrong, 1975):

А — 95% Na^+ заменено на ионы триса;

Б — воротный ток в условиях полной замены Na^+ на трис (1), Na^+ -ток, записанный на том же аксоне в обычных условиях в морской воде (2)

раствора удалены все ионы Na , то становится заметным, что воротный ток медленно спадает после начального пика и в основном прекращается к моменту достижения пика Na -тока в обычном растворе (рис. XXIII.14, Б).

Характерной особенностью асимметричных токов смещения является их экспоненциальная зависимость от времени, что соответствует модели Ходжкина—Хаксли. Анализ характерного времени релаксации асимметричного тока в зависимости от потенциала показал, что это время примерно совпадает с временем $\tau_m(\varphi)$ в модели Ходжкина—Хаксли. Совпадение свидетельствует о связи асимметричных токов смещения с частицами, открывающими Na^+ -канал.

В дальнейшем были найдены дополнительные доводы в пользу прямой связи асимметричных токов смещения с движением воротных частиц.

1. Заряд, переносимый асимметричным током смещения при включении деполяризации, равен заряду, переносимому этим током при последующей реполяризации. Однако указанное равенство соблюдается лишь при коротких деполяризующих сдвигах. Если деполяризация длится относительно долго, то происходит так называемая иммобилизация воротных зарядов, в результате чего ток, текущий при реполяризации, становится меньше тока, переносимого при деполяризации.

2. Зависимость перенесенного заряда от потенциала качественно соответствует зависимости Na^+ -проводимости от потенциала (см. ниже).

3. Величина переносимого заряда практически не зависит от температуры, хотя кинетика тока смещения резко замедляется с понижением температуры. Температурный коэффициент Q_{10} для времени релаксации асимметричного тока смещения равен трем, что совпадает с величиной Q_{10} для τ_m .

4. Воротный ток и Na^+ -проводимость подавляются ионами Zn , введенными внутрь клетки, а также действием ультрафиолетового света с длиной волны 280 нм.

Важным подтверждением в пользу того, что асимметричный ток смещения связан с активацией входящего Na^+ -тока, явилось сравнение экспериментально измеряемой и теоретической зависимостей смещенного заряда от значения мембранного потенциала. Исходя из эксперимента, величину смещенного заряда можно найти, интегрируя воротный ток по времени:

$$Q = \int_0^{\infty} i(t) dt. \quad (\text{XXIII.4.2})$$

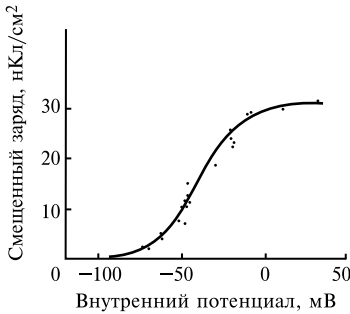


Рис. XXIII.15.

Зависимость смещенного заряда в мембране мышцы лягушки от приложенного потенциала (по W. Almers, 1978)

Пример такой зависимости приведен на рис. XXIII.15; здесь по оси ординат отложена величина смещенного заряда в нКл/см². Иногда измеряют зависимость от потенциала величины $\Theta = Q/Q_{\max}$, показывающей долю смещенных зарядов по отношению к максимально возможному перенесенному заряду.

Теоретическую зависимость Θ от значения мембранного потенциала можно получить, записывая условие равновесного распределения заряженных воротных частиц между двумя возможными состояниями. Распределение частиц при наличии на мембране разности потенциалов φ описывается уравнением Больцмана

$$1 - \Theta = \Theta \exp\left(-\frac{zF\varphi}{RT}\right), \quad (\text{XXIII.4.3})$$

где $(1 - \Theta)$ — заполнение левой потенциальной ямы, а Θ — заполнение правой ямы. Из (XXIII.4.3) следует, что количество частиц, перемещенных в мембране слева направо, равно

$$\Theta = \left[1 + \exp\left(-\frac{zF\varphi}{RT}\right)\right]^{-1}. \quad (\text{XXIII.4.4})$$

Эта же величина определяет и долю открытых каналов в зависимости от приложенного потенциала φ и валентности z переносимой частицы. На рис. XXIII.16 приведена кривые $\Theta(\varphi)$ разных значениях z .

Совпадение теоретической (рис. XXIII.16) и экспериментальной (рис. XXIII.15) кривых такого рода зависимостей для i_K и i_{Na} наблюдается при значениях $z = 4, 5$ для g_K и $z = 6$ для g_{Na} . Отсюда следует, что открывание Na-канала происходит при перемещении воротного заряда, эквивалентного 6 элементарным зарядам. Зная величину смещенного заряда Θ_g в единицах элементарного заряда e , можно, разделив ее на $z = 6$, найти и плотность Na-каналов.

Для Na-каналов величина Θ_g колеблется в разных объектах в широких пределах от $260 e/\mu\text{км}^2$ (сердечная мышца крысы) до $1500\text{--}2200 e/\mu\text{км}^2$ (гигантский аксон), а плотность Na-каналов соответственно меняется от 40 до $250\text{--}350 \mu\text{км}^2$. Для K-каналов $\Theta_g \sim 500 e/\mu\text{км}^2$, а для Ca-канала $\Theta_g \sim 1500\text{--}2000 e/\mu\text{км}^2$.

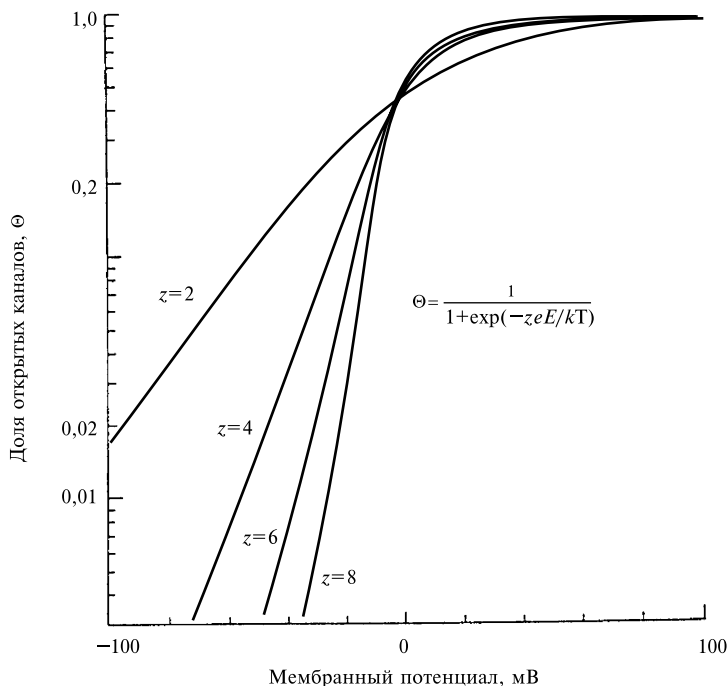


Рис. XXIII.16.

Больцмановское описание потенциалозависимости канала. При описании потенциалозависимости каналов, имеющих два (открытое и закрытое) состояния, предполагают, что открывание канала контролируется движением частиц с суммарным зарядом z между противоположными сторонами мембраны. Для частиц с более высоким зарядом z теоретическая зависимость вероятности открытого состояния характеризуется большей крутизной (по В. Hille, 1992).

Воротные токи в простейшей интерпретации рассматривают как следствие перескока m -частиц в процессе активации Na^+ -каналов мембраны. Однако перескок нескольких заряженных групп через всю толщу мембраны выглядит маловероятным. Скорее всего, токи смещения обусловлены относительно небольшими смещениями заряженных групп в воротном устройстве канала. Тем не менее если предположить, что m -частицы испытывают только небольшие смещения (порядка нескольких десятых нанометра), то окажется, что перепад энергии между двумя устойчивыми состояниями для воротных частиц крайне мал и составляет $\varphi z F \delta / h$, где h — толщина мембраны, δ — расстояние, на которое могут перемещаться воротные частицы. Однако в этом случае величина смещенного заряда, определяемая по формуле

$$\frac{Q}{Q_{\max}} = \left[1 + \exp \left(-\frac{z F \varphi \delta}{R T h} \right) \right]^{-1}, \quad (\text{XXIII.4.5})$$

становится слабо чувствительной к изменению мембранного потенциала, что противоречит регуляторной функции частиц. Это противоречие может указывать на то, что в действительности заряженные воротные группы обладают исключительно высокой величиной валентности. Другая возможность, устраняющая указанное противоречие, состоит в том, что мембрана в области локализации канала обладает настолько небольшой толщиной, что перепад потенциала φ/h в (XXIII.4.5) на единицу длины в этой области значительно выше, чем в области липидного бислоя.

