

α_h , β_h являются сложными, эмпирически подобранными функциями мембранного потенциала (ϕ_M), и так называемое кабельное уравнение, описывающее изменение трансмембранных тока вдоль аксона.

Ходжкин и Хаксли решили эту задачу и получили форму потенциала действия и скорость его распространения по аксону, которые совпадали с экспериментом с точностью до 10 %.

Таким образом, исходя из выбранных предположений и эмпирически подобранных констант, Ходжкин и Хаксли обосновали ионную теорию возбудимых мембран и смогли удовлетворительно описать в рамках этой теории изменение ионной проводимости и процесс генерации потенциала действия нервной клетки. Модель Ходжкина–Хаксли не объясняла природу активирующих и блокирующих частиц и механизм их влияния на проводимость ионного канала.

Физическая интерпретация модели Ходжкина–Хаксли требовала наличия внутри мембраны некоторых заряженных частиц, причем эти частицы должны передвигаться в зависимости от внешнего электрического поля. Таким образом, для подтверждения второго постулата модели необходимо было зарегистрировать перемещения заряженных частиц внутри мембраны при изменении мембранного потенциала, то есть зарегистрировать так называемые воротные токи. Трудность обнаружения воротных токов заключалась в том, что активирующих частиц внутри мембраны очень мало и, следовательно, мало значение воротного тока по сравнению с ионными токами, проходящими через мембрану.

Для обнаружения воротных токов с помощью блокаторов ТTX и ТЭА, а также заменой ионов Na^+ в наружном растворе на ионы триса, исключали ионные токи; затем ступеньками меняли напряжение на мемbrane и регистрировали появление воротного тока натриевого канала, который оказался в 10^3 раз слабее натриевого тока.

Изменение во времени воротного тока в аксоне кальмара было взаимосвязано с изменением натриевого тока. Таким образом на опыте было показано существование воротных токов, предсказанных в модели Ходжкина–Хаксли.

§ 14. Ионные каналы клеточных мембран

Модель возбудимой мембраны по теории Ходжкина–Хаксли предполагает регулируемый перенос ионов через мембрану. Однако непосредственный переход иона через липидный бислой

весьма затруднен. Поэтому величина коэффициента распределения К в формулах (2.7, а, б) очень мала, а следовательно, был бы мал и поток ионов, если бы ион переходил непосредственно через липидную фазу мембранны.

Действительно, для перехода из раствора с диэлектрической проницаемостью $\epsilon_p = 80$ в мембрану с $\epsilon_m \approx$ одного моля ионов необходимо преодолеть потенциальный барьер ΔW , высота которого по теории Борна определяется соотношением:

$$\Delta W = \frac{(Ze)^2 N_A}{4\pi\epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_{mp}} \right),$$

где e – заряд электрона, r – радиус иона. Для ионов Na^+ и K^+ величина ΔW составляет 350 – 400 кДж / моль. Для сравнения, энергия тепловых колебаний при температуре 300 К составляет всего $RT \approx 2,4$ кДж / моль.

Вероятность перехода иона из раствора в липидную фазу

$$P \sim e^{-\frac{\Delta W}{RT}}.$$

Для приведенных числовых значений ΔW можно оценить вероятность

$$P \sim e^{-\frac{-400}{2.5}} \approx e^{-160},$$

следовательно, в этом случае коэффициент распределения К в формулах (2.7, а, б) очень мал. Таким образом, непосредственный перенос ионов через липидный бислой только за счет диффузии маловероятен.

Это и ряд других соображений дали основание считать, что в мембране должны быть некоторые специальные структуры – проводящие ионы. Такие структуры были найдены и названы ионными каналами. Подобные каналы выделены из различных объектов: плазматической мембранны клеток, постсинаптической мембранны мышечных клеток и других объектов. Известны также ионные каналы, образованные антибиотиками.

Основные свойства ионных каналов:

- 1) селективность;
- 2) независимость работы отдельных каналов;
- 3) дискретный характер проводимости;
- 4) зависимость параметров каналов от мембранныго потенциала.

Рассмотрим их по порядку.

1. Селективностью называют способность ионных каналов избирательно пропускать ионы какого-либо одного типа.