Особенности воротных токов. Расшифровка полной макромолекулярной структуры дает возможность понять механизмы, лежащие в основе кинетических закономерностей открытия, закрытия и инактивации ионных каналов. Основная проблема здесь состоит в идентификации конкретных молекулярных групп, выполняющих роль воротных зарядов, которые соответственно изменяют свое состояние, перемещаясь под действием внешнего электрического поля. Мы уже видели роль зарядов в этих процессах в канале (гл. XXI, § 7). Отметим, что цикл открытие–закрытие не связан с разрывом или образованием каких-либо ковалентных химических связей, а по-видимому включает каскад конформационных изменений белка канала. Пороговый характер и высокая скорость открытия отдельных закрытых каналов указывает также на согласованный кооперативный характер этих процессов.

Сложная кинетика ионных токов, изменение чувствительности каналов к различным химическим веществам в процессе их работы указывают на роль переходов между отдельными конформационными состояниями белка, по своим общим масштабам явно превышающие перемещение отдельных гипотетических атомов (воротных зарядов).

Сопоставим такой «конформационный» подход и формальную модель Ходжкина—Хаксли (гл. XXIII, § 3). Процесс открытие–закрытие канала можно описать в виде диаграммы переходов между его состояниями (ср. гл. III, § 4). Например, мы можем рассматривать К-канал, где, как известно, имеются 4 открывающие n -частицы, как структуру, которая включает соответственно четверо n -ворот. Каждые из этих ворот могут быть либо в открытом (1), либо в закрытом (0) состояниях. Из общего числа 16 различных состояний канала (0, 0, 0, 0), (1, 0, 0, 0), (0, 1, 0, 0) ... (1, 1, 0, 0), (1, 0, 1, 0) ... (1, 1, 1, 0), (1, 1, 0, 1) ... открытому будет соответствовать только одно состояние (1, 1, 1, 1), а все остальные являются закрытыми. Точно так

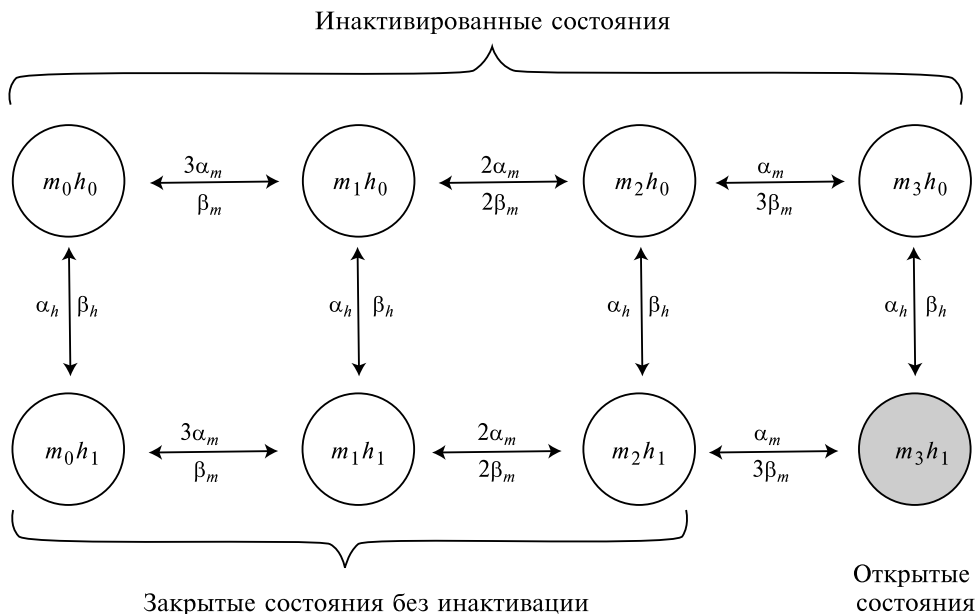


Рис. XXIII.17.

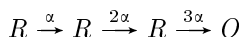
Кинетическое состояние Na-канала по Ходжкину—Хаксли (по В. Hille, 1978)

Существуют восемь основных состояний воротной системы. Только в состоянии m_3h_1 все ворота открыты и канал может пропускать ионы.

же в Na-канале диаграмма из восьми состояний (рис. XXIII.17) включает только одно открытое состояние m_3h_1 , где присутствуют все 3 активирующие m -частицы, и отсутствует h_1 инактивирующая h -частица.

Закрытому состоянию канала соответствует не одно, а несколько (семь) состояний, в свою очередь связанных друг с другом переходами. Закрытые состояния m_0h_1 , m_1h_1 , m_2h_1 не имеют инактивирующей h -частицы, а инактивированные состояния m_0h_0 , m_1h_0 , m_2h_0 , m_3h_0 наоборот, ее содержат.

Формально такого рода диаграммы переходов между состояниями канала соответствуют как модели Ходжкина—Хаксли, так и представлениям о конформационных перестройках в канале. Однако принципиальным отличием является взаимное влияние (кооперативная связь) таких состояний в конформационном описании в отличие от уравнений Ходжкина—Хаксли, где эти состояния предполагаются полностью независимыми. Можно предложить эквивалентную схему, включающую три закрытых состояния R и одно открытое O ,



с положительной кооперативной взаимосвязью между ними, при которой обеспечивается переход между состояниями R по мере приближения к открытому состоянию ($\alpha \rightarrow 2\alpha \rightarrow 3\alpha$). Действительно, экспериментальные данные подтвердили вывод о

кооперативном характере переходов и, в частности, показали, что инактивация закрытых состояний зависит от количества уже имеющихся m -частиц (m_1, m_2), т. е. от глубины прошедшей конформационной перестройки в процессе активации канала. На это же указывает и многокомпонентный характер кинетики и задержка начала инактивации Na-канала, которые зависят от степени и времени существования предшествующего активированного состояния. По-видимому, инактивация канала связана с иммобилизацией около 70% воротного заряда в процессе активации. В результате этого воротный ток, возникающий в ответ на прекращение деполяризующего импульса, намного меньше, чем при активации канала. А следовательно, состояние активации не является быстро обратимым состоянием, поскольку воротный заряд остается в «активированном» положении некоторое время после прекращения возбуждения.

В K-канале (Shaker) также возможно существование трех состояний



закрытое R , открытое O и инактивированное I .

Увеличение отрицательного мембранного потенциала на внутренней стороне мембраны стабилизирует R -состояние, не влияя на остальные состояния O и I . При наложении положительного потенциала канал открывается $R \rightarrow O$, а затем инактивируется. Время открытия канала $\tau_{R \rightarrow O}$ сильно зависит от величина положительного возбуждающего импульса и варьирует от нескольких миллисекунд

(+0,1 мВ) до долей миллисекунды при +50 мВ. Сильная зависимость величины $\tau_{R \rightarrow O}$ от потенциала говорит о том, что движение зарядов на белке канала сопряжено с конформационными перестройками, ведущими к открытию канала. Состояние инактивации определяется участком полипептидной цепи в NH_2 -терминальной области (рис. XXI.14). Удаление этого участка приводит к тому, что после открытия канала состояние инактивации вообще не наступает. По-видимому роль воротного заряда, ответственного за инактивацию канала, выполняет NH_3 -терминальная группа (рис. XXIII.18), которая попадает в пору между S_5 и S_6 сегментами после открытия (активации канала).

Все это указывает на ограниченность формальной модели, где открытие-закрытие канала связывается с перемещением независимых друг от друга управляющих частиц. По-видимому,

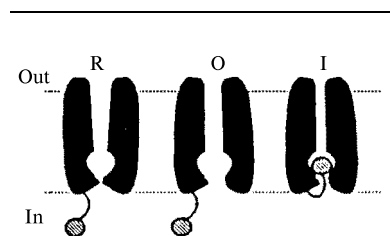


Рис. XXIII.18.

Активация и инактивация единичного шейкер-канала. Инактивационная модель — «мяч на цепи». Канал имеет три состояния: R — покой, O — открытое и I — инактивированное (по С. Miller, 1991).

понимание механизма работы канала лежит на пути расшифровки конформационных перестроек белка, индуцированных деполяризующим импульсом. Можно провести аналогию с функционированием фермента, где каскад электронно-конформационных перестроек индуцируется изменением электронного состояния активного центра вследствие прихода в него молекулы субстрата (гл. XIV). С

этой точки зрения подобную роль играют локальные изменения состояния сенсора (рис. XXI.11) (сегмент S_4 , рис. XXI.14), вызывающие конформационные перестройки белка, которые и лежат в основе воротного механизма. Наблюдаемые в экспериментах сложные зависимости параметров (проводимость, времена активации и инактивации, вольт-амперные характеристики) могут отражать особенности конформационных перестроек в сложной структуре канала, в ходе которых изменяется положение многих, в том числе заряженных, белковых групп. Аллостерический («тело» канала) и конкурентный (вход в канал) характер действия различных ингибиторов соответствует этой картине.

§ 5. Дипольная модель канала

Природа, воротных токов может состоять в том, что асимметричный ток смещения обусловлен не перемещением заряженных групп через мембрану, а кооперативным изменением ориентации диполей, выстилающих внутреннюю полость канала. Прохождение иона через канал зависит от его взаимодействия с дипольными группировками, которое определяет электростатическую энергию иона (см. § 5 гл. XX). Переориентация диполей может существенно изменить энергию взаимодействия иона с окружением в канале и тем самым вероятность попадания иона в канал. Кроме того, изменение ориентации диполей может сопровождаться конформационной перестройкой, изменяющей геометрию канала, что может также сказаться на концентрации ионов в канале и их подвижности, т. е. на пропускной способности канала.

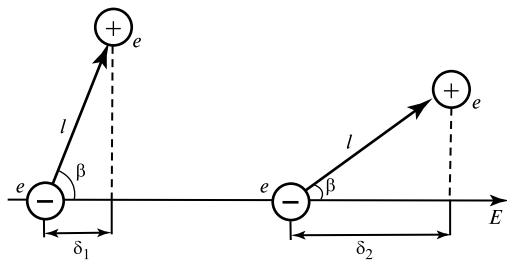


Рис. XXIII.19.

Диполь в электрическом поле

Равные по величине и противоположные по знаку электрические заряды $+e$ и $-e$ расположены на расстоянии l друг от друга. Электрический момент диполя представляет собой вектор с модулем el . Проекция дипольного момента на вектор напряженности поля равна $El \cos \beta = e\delta$. Энергия W диполя в электрическом поле равна произведению

проекции дипольного момента на напряженность поля E : $W = -e\delta E = -e\delta\varphi/h$, где φ — разность электрических потенциалов на мембране, имеющей толщину h . Знак минус показывает, что устойчивым положением диполя является расположение его вектора по направлению электрического поля. Изменение энергии при повороте одиночного диполя в электрическом поле составляет $\Delta W = (e\varphi/h)(\delta_2 - \delta_1) = -\varepsilon\varphi$, где $\varepsilon = e(\delta_2 - \delta_1)/h$.

Известны свойства одиночного жесткого диполя, находящегося во внешнем электрическом поле (рис. XXIII.19).

Рассмотрим систему взаимодействующих диполей канала, каждый из которых может находиться в двух ориентациях, отличающихся по проекции дипольного момента на ось канала (рис. XXIII.20). Энергия диполя в рассматриваемой системе складывается из нескольких компонентов: стандартной химической энергии U_0 , энергии взаимодействия диполя с внешним электрическим полем (см. рис. XXIII.19)

и энергии взаимодействия диполя с другими диполями системы. Если липопротеиновый комплекс, содержащий рассматриваемую систему диполей, является достаточно жестким, то процесс переориентации отдельных диполей будет кооперативным. Это означает, что энергия, необходимая для переориентации каждого элементарного диполя в системе, зависит не только от его собственной энергии, но и от доли диполей, уже изменивших свою ориентацию. Тогда изменение энергии элементарного диполя при его переориентации будет зависеть от доли переориентированных диполей Θ и составлять величину $-\Theta(W_2 - W_1) = \Theta W$, где W_1 и W_2 — параметры взаимодействия диполя в двух его ориентациях с системой окружающих диполей.

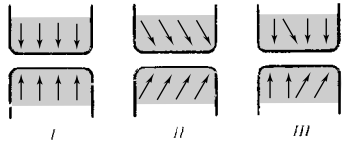


Рис. XXIII.20.

Дипольная модель регуляции проводимости ионного канала:

I, II — все диполи, выстилающие внутреннюю полость канала, занимают одну из возможных ориентации; *III* — смешанное состояние

Если стандартные свободные энергии диполя для обеих ориентации одинаковы, то разность энергетических уровней между двумя состояниями, складывающаяся из изменения энергии взаимодействий с внешним полем $\epsilon\varphi$ (см. рис. XXIII.19) и другими диполями системы, составит $-\epsilon\varphi - \Theta W$. В условиях равновесия доли диполей, находящихся в переориентированном состоянии Θ и в исходном состоянии $(1 - \Theta)$, связаны между собой соотношением Больцмана. Отсюда следует, что отношение заселенностей энергетических уровней двух ориентаций Θ и $(1 - \Theta)$ экспоненциально зависит от разности энергий между этими уровнями $-\epsilon\varphi - \Theta W$:

$$\frac{\Theta}{1 - \Theta} = k_0 \exp\left(\frac{\epsilon\varphi + \Theta W}{k_B T}\right), \quad (\text{XXIII.5.1})$$

где k_0 — константа. Таким образом, доля диполей, находящихся в каждом из состояний, зависит от мембранного потенциала, и эта зависимость описывается соотношением

$$\frac{\Theta}{1 - \Theta} \exp(-\omega\Theta) = k_0 \exp(\epsilon_1\psi), \quad (\text{XXIII.5.2})$$

где $\omega = W/k_B T$ — параметр кооперативности, $\psi = e\varphi/k_B T$ — безразмерный потенциал, $\epsilon_1 = \epsilon/e$. Полученное уравнение при подборе параметров ω и ϵ_1 позволяет описать экспериментально наблюдаемую зависимость смещенного заряда от мембранного потенциала. Действительно, поворот диполя сопровождается некоторым эффективным смещением заряда вдоль оси канала, поэтому величина Θ , означающая долю диполей, которые находятся в одном из состояний, может рассматриваться как показатель перенесенного в мембране заряда. При $\omega = 3,5$ зависимость Θ от мембранного потенциала, рассчитанная по уравнению (XXIII.5.2), хорошо согласуется с экспериментом (см. рис. XXIII.16).

Рассмотренный электростатический механизм регуляции проводимости канала за счет поворота мембранных диполей может в принципе обеспечить наблюдаемую зависимость проводимости от потенциала. Однако в этом случае проводимость одиночного канала также должна непрерывно зависеть от поля, а не претерпевать скачкообразные переходы между открытым и закрытым состояниями

(см. § 8 гл. XXI). Вместе с тем, если поворот диполей в мембране сопровождается конформационным изменением канала, то скачкообразные изменения проводимости в одиночном канале также вполне возможны. □

Предполагают, что дипольный механизм регуляции лежит в основе потенциалазависимости проводимости БЛМ, модифицированных грамицидином А. Согласно предположению Д. Урри, существует равновесие между проводящей и непроводящей конформациями молекулы грамицидина, причем проводящая $\pi_{L,D}^6$ -спираль имеет больший дипольный момент (см. § 3 гл. XX). Различие дипольных моментов для двух конформаций, создаваемое одним витком спирали (шаг спирали 0,45 нм), составляет $15 \cdot 10^{-18}$ ед. СГСЭ · см, или 15D ($1D = \frac{1}{3} \cdot 10^{-29}$ Кл · м). Различие дипольных моментов для трансмембранной структуры длиной 3 нм, способной образовать ионный канал, составит $100 \cdot 10^{-18}$ ед. СГСЭ · см, или 100D. Разность энергии диполей, соответствующих двум конформациям, во внешнем электрическом поле рассчитывают по формуле (см. рис. XXIII.19):

$$\Delta W = \mu F E / e, \quad (\text{XXIII.5.3})$$

где μ — дипольный момент, e — заряд электрона $\approx 1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл, F — число Фарадея ($\approx 96\,500$ Кл/моль = $96,5$ кДж · В⁻¹ · моль⁻¹), E — напряженность электрического поля, В/см. При толщине мембраны 3 нм и разности потенциалов 0,1 В, $E = 0,1 / (3 \cdot 10^{-7})$ В/см, разность энергии ΔW в (XXIII.5.3) составляет 6,7 кДж/моль. Если предполагать, что в отсутствие электрического поля вероятности каждой из двух конформаций одинаковы, то при наложении на БЛМ разности потенциалов в 100 мВ соотношение числа непроводящих и проводящих структур изменится примерно на порядок в соответствии с формулой Больцмана $N_1/N_2 = \exp(-\Delta W/RT)$, где $RT \approx 2,5$ кДж/моль.

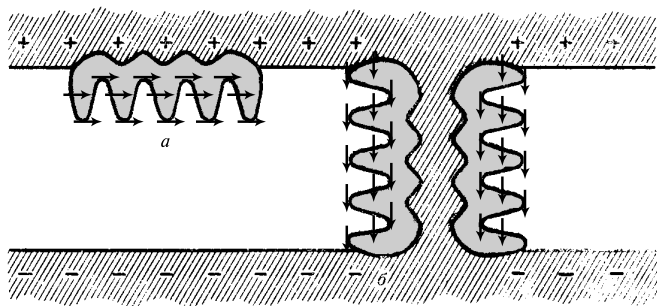


Рис. XXIII.21.