Еще в первых опытах на аксоне кальмара было обнаружено, что ионы Na^+ и K^+ по-разному влияют на мембранный потенциал. Ионы K^+ меняют потенциал покоя, а ионы Na^+ – потенциал действия. В модели Ходжкина–Хаксли (см. § 13) это описывается путем введения независимых калиевых и натриевых ионных каналов. Предполагалось, что первые пропускают только ионы K^+ , а вторые – только ионы Na^+ .

Измерения показали, что ионные каналы обладают абсолютной селективностью по отношению к катионам (катион-селективные каналы) либо к анионам (анион-селективные каналы). В то же время через катион-селективные каналы способны проходить различные катионы различных химических элементов, но проводимость мембраны для неосновного иона, а значит, и ток через нее, будет существенно ниже, например, для Na^+ -канала калиевый ток через него будет в 20 раз меньше. Способность ионного канала пропускать различные ионы называется относительной селективностью и характеризуется рядом селективности – соотношением проводимостей канала для разных ионов, взятых при одной концентрации. При этом для основного иона селективность принимают за 1. Например, для Na^+ -канала этот ряд имеет вид:

$$\text{Na}^+ : \text{K}^+ = 1 : 0,05.$$

2. Независимость работы отдельных каналов. Прохождение тока через отдельный ионный канал не зависит от того, идет ли ток через другие каналы. Например, K^+ -каналы могут быть включены или выключены, но ток через Na^+ -каналы не меняется. Влияние каналов друг на друга происходит опосредованно: изменение проницаемостей каких-либо каналов (например, натриевых) меняет мембранный потенциал, а уже он влияет на проводимости прочих ионных каналов (см. § 13).

3. Дискретный характер проводимости ионных каналов. Ионные каналы представляют собой субъединичный комплекс белков, пронизывающий мембрану. В центре его существует трубка, сквозь которую могут проходить ионы. Количество ионных каналов на 1 мкм^2 поверхности мембраны определяли с помощью радиоактивнолеченного блокатора натриевых каналов – тетродотоксина. Известно, что одна молекула ТТХ связывается только с одним каналом. Тогда измерение радио-

активности образца с известной площадью позволило показать, что на 1 мкм² аксона кальмара находится около 500 натриевых каналов.

Те трансмембранные токи, которые измеряют в обычных экспериментах, например, на аксоне кальмара длиной 1 см и диаметром 1 мм, то есть площадью $3 \cdot 10^7$ мкм², обусловлены суммарным ответом (изменением проводимости) $500 \cdot 3 \cdot 10^7 \sim 10^{10}$ ионных каналов. Для такого ответа характерно плавное во времени изменение проводимости (рис. 3.6). Ответ одиночного ионного канала меняется во времени принципиально иным образом: дискретно и для Na⁺-каналов (см. рис. 4.5), и для K⁺- , и для Ca²⁺-каналов (см. описание ниже).

Впервые это было обнаружено в 1962 г. в исследованиях проводимости бислойных липидных мембран (БЛМ) при добавлении в раствор, омывающий мембрану, микролитических количеств некоторого вещества, индуцировавшего возбуждение. На БЛМ подавали постоянное напряжение и регистрировали ток I(t). Запись тока во времени имела вид скачков между двумя проводящими состояниями.

Одним из эффективных методов экспериментального исследования ионных каналов стал разработанный в 80-е годы метод локальной фиксации потенциала мембранны ("Patch Clamp"), (рис. 4.4).

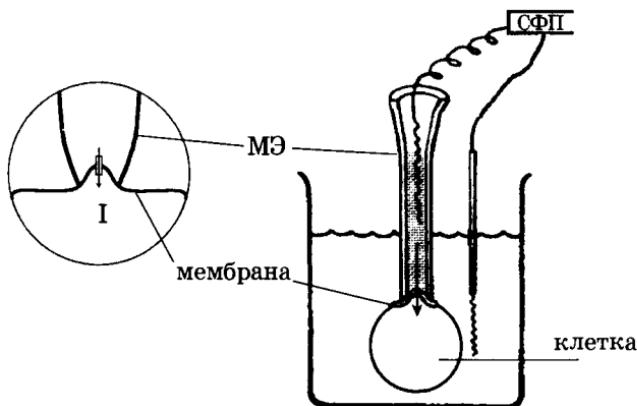


Рис. 4.4. Метод локальной фиксации потенциала мембранны.
МЭ – микроэлектрод, ИК – ионный канал, М – мембрана клетки,
СФП – схема фиксации потенциала, I – ток одиночного канала