Модель формирования канала из параллельно соединенных субъединиц:

a и *b* — полипептидная цепь в разных ориентациях; стрелками показана ориентация диполей; под влиянием поля полипептидные цепи занимают преимущественно положение *b*

Согласно другой модели, молекулы грамицидина находятся в конфигурации α -спирали и могут располагаться на поверхности мембраны или поперек нее (рис. XXIII.21). Погружению мономеров в толщу мембраны препятствуют полярные группы, которые в случае конфигурации $\pi_{L,D}^6$ -спирали образуют внутримолекулярные водородные связи между отдельными витками. Однако внешнее электрическое поле, взаимодействующее с дипольным моментом α -спирали полипептидной цепи, стремится ориентировать молекулы перпендикулярно плоскости

мембраны. Расчеты показывают, что разность энергий для двух ориентаций диполя мономерной формы грамицидина составляет примерно 4,2 кДж/моль. Выигрыш в энергии, создаваемый поворотом диполя в электрическом поле, недостаточен для того, чтобы «затащить» полярные группы мономера в мембрану. Однако если образуется тример или комплекс из шести мономеров, в котором параллельные цепи грамицидина связываются поперечными межцепочечными водородными связями и образуют структуры типа складчатого слоя (β -структуры), то разность электрической энергии таких диполей при различной ориентации во внешнем поле будет составлять 12,6 и 25,2 кДж/моль соответственно. Поскольку в таких комплексах большинство полярных групп объединено водородными связями и молекулы могут свободно погружаться в липидный бислой, электрическое поле оказывается эффективным регулятором ориентации комплексов. В случае формирования сквозной поры комплексом из шести мономеров наложение разности потенциалов в 0,1 В должно изменять соотношение молекул, ориентированных параллельно и перпендикулярно плоскости мембраны, в 10^3 раз.

§ 6. Физико-химические модели возбуждения. Осциллятор Теорелла

Среди различных моделей электрической возбудимости клеток особый интерес представляет предложенная в конце 50-х годов Т. Теореллом физико-химическая модельная система, названная мембранным осциллятором. Модель представляет собой две ячейки, заполненные электролитом разной концентрации и разделенные мембраной из пористого стекла с фиксированными отрицательными зарядами. При пропускании через мембрану тока в ячейках возникает отчетливый сдвиг уровней жидкости, т.е. создается перепад гидростатических давлений. Пока ток не превышает некоторого критического значения, разность потенциалов на мембране и перепад давлений остаются постоянными. Однако после превышения критического значения тока система переходит в автоколебательный режим, при котором разность потенциалов на мембране и разность давлений начинают совершать релаксационные колебания.

В основе работы мембранного осциллятора лежат электрокинетические явления (см. § 5 гл. XVIII). Суммарный поток жидкости по капиллярам пористой мембраны представляет собой разность электроосмотического потока (его направление совпадает с направлением электрического поля) и встречно направленного гидродинамического потока.

Если поток направлен так, что мембрана заполняется концентрированным раствором электролита, то сопротивление мембраны резко снижается, и наоборот, если мембрана заполняется малопроводящим разбавленным раствором, ее сопротивление возрастает. В зависимости от направления движения жидкости профиль концентрации внутри мембраны приобретает вогнутую или выпуклую форму, соответствующую низкой и высокой концентрации носителей заряда в мембране (рис. XXIII.22). С увеличением скорости течения профиль концентрации в мембране приближается к прямоугольному. При высоких скоростях течения сопротивление мембраны принимает одно из двух предельных значений в зависимости от направления потока раствора (рис. XXIII.23).

Скорость течения жидкости v через мембрану зависит от разности давлений p и разности потенциалов φ следующим образом:

$$v = \alpha p - \beta \varphi, \tag{XXIII.6.1}$$

где α и β — коэффициенты пропорциональности. Первый член описывает фильтрационное течение через пористую среду, второй — соответствует электроосмотическому потоку.

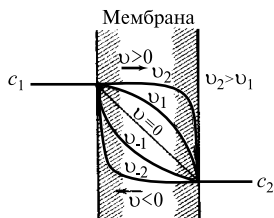


Рис. XXIII.22.

Распределение концентрации ионов внутри мембраны в зависимости от направления и скорости протекания жидкости:

c_1, c_2 — концентрации электролита в водных растворах, v — скорость движения иона через мембрану, v_1, v_2, v_{-1}, v_{-2} — скорости при разных значениях потоков

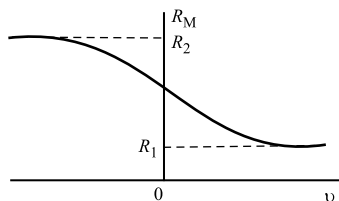


Рис. XXIII.23.

Зависимость сопротивления мембраны R_M от скорости потока жидкости v

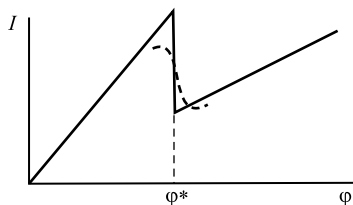


Рис. XXIII.24.

Вольтамперная характеристика мембранного осциллятора (по В. С. Маркину и др., 1981):

I — электрический ток, φ — потенциал, φ^* — критический потенциал, соответствующий нулевой скорости течения

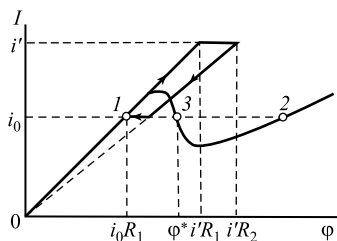
В теории мембранного осциллятора доказывается, что при достаточно высоких скоростях $|v| \gg D/h$ (D — коэффициент диффузии токопереносящих ионов внутри мембраны, h — толщина мембраны) большая часть мембраны заполнена электролитом одной и той же концентрации c_1 или c_2 зависимости от направления потока. Лишь при малых значениях скорости концентрация плавно изменяется от одного значения к другому. В связи с этим можно считать, что концентрация в мембране равна c_1 , если $v > 0$, и c_2 , если $v < 0$.

Отсюда следует, что вольтамперная характеристика мембраны состоит из двух линейных участков с резким переходом между ними (рис. XXIII.24). Наклоны участков определяются сопротивлением электролита в мембране при c_1 и c_2 , а переход между участками происходит при потенциале φ , соответствующем нулевой скорости течения. Реальная вольтамперная характеристика, полученная методом фик-

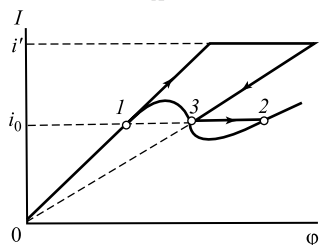
сацией потенциала (штриховая на том же рисунке), отличается лишь тем, что вместо резкого перехода имеется довольно крутой участок с отрицательным наклоном. □

Существование этого участка создает предпосылки для возникновения колебаний в системе. В некоторых пределах каждому значению тока соответствуют три значения потенциала. Промежуточное значение относится к неустойчивому состоянию, крайние — к устойчивому, т. е. такая система является триггерной (см. гл. II).

В том случае, когда в рассматриваемой модели перепад давлений поддерживается на постоянном уровне, с помощью импульсов тока можно переводить систему из одного устойчивого состояния в другое (рис. XXIII.25).



А



Б

Рис. XXIII.25.

Переход между двумя устойчивыми состояниями в модели Теорелла (по В. С. Маркину и др., 1981):

1, 2 — устойчивые состояния, 3 — неустойчивое. При возрастании тока i_0 до i' потенциал на мембране φ скачком возрастает от $i_0 R_1$ до $i' R_1$, где R_1 — сопротивление мембраны в состоянии 1. Увеличение потенциала приводит к уменьшению скорости движения раствора через мембрану в соответствии с формулой (XXIII.7.1); мембрана задоляется обедненным раствором, и ее сопротивление возрастает. По завершении импульса ток мгновенно уменьшается от i' до i_0 , одновременно происходит падение потенциала от $i' R_2$ до $i_0 R_2$. Здесь R_2 — максимальное значение сопротивления, достигнутое за время приложения импульса тока. Дальнейшее поведение потенциала на мембране зависит от соотношения $i_0 R_2$ и φ^* . Если $i_0 R_2 > \varphi^*$, потенциал продолжает расти и система переходит в состояние 2 (Б). Если же $i_0 R_2 < \varphi^*$, система возвращается в исходное состояние 1 (А).

В условиях, когда разность давлений не зафиксирована, изменения потенциала на мембране, вызываемые импульсами тока, имеют выраженное сходство с потенциалом действия в аксоне. Амплитуда потенциала в модельной системе составляет около 2 В, а продолжительность достигает нескольких минут. Как следует из уравнения (XXIII.6.1), изменение перепада на мембране не оказывает влияния на крутизну устойчивых участков вольтамперной кривой, а влияет только на значение потенциала φ^* , при котором происходит изменение направления движения жидкости, т. е. на положение вертикального участка вольтамперной характеристики. На рис. XXIII.26 приведены стационарные вольтамперные характеристики системы для разных перепадов давления.

Электрохимическая модель, предложенная Теореллом, способна воспроизводить многие свойства нервного волокна, включая проведение возбуждения.

§ 7. Математические модели возбудимых мембран

Математическая модель Ходжкина—Хаксли (см. §§ 2, 3 гл. XXIII) является одним из наиболее точных описаний процесса электрического возбуждения в мембране. Однако эта модель слишком сложна для качественного анализа.

Один из подходов к упрощению этой модели состоит в разделении быстрых и медленных переменных (см. § 3 гл. II). Действительно, переменная Na^+ -активации m изменяется на порядок быстрее, чем переменные n и h . Постоянная времени τ_m составляет $\sim 10^{-4}$ с, а τ_n и $\tau_h \sim 2 \cdot 10^{-3}$ с. Поэтому основное изменение параметров n и h происходит при установившемся значении m ($m = m_\infty$). □

Рассмотрим, как упрощаются уравнения Ходжкина—Хаксли при замене переменной m на ее стационарное значение m_∞ . Учтем также экспериментально установленный факт, что значения n и h связаны между собой соотношением

$$h + n = G = \text{const} \quad (\approx 0,85). \quad (\text{XXIII.7.1})$$

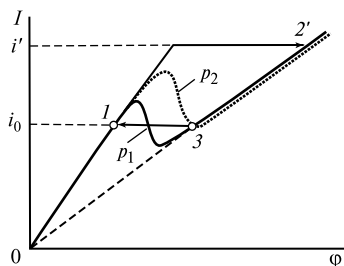


Рис. XXIII.26.

Вольтамперные характеристики мембранной системы при двух перепадах давления p_1 и p_2 на мембране (остальные обозначения те же, что на рис. XXIII.25) (по В. С. Маркину и др., 1981).

Предположим, что вначале система находится в стационарном состоянии 1, в котором поддерживаются ток i_0 и давление p_1 . Если подействовать на систему электрическим стимулом, изменив ток до значения i' , то система перейдет в новое устойчивое состояние 2 при давлении p_1 , поскольку на левой ветви нет стационарного состояния, отвечающего давлению p_1 и току i' . По окончании раздражения, когда ток возвращается от i' до i_0 , система перейдет в состояние 3. Если давление в системе не фиксировано, то оно постепенно изменяется, и соответственно меняется положение падающего участка вольтамперной кривой. Когда давление достигает значения p_2 , система не может более оставаться в состоянии, описываемом правой ветвью N-образной вольтамперной кривой, и переходит в первоначальное состояние

С учетом (XXIII.2.2), (XXIII.2.3), (XXIII.3.3) и (XXIII.3.8), полное уравнение Ходжкина—Хаксли записывается в виде

$$C d\varphi/dt = -[g_{Na}m^3h(\varphi - \varphi_{Na}) + g_Kn^4(\varphi - \varphi_K) + g_l(\varphi - \varphi_l)] + I_{o\text{бщ}}, \quad (\text{XXIII.7.2})$$

где m , n и h — функции потенциала и времени. Левая часть этого равенства представляет собой емкостный ток, а правая — разность между полным током $I_{o\text{бщ}}$, текущим во внешней цепи, и ионным током, складывающимся из трансмембранного тока Na^+ , K^+ и тока утечки $g_l(\varphi - \varphi_l)$.

Заменив переменную m на ее стационарное значение и выразив h через n из соотношения (XXIII.7.1), получим

$$C d\varphi/dt = -[g_{Na}m_\infty^3(G - n)(\varphi - \varphi_{Na}) + g_Kn^4(\varphi - \varphi_K) + g_l(\varphi - \varphi_l)] + I_{o\text{бщ}}. \quad (\text{XXIII.7.3})$$

Поведение переменной n во времени описывается экспонентой (см. §§ 3, 5 гл. XXIII).

$$dn/dt = (n_\infty - n)/\tau. \quad (\text{XXIII.7.4})$$

Полученная редуцированная система уравнений (XXIII.7.3) и (XXIII.7.4) содержит только две переменные (n и φ) вместо четырех в исходной системе

(XXIII.7.2). Числовые расчеты показали, что упрощенная система достаточно хорошо описывает форму потенциала действия; отмечается совпадение и других электрофизических характеристик редуцированной модели и полной модели Ходжкина—Хаксли (с точностью 10–15%). \square

Для оценки свойств решений упрощенной системы строят графики главных изоклин уравнений (XXIII.7.3) и (XXIII.7.4), т. е. изоклины $d\varphi/dt = 0$ и $dn/dt = 0$. Из уравнения (XXIII.7.4) следует, что изоклина $dn/dt = 0$ описывается соотношением

$$n = n_{\infty}, \quad (\text{XXIII.7.5})$$

где n_{∞} — функция потенциала φ (см. рис. XXIII.11).

Изоклину $d\varphi/dt = 0$ находят из уравнения (XXIII.7.3):

$$g_K n^4 (\varphi - \varphi_K) + g_{Na} m_{\infty}^3 (G - n) (\varphi - \varphi_{Na}) + g_l (\varphi - \varphi_l) - I_{\text{общ}} = 0. \quad (\text{XXIII.7.6})$$

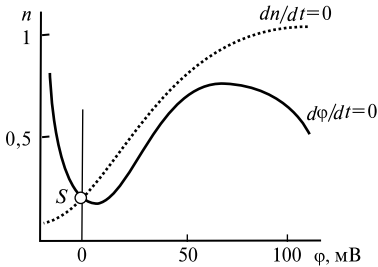


Рис. XXIII.27.

Главные изоклины упрощенной модели Ходжкина—Хаксли (по Г. Р. Иваницкому и др., 1978):

S — стационарная точка лежит на левой ветви; устойчива; n — параметр активации K^+ -проводимости

Рассчитанные на ЭВМ нуль-изоклины приведены на рис. XXIII.27. Изоклина $d\varphi/dt = 0$ имеет N-образную форму, что обеспечивает генерацию импульса. Особая точка расположена на левой ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$ и устойчива. Это соответствует отсутствию спонтанной активности в исходных уравнениях Ходжкина—Хаксли.

Изоклины $dn/dt = 0$ и $d\varphi/dt = 0$ представляют собой фазовый портрет редуцированной математической модели. На основе фазовых портретов упрощенной модели Ходжкина—Хаксли удается объяснить самые различные электрофизиологические явления.

Спонтанная активность. Известно, что в клетках, не обладающих спонтанной активностью, последняя может быть вызвана увеличением Na^+ - или уменьшением K^+ -проводимости. Однако при этом рассматриваемая модель позволяет определить, когда в системе реализуются автоколебания.

Спонтанная активность в модели возникает, когда система теряет устойчивость, в ней появляется предельный цикл и возникают автоколебания (см. § 2 гл. II). Особые точки, расположенные на средней ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$, неустойчивы, а расположенные на левой или правой ветви — устойчивы, причем одна из переменных (φ) оказывается более быстрой, чем n ($\tau_{\varphi}/\tau_n \sim 10^{-1}$).

Изоклины системы при параметрах, соответствующих мембране аксона, показаны на рис. XXIII.27. Особая точка устойчива (расположена на левой ветви), и мембрана не обладает спонтанной активностью. Уровень потенциала покоя принят условно за нуль. При изменении параметров изоклины деформируются. Если при этом особая точка станет неустойчивой (сместится с левой ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$ на среднюю), то возникнет спонтанная активность (рис. XXIII.28, I). Если

устойчивая точка перемещается на правую ветвь изоклины $d\varphi/dt = 0$, то возникает устойчивая деполяризация мембраны (рис. XXIII.28, II).

Так, в гигантском аксоне кальмара автоколебания в мембранах могут возникать под действием внешнего тока. Рассматривая семейство главных изоклин, рассчитанных для разных значений тока, можно определить, в каких условиях (т. е. при каких значениях токов) возникают повторные потенциалы действия. Внешний ток входит только в выражение для изоклины $d\varphi/dt = 0$ и поэтому при увеличении тока изменяется лишь ее характер (рис. XXIII.29). Повторные ответы возникают, когда особая точка, смещаясь с левой ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$ на среднюю, становится неустойчивой. При дальнейшем увеличении тока особая точка смещается со средней ветви на правую и вновь становится устойчивой. Повторные ответы прекращаются, и возникает устойчивая деполяризация под током.

Скачкообразная деполяризация. При плавном повышении концентрации KCl во внешней среде потенциал покоя возбудимых мембран может изменяться скачком.

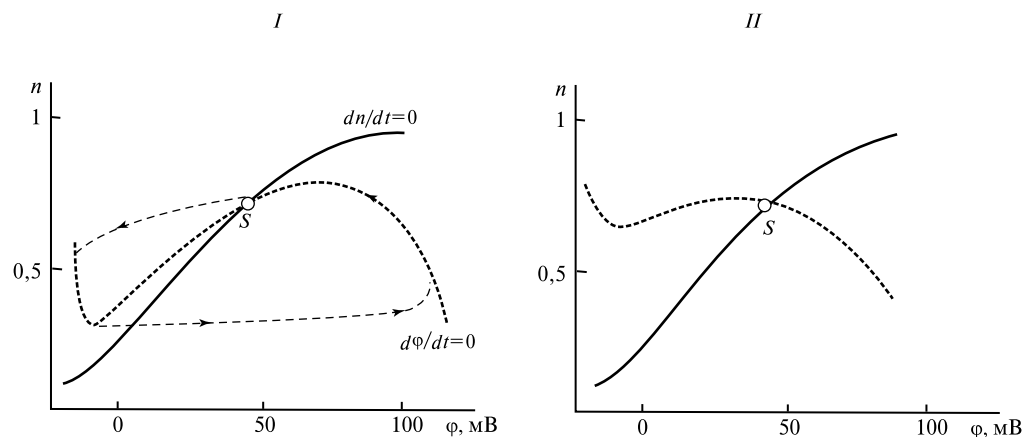


Рис. XXIII.28.