Суть метода заключается в том, что микроэлектрод МЭ (рис. 3.1.) тонким концом, имеющим диаметр 0,5 – 1 мкм, присасы-

вается к мембране таким образом, чтобы в его внутренний диаметр попал ионный канал. Тогда, используя схему фиксации потенциала (рис. 3.4), можно измерять токи, которые проходят только через одиночный канал мембранны, а не через все каналы одновременно, как это происходит при использовании стандартного метода фиксации потенциала, описанного в § 12.

Результаты экспериментов, выполненных на различных ионных каналах, показали, что проводимость ионного канала дискретна и он может находиться в двух состояниях: открытом или закрытом. Переходы между состояниями происходят в случайные моменты времени и подчиняются статистическим закономерностям. Нельзя сказать, что данный ионный канал открывается именно в этот момент времени. Можно лишь сделать утверждение о вероятности открывания канала в определенном интервале времени.

Рассмотрим токи через одиночные Na^+ -каналы.

На рис. 4.5 приведены результаты опытов, при которых на мембрану N раз подавали деполяризующий сдвиг фиксированного потенциала $\phi_m^\Phi = -40$ мВ и регистрировали ток одиночного канала с помощью метода локальной фиксации потенциала. Результаты опытов располагали один под другим: 1-й, 2-й... ...N-й опыт (рис. 4.5, б). Эти токи текут внутрь клетки, их средняя амплитуда $\approx 1,6$ пА ($1,6 \cdot 10^{-12}$ А).

Канал за время одного такого деполяризующего сдвига открывался лишь один раз на время t_u , которое будем называть временем открытого состояния канала.

Среднее значение t_u для Na^+ -канала $\approx 0,7$ мс (от 0,3 до 1,5 мс).

Одиночный канал может открыться раньше (1-й опыт) или позже (N-й опыт). Время, в течение которого вероятность открывания отдельного канала велика, будем называть временем жизни каналов: T_{Na} , T_{Ca} . Для натриевых каналов $T_{\text{Na}} \approx 2$ мс.

Таким образом, процесс открытия натриевых каналов – процесс стохастический: сдвиг Φ_m выше порогового значения увеличивает вероятность открывания каналов, то есть идет процесс их активации. По прошествии времени жизни каналов T_{Na} вероятность их открывания падает до нуля и этот процесс называется инактивацией Na^+ -тока.

Экспериментальные записи токов одиночных каналов сложнее приведенных на рис. 4.5. Это определяется, во-первых, малыми величинами регистрируемых токов по сравнению с токами шумов и, во-вторых, нестабильностью работы самих каналов.