Главные изоклины, соответствующие различным состояниям мембраны:

I — спонтанная активность (особая точка S неустойчива, лежит на средней ветви); пунктиром показана проекция предельного цикла системы на плоскость;

II — устойчивая деполяризация мембраны (особая точка S устойчива, расположена на правой ветви); n — параметр активации K^+ -проводимости (по Г. Р. Иваницкому и др., 1978)

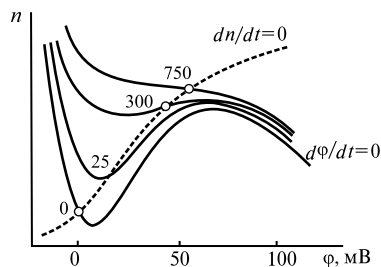


Рис. XXIII.29.

Главные изоклины упрощенной модели Ходжкина—Хаксли при изменениях внешнего тока (цифрами на кривых показаны значения тока в $\mu A/cm^2$, остальные обозначения те же, что на рис. XXIII.28) (по Г. Р. Иваницкому и др., 1978)

Долгое время считали, что классическая теория Ходжкина—Хаксли не объясняет скачкообразную деполяризацию (И. Тасаки). Однако фазовый портрет редуцированной системы позволяет подобрать параметры, при которых этот эффект воспроизводится и на полной модели Ходжкина—Хаксли. Для наблюдения скачкообразной деполяризации необходимо, чтобы при изменении параметра φ_K в уравнении (XXIII.7.6) особая точка, определяющая потенциал покоя, скачком переходила с левой ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$ на правую, минуя неустойчивую ветвь (рис. XXIII.30).

Триггерные свойства мембраны. Аксон кальмара при некоторых экспериментальных условиях, например, при внутриклеточной перфузии раствором CsF, может вести себя как триггер с двумя устойчивыми состояниями: раздражение током, направленным попеременно наружу и внутрь, приводит к перебору потенциала из одного устойчивого состояния в другое (рис. XXIII.31). Однако и здесь можно найти параметры в редуцированной модели, при которых этот необычный эффект воспроизводится в модели Ходжкина—Хаксли. Как видно из рис. XXIII.31, для

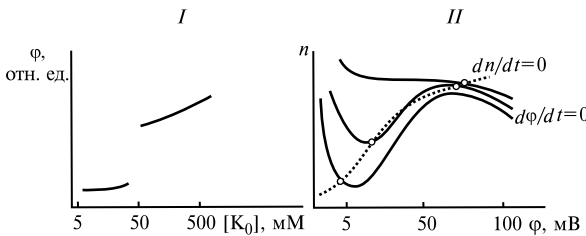


Рис. XXIII.30.

Скачкообразная деполяризация в модели при увеличении внеклеточной концентрации K^+ (по Г. Р. Иваницкому и др., 1978):

I — зависимость потенциала покоя; *II* — нуль-изоклины; точки пересечения соответствуют стационарным состояниям; обозначения те же, что на рис. XXIII.28

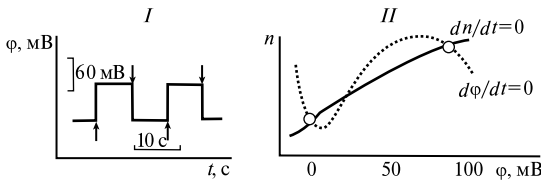


Рис. XXIII.31.

Триггерные свойства в упрощенной модели Ходжкина—Хаксли (по Г. Р. Иваницкому и др., 1978):

I — изменения потенциала, вызванные кратковременными толчками тока (показаны стрелками); *II* — главные изоклины при тех же значениях параметров; точками обозначены два устойчивых стационарных состояния

возникновения триггерных свойств необходимо существование двух устойчивых состояний: нормально поляризованного и деполяризованного. Толчки тока противоположной полярности вызывают в этом случае переходы из одного стабильного состояния в другое.

Таким образом, с помощью качественных методов удается определить основные характеристики математических моделей мембраны и проанализировать их поведение при различных изменениях параметров.

§ 8. Распространение импульса

Важнейшим свойством нервного импульса является его способность распространяться вдоль волокна без затухания с постоянной скоростью. Распространение возбуждения связано с протеканием локальных токов между покоящимися и активными (возбужденные) участками (рис. XXIII.32). Для простоты рассуждений примем, что внешняя поверхность аксона эквипотенциальна, т. е. внешняя среда хорошо проводит электрический ток. В области возникновения потенциала действия внутренняя часть волокна заряжена положительно, а в соседних невозбужденных участках — отрицательно. В результате возникает локальный ток между возбужденным и покоящимся участками нерва, который деполяризует мембрану непосредственно перед активным участком. При достижении критической деполяризации эта область также возбуждается. Подобным образом возбуждение передается дальше. Одностороннее проведение импульса по нервному волокну связано с тем, что участки, в которых потенциал действия завершен, теряют на некоторое время способность к возбуждению (рефрактерность). □

В волокнах позвоночных большая часть поверхности покрыта миелином, который действует как изолятор, поэтому локальный ток проходит между перехватами Ранвье (рис. XXIII.32, II). В результате возбуждение передается скачками от одного перехвата Ранвье к другому, причем с большей скоростью и с меньшими затра-

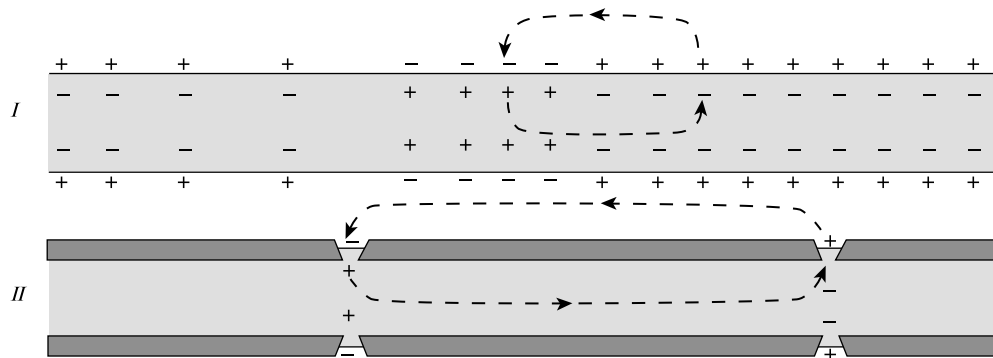


Рис. XXIII.32.

Иллюстрация теории локальных токов (по А. Л. Hodgkin, 1964):

I — немиелинизированное нервное волокно, II — миелинизированное нервное волокно

тами энергии, чем в немиелинизированных волокнах сравнимого диаметра. Малые энергетические потери объясняются тем, что электрическая емкость миелиновой оболочки очень мала и на ее зарядку требуется значительно меньше энергии, чем на зарядку мембраны аксона беспозвоночных, имеющей высокую электрическую емкость. В дальнейшем будет рассмотрен лишь процесс передачи импульсов по немиелинизированным (безмякотные) волокнам.

Волокна, по которым распространяется нервный импульс, обычно сравнивают с кабелем, имеющим несовершенные электрические свойства, (низкая электропро-

водность аксоплазмы, недостаточные изолирующие свойства мембраны, большая мембранная емкость). Эквивалентная электрическая схема аксона, отражающая его кабельные свойства волокон, представлена на рис. XXIII.33. В случае аксона, погруженного в большой объем проводящей среды, наружным сопротивлением можно пренебречь и наружный потенциал считать постоянным. Внутреннее сопротивление на единицу длины обозначим r_i (Ом/см), а сопротивление мембраны на единицу длины — r_m (Ом·см). Пусть в одной точке аксона приложена разность потенциалов φ_0 по отношению к уровню потенциала покоя. Распределение потенциала вдоль аксона в условиях, когда мембрана не возбуждена, определяется силой продольного тока в аксоплазме. Согласно закону Ома, продольный ток i_l пропорционален проводимости участка аксоплазмы и падению напряжения на данном участке:

$$i_l = -\frac{1}{r_i} \frac{d\varphi}{dx}. \quad (\text{XXIII.8.1})$$

С увеличением расстояния x продольный ток уменьшается из-за утечки в наружную среду; эта часть составляет мембранный ток. Так как ток через мембрану i_m равен убыли продольного тока на участке dx , можно записать

$$i_m = -\frac{di_l}{dx} = \frac{1}{r_i} \frac{d^2\varphi}{dx^2}. \quad (\text{XXIII.8.2})$$

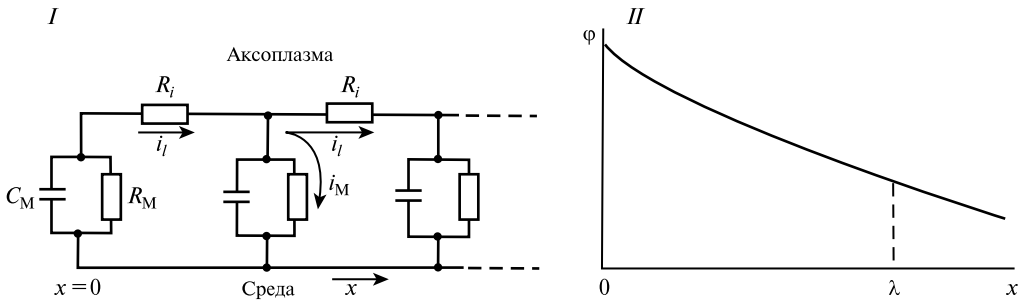


Рис. XXIII.33.

Эквивалентная электрическая схема волокна, отражающая его кабельные свойства (I) и распределение потенциала по длине волокна x при «инъекции» тока в точке $x = 0$ (II):

λ — постоянная длины волокна, C_m — емкость мембраны, R_m — сопротивление мембраны, R_i — сопротивление аксоплазмы, i_l — продольный ток, i_m — мембранный ток

С другой стороны, по закону Ома мембранный ток равен $i_m = \varphi/r_m$, где φ — разность потенциалов на удалении x от точки приложения потенциала φ_0 . В итоге получим

$$\frac{r_m}{r_i} \frac{d^2\varphi}{dx^2} = \varphi, \quad (\text{XXIII.8.3})$$

или $\lambda^2 \frac{d^2\varphi}{dx^2} = \varphi$, где $\lambda^2 = r_m/r_i$.

Решение уравнения (XXIII.8.3) имеет вид

$$\varphi = \varphi_0 \exp(-x/\lambda). \quad (\text{XXIII.8.4})$$

Сигнал экспоненциально затухает с увеличением расстояния, ослабляясь до φ_0/e при $x = \lambda$. Величина $\lambda = \sqrt{r_m/r_i}$ называется постоянной длины волокна. Зависимость r_m и r_i от удельных сопротивлений 1 см^2 мембраны R_m и 1 см^3 аксоплазмы R_i выражается следующим образом:

$$r_m = \frac{R_m}{\pi D}; \quad r_i = \frac{4R_i}{\pi D^2}, \quad (\text{XXIII.8.5})$$

где D — диаметр волокна. Следовательно, константа длины пассивного волокна равна $(DR_m/4R_i)^{1/2}$, т. е. пропорциональна корню квадратному из толщины волокна. У безмякотного аксона диаметром 30 мкм с $R_m = 5 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$ и $R_i = 50 \text{ Ом} \cdot \text{см}^3$ константа длины равна $2,7 \text{ мм}$. У клеток харовых водорослей, достигающих в диаметре 1 мм , при сопротивлении $R_m = 10 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$ постоянная длины составляет несколько сантиметров. При возбуждении R_m резко снижается, и соответственно уменьшается константа длины.

Хотя кабельные свойства аксона несовершенны, непрерывная кабельная связь между соседними участками волокна — необходимый фактор в процессе передачи электрических изменений от одной точки к другой. Отсутствие затухания при распространении импульса объясняется тем, что аксон не обычная кабель: вдоль его волокна в мембране размещены молекулярные «генераторы», подпитывающие бегущий импульс. \square

Распределение мембранного потенциала по волокну $\varphi(x, t)$ в общем случае определяется кабельным уравнением, которое вытекает из условия равенства полного тока через мембрану i_m [см. (XXIII.8.2)] сумме емкостного и ионного токов [см. (XXIII. 2.2)]:

$$\frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = I + C \frac{\partial \varphi}{\partial t}, \quad (\text{XXIII.8.6})$$

где C — емкость мембраны, приходящаяся на единицу длины волокна, r_i — сопротивление аксоплазмы на единицу длины, I — ионный ток, протекающий через мембрану; значение потенциала φ отсчитывается от уровня потенциала покоя. Ток I складывается из парциальных ионных токов: натриевого, калиевого и тока утечки (см. § 2 гл. XXIII). Динамика изменения каждого из парциальных токов описывается эмпирическим уравнением Ходжкина—Хаксли.

Таким образом, задача об отыскании скорости распространения импульса и его формы сводится к решению уравнения (XXIII.8.6) в системе с уравнениями Ходжкина—Хаксли. В результате числовых решений с помощью ЭВМ удается рассчитывать форму и скорость распространения потенциала действия (рис. XXIII.34).

Задача о распространении нервного возбуждения по волокну существенно упрощается, если ионный ток, входящий в соотношение (XXIII.8.6), описывать не системой уравнений Ходжкина—Хаксли, а аппроксимировать его двумя ступенями разной направленности. Иными словами, предполагают, что в некоторый момент,

соответствующий началу возбуждения, включается ток, направленный внутрь волокна и равный по модулю i_1 . Спустя время t_1 ток меняется на противоположный и равный i_2 . Эта фаза продолжается в течение времени t_2 (рис. XXIII.34, II). Физически это означает, что в мембране существует генератор тока, обладающий пороговыми свойствами. Дополнительное условие состоит в том, что заряд, протекающий при возбуждении в одном направлении, равен заряду, протекающему в другом направлении: $i_1 t_1 = i_2 t_2$. \square

Введение упрощающих допущений о постоянстве значения ионного тока на временных интервалах, соответствующих переносу ионов через Na^+ - и K^+ -каналы, позволяет найти решение уравнения (XXIII.8.6) в явном виде. Поскольку скорость бегущей волны первоначально неизвестна, для решения (XXIII.8.6) удобно ввести новую (так называемую автомодельную) переменную $\xi = x - vt$, где v — скорость

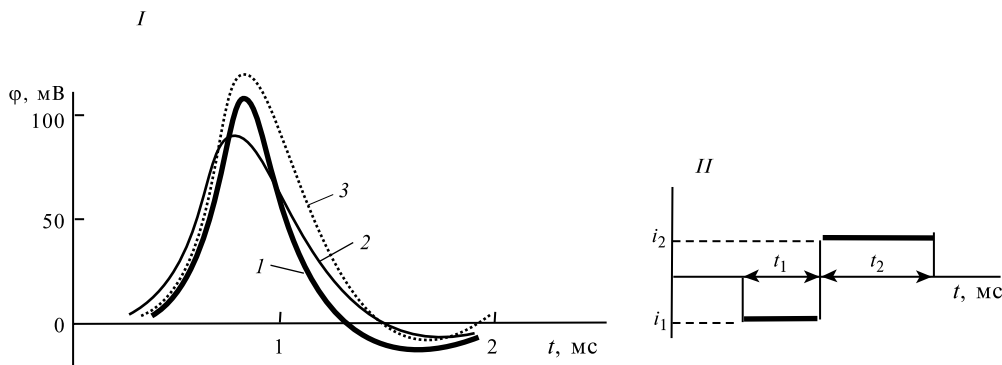


Рис. XXIII.34.

Распространяющийся импульс. I — форма импульса; II — аппроксимация ионного тока при возбуждении (импульс, направленный вниз, соответствует входящему Na^+ -току, импульс, направленный вверх, соответствует выходящему K^+ -току) (по В. С. Маркину и др., 1981):

1 — аксон кальмара при $18,5^\circ\text{C}$; 2 — числовое решение системы уравнений Ходжкина—Хаксли; 3 — форма импульса при аппроксимации ионного тока двумя ступенями; t_1, t_2 — продолжительность входящего и выходящего тока, i_1, i_2 — амплитуды входящего и выходящего тока

распространения импульса. Если перемещать точку наблюдения x по волокну со скоростью распространения импульса, то значение аргумента ξ и соответственно потенциала $\varphi(\xi)$ не меняется. Иначе говоря, в координатах (ξ, φ) распространяющийся импульс оказывается как бы остановленным (ср. § 4 гл. II).

После введения переменной ξ уравнение (XXIII.8.6) преобразуется к виду

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial \xi^2} + v r_i C \frac{\partial \varphi}{\partial \xi} - r_i i(\xi) = 0, \quad (\text{XXIII.8.7})$$

т. е. сводится к линейному уравнению второго порядка. Начало координат выбирают в той точке, где начинается возбуждение мембраны, т. е. $\varphi(0) = \varphi^*$, где φ^* —

пороговый потенциал. При подборе параметров $i_1 = 63$ мкА/см², $i_2 = 40$ мкА/см², $t_1 = 0,35$ мс и $t_2 = 0,55$ мс удается получить хорошее соответствие между расчетной формой импульса и формой потенциала действия, наблюдаемой в эксперименте (рис. XXIII.34, I). Решение показывает, что существует два допустимых значения скорости, каждому из которых соответствует бегущий импульс определенной формы, причем один оказывается устойчивым, а другой — неустойчивым.