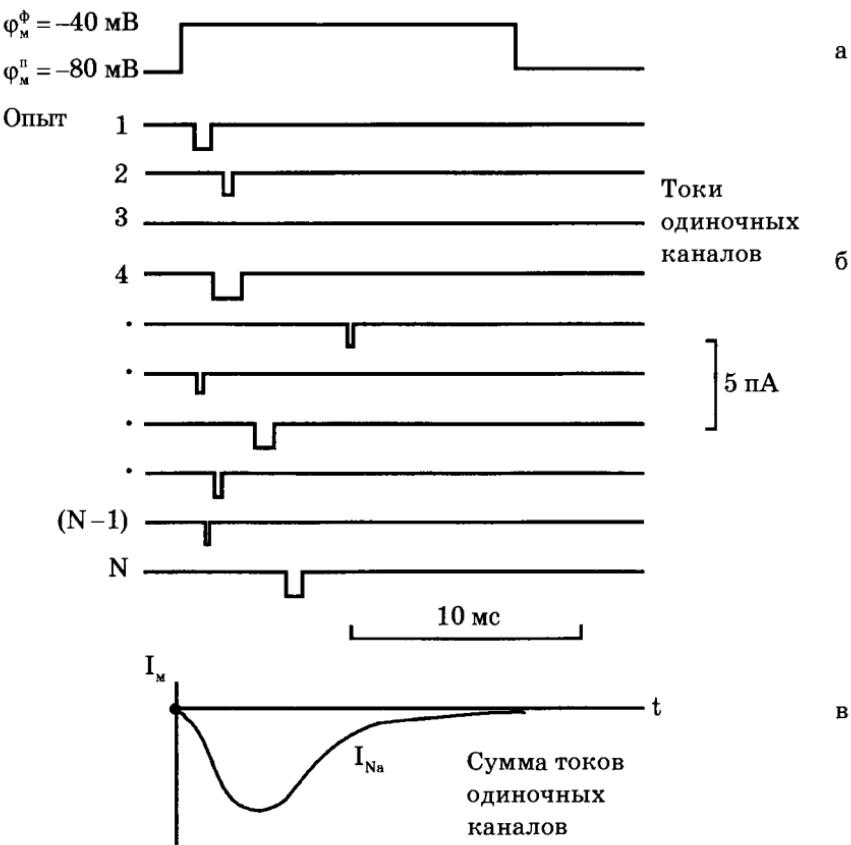


Рис. 4.5. Токи через одиночные натриевые каналы:

- а) деполяризующий сдвиг трансмембранныго потенциала от потенциала $\varphi_m^{\text{п}} = -80 \text{ мВ}$ до фиксированного потенциала $\varphi_m^{\Phi} = -40 \text{ мВ}$;
время сдвига – 14 мс;
- б) дискретные токи через одиночный канал при подаче последовательно N деполяризующих сдвигов потенциала;
- в) сумма токов через одиночные натриевые каналы

Несмотря на то, что ток через каждый ионный канал меняется скачком, зависимость суммарного трансмембранныго тока во времени плавная (см. рис. 4.8). Этот феномен можно объяснить, используя методы статистической физики.

Суммарный ток I через N одиночных ионных каналов:

$$I = \sum_{n=1}^N i_n,$$

где i_n – ток через n -й канал.

Среднее значение \bar{I} суммарного тока в случае одинаковых каналов определяется средним током \bar{i} в каждом канале:

$$\bar{I} = N\bar{i}.$$

Относительная флюктуация тока в одиночном канале велика:

$$\frac{\sqrt{(\Delta i)^2}}{\bar{i}} \approx 1.$$

В случае N статистически независимых каналов относительную флюктуацию суммарного тока следует рассматривать как флюктуацию среднего значения случайной величины, измеренную N раз. При этом, как известно из математической статистики, возникает поправочный множитель (корень из N), а именно:

$$\frac{\sqrt{(\Delta I)^2}}{\bar{I}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \cdot \frac{\sqrt{(\Delta i)^2}}{\bar{i}} \sim \frac{1}{\sqrt{N}}.$$

При больших N относительные флюктуации ничтожны. Для совокупности $N = 10^{10}$ ионных каналов, расположенных на участке аксона кальмара, флюктуация тока составляет 10^{-5} (0,001 %) от среднего значения тока через мембрану, то есть флюктуации тока при измерениях в этом случае практически не заметны. Для маленьких клеток, в которых может быть порядка 10^3 ионных каналов, относительные флюктуации более существенны: $1/\sqrt{10^3}$ (3%) см. (рис. 4.5,в).

Токи одиночных K^+ -каналов имеют амплитуду до 2 пА, а среднее время открытого состояния $t_o \approx 5$ мс. Однако за это время канал может несколько раз открыться и закрыться на короткое время, то есть могут происходить осцилляции тока. В отличие от натриевых, K^+ -каналы не инактивируются, пока Φ_m выше порогового значения. Отдельные каналы во время деполяризации могут открываться по нескольку раз.

Токи одиночных Ca^{2+} -каналов кардиомиоцитов имеют более сложный характер по сравнению с Na^+ - и K^+ -токаами аксонов. Во время последовательных скачков деполяризации в 70 % случаев Ca^{2+} -канал открывается на время ≈ 1 мс; затем через каждые 0,2 мс он закрывается и вновь открывается и пропускает ток с амплитудой импульса ≈ 1 пА. Такой процесс активации Ca^{2+} -тока длится около 130 – 200 мс, а затем наступает инактивация Ca^{2+} -тока. В 30 % скачков деполяризаций кальциевый канал остается закрытым.