Скорость устойчивого импульса описывается простой формулой, если пренебречь проводимостью мембраны в состоянии покоя:

$$v_1 = \left(\frac{i_1}{\varphi^* r_i C^2} \right)^{1/2}. \quad (\text{XXIII.8.8})$$

В выражение входят только параметры первой фазы тока возбуждения, т. е. скорость распространения определяется передним фронтом бегущего импульса.

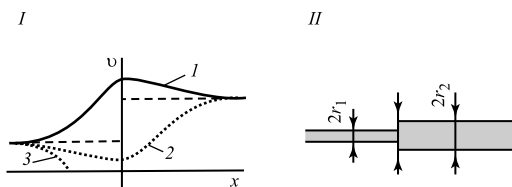


Рис. XXIII.35.

Прохождение импульса по расширенному волокну. I — изменение скорости импульса v в зависимости от его направления; II — схема расширяющегося волокна:

1, 2 — импульсы проходят, 3 — импульсы блокируются; штриховая линия показывает скорость распространения импульса вдали от места изменения диаметра волокна

Изучение зависимости скорости распространения импульса от диаметра нервного волокна в экспериментах на безмякотных волокнах показало, что скорость приблизительно пропорциональна квадратному корню из диаметра волокна. Такой же результат дает и приведенная формула. Для гигантского волокна кальмара получается скорость около 21 м/с. \square

На основе модели порогового мембранного генератора ионного тока можно изучать распространение импульсов по неоднородным и ветвящимся волокнам, а также рассмотреть взаимодействие импульсов в параллельных волокнах. Так, анализ прохождения импульса по расширяющемуся волокну (рис. XXIII.35) показывает, что по мере приближения к месту расширения скорость импульса уменьшается, а после расширения начинает расти, пока не достигнет нового стационарного значения, которое превышает первоначальное. Таким образом, переход к более высоким значениям скорости происходит не монотонно, а с периодом замедления, который тем больше, чем больше разница в сечениях волокна. При достаточно большом расширении импульс может остановиться совсем. Расчет, проделанный в описанной выше модели, показывает, что при критическом расширении волокна, которое уже не пропускает импульс, условие блокирования имеет вид

$$\left(\frac{r_2}{r_1} \right)^{3/2} > \chi + 1,11\chi^{1/2} - 1,69 = K(\chi), \quad (\text{XXIII.8.9})$$

где r_1 и r_2 — радиусы двух частей волокна, χ — фактор безопасности, равный отношению амплитуды потенциала действия к порогу возбуждения. Для гигантского аксона кальмара оценки показывают, что критическим является расширение, несколько больше четырехкратного.

При обратном движении импульса блокирования не происходит. Импульс всегда может перейти из широкого волокна в узкое. Но изменение скорости при неоднородности носит противоположный характер. При подходе к сужению скорость импульса увеличивается, а затем начинает спадать до нового стационарного значения. Таким образом, на графике скорости наблюдается своеобразная петля гистерезиса, происхождение которого физически вполне понятно. Расположенное впереди широкое волокно с большой емкостью представляет собой мощный сток для заряда, поэтому значение потенциала медленнее поднимается до порогового. Наоборот, в суженной части не может поглотиться большой заряд, и эта часть волокна представляет собой отражающий экран, вблизи которого потенциал увеличивается скорее, а следовательно, скорость распространения импульса увеличивается.

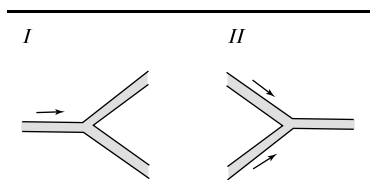


Рис. XXIII.36.

Прохождение импульсов через узел ветвления.

I — импульс подходит по одному волокну; II — импульс подходит сразу по двум волокнам

Другим видом неоднородности является ветвление волокон, где возможны различные способы прохождения и блокирования импульса. Если импульс подходит к узлу ветвления по одному волокну (рис. XXIII.36), то условие блокирования имеет вид

$$\frac{r_2^{3/2} + r_3^{3/2}}{r_1^{3/2}} > K(\chi). \quad (\text{XXIII.8.10})$$

Если импульсы подходят к узлу ветвления сразу по двум волокнам, то условие блокирования при синхронном движении импульсов имеет вид

$$\frac{r_3^{3/2}}{r_1^{3/2} + r_2^{3/2}} > K(\chi). \quad (\text{XXIII.8.11})$$

При разновременном подходе импульсов к узлу ветвления условие блокирования зависит от временного сдвига Θ между ними. Если временной сдвиг между импульсами мал, то импульсы «помогают» друг другу проникнуть в третье волокно. Однако если сдвиг достаточно велик, то импульсы начинают мешать друг другу, поскольку импульс, подошедший первым, но не сумевший возбудить третье волокно, частично переводит узел в рефракторное состояние.

В организме нервные волокна обычно объединены в пучки или нервные стволы, где каждое волокно представляет собой самостоятельную линию связи. Однако, когда по одному из волокон движется нервный импульс, он создает электрическое поле в окружающей межклеточной жидкости, которое может повлиять на мембранный потенциал соседних волокон. Действительно, при обработке нервных стволов специальными химическими веществами удается наблюдать не только взаимные помехи, но и передачу возбуждения между соседними волокнами.

Исследование одновременного прохождения импульсов по разным волокнам показало, что взаимодействие импульсов может приводить к их синхронизации. В результате при одновременном возбуждении волокон может возникнуть коллективный импульс. Однако синхронизоваться могут лишь импульсы, скорости которых отличаются не более чем на 10%, причем их взаимодействие очень сильно увеличивается с ростом сопротивления внешней среды. При возбуждении одного волокна в соседнем наводится знакопеременный мембранный потенциал: вначале волокно гиперполяризуется (пониженная возбудимость), затем деполяризуется (повышенная возбудимость) и наконец еще раз гиперполяризуется. Непосредственная передача возбуждения на соседнее волокно увеличивается при повышении его радиуса.

Для решения задачи об одновременном возбуждении двух соседних волокон необходимо искать автомодельное решение, когда два импульса движутся с одинаковой скоростью на постоянном расстоянии друг от друга. В этом случае существует два неизвестных параметра: скорость и расстояние между импульсами. Так как импульсы влияют друг на друга, то формально скорость каждого из них является функцией расстояния между ними.

Основные результаты, изложенные выше, были получены с помощью простой модели мембранного генератора тока. В таком подходе остается неясным, как влияет истинная динамика развития возбуждения на распространение импульса. Рассмотрим в связи с этим соотношение (XXIII.8.6), где ток I описывается уравнениями Ходжкина—Хаксли. Для вычисления скорости импульса можно учитывать лишь процессы, протекающие в области его фронта. Напомним, что переменные m , n и h характеризуются существенными различиями в скоростях их изменений, а именно

$$\tau_m \ll \tau_n \sim \tau_h, \quad (\text{XXIII.8.12})$$

где τ_n , τ_h , τ_m — характерные времена релаксации переменных: K^+ -проводимости, инактивации и активации Na^+ -проводимости, соответственно. Пользуясь указанной иерархией времен (XXIII.8.12) и учитывая лишь переменную m , можно упростить систему (XXIII.8.6) и уравнения Ходжкина—Хаксли до приближенной системы двух уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d\psi}{d\xi} &= \frac{1}{u^2} \frac{d^2\psi}{d\xi^2} + m^3, \quad -\infty < \xi < \infty; \\ \frac{dm}{d\xi} &= -\frac{1}{\tau(\psi)} [m - m_\infty(\psi)], \end{aligned} \quad (\text{XXIII.8.13})$$

где введены автомодельная координата $\xi = t + x/v$ и следующие обозначения: $u = v(RC^2\varphi^*/i)^{1/2}$, $\psi = \varphi/\varphi^*$. Здесь $\tau(\psi)$ и $m_\infty(\psi)$ — известные функции. В случае быстрой релаксации Na^+ -переменной m скорость распространения возбуждения имеет вид

$$u = 1, \quad \text{т. е.} \quad v = \left(\frac{i}{RC^2\varphi^*} \right)^{1/2} \quad \text{при} \quad \tau \rightarrow 0. \quad (\text{XXIII.8.14})$$

Этот результат совпадает с выражением (XXIII.8.8) для скорости распространения импульса в модели мембранного генератора, рассмотренной выше. Очевидно,

эта модель отвечает случаю быстрой релаксации Na^+ -тока. В другом предельном случае — медленной релаксации — получаем выражение

$$v \simeq 1,25 \left(\frac{i}{\tau^3 C^5 \varphi^* R^4} \right)^{1/8}. \quad (\text{XXIII.8.15})$$

Сопоставление с экспериментом показывает, что предельный случай медленной релаксации (XXIII.8.15) Na^+ -тока является наилучшим приближением для описания скорости распространения нервного импульса.