4. Зависимость параметров канала от мембранныго потенциала. Ионные каналы нервных волокон чувствительны к мембранныму потенциалу, например натриевый и калиевый каналы аксона кальмара. Это проявляется в том, что после начала деполяризации мембранны соотвествующие токи начинают изменяться с той или иной кинетикой (рис. 4.2). На языке ионных каналов этот процесс происходит следующим образом. Ион-селективный канал имеет сенсор – некоторый элемент своей конструкции, чувствительный к действию электрического поля (рис. 4.6). При изменении мембранныго потенциала меняется величина действующей на него силы, в результате эта часть ионного канала перемещается и меняет вероятность открывания или закрывания ворот – своеобразных заслонок, действующих по закону “все или ничего”. Экспериментально показано, что под действием деполяризации мембранны увеличивается вероятность перехода натриевого канала в проводящее состояние. Скачок напряжения на мембране, создаваемый при измерениях методом фиксации потенциала (рис. 3.5 и 4.2), приводит к тому, что большое число каналов открывается. Через них проходит больше зарядов, а значит, в среднем, протекает больший ток. Существенно, что процесс роста проводимости канала определяется увеличением вероятности перехода канала в открытое состояние, а не увеличением диаметра открытого канала. Таково современное представление о механизме прохождения тока через одиночный канал.

Плавные кинетические кривые токов, регистрируемых при электрических измерениях на больших мембранных, получаются вследствие суммации многих скачкообразных токов, протекающих через отдельные каналы. Их суммирование, как показано выше, резко уменьшает флуктуации и дает достаточно гладкие зависимости трансмембранныго тока от времени.

Ионные каналы могут быть чувствительны и к другим физическим воздействиям: механическим деформациям, связыва-

нию химических веществ и т.д. В этом случае они являются структурной основой, соответственно, mechanoreцепторов, хеморецепторов и т.д.

Изучение ионных каналов в мембранах есть одна из важных задач современной биофизики.

Структура ионного канала. Ион-селективный канал состоит из следующих частей (рис. 4.6): погруженной в бислой белковой части, имеющей субъединичное строение; селективного фильтра, образованного отрицательно заряженными атомами кислорода, которые жестко расположены на определенном расстоянии друг от друга и пропускают ионы только определенного диаметра; воротной части.

Ворота ионного канала управляются мембранным потенциалом и могут находиться как в закрытом состоянии (штриховая линия), так и в открытом состоянии (сплошная линия). Нормальное положение ворот натриевого канала – закрытое. Под действием электрического поля увеличивается вероятность открытого состояния, ворота открываются и поток гидратированных ионов получает возможность проходить сквозь селективный фильтр.

Если ион подходит по диаметру, то он сбрасывает гидратную оболочку и проскаивает на другую сторону ионного канала. Если же ион слишком велик по диаметру, как, например, тетраэтиламмоний, он не в состоянии пролезть сквозь фильтр и не может пересечь мембрану. Если же, напротив, ион слишком мал, то у него возникают сложности в селективном фильтре, на сей раз связанные с трудностью сброса гидратной оболочки иона.

Блокаторы ионных каналов либо не могут пройти сквозь него, застревая в фильтре, либо, если это большие молекулы, как TTX, они стерически соответствуют какому-либо входу в канал. Так как блокаторы несут положительный заряд, их заряженная часть втягивается в канал к селективному фильтру как обычный катион, а макромолекула закупоривает его.

Таким образом, изменения электрических свойств возбудимых биомембран осуществляется с помощью ионных каналов. Это белковые макромолекулы, пронизывающие липидный бислой, которые могут находиться в нескольких дискретных состояниях. Свойства каналов, селективных для ионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} , могут по-разному зависеть от мембранныго потенциала, что и определяет динамику потенциала действия в мембране, а также отличия таких потенциалов в мембранах разных клеток.



Рис. 4.6. Схема строения натриевого ионного канала мембраны в разрезе

§ 15. Механизм генерации потенциала действия кардиомиоцита

Потенциал действия мышечной клетки сердца отличается от потенциала действия нервного волокна и клетки скелетной мышцы прежде всего длительностью возбуждения – деполяризации (рис. 4.7).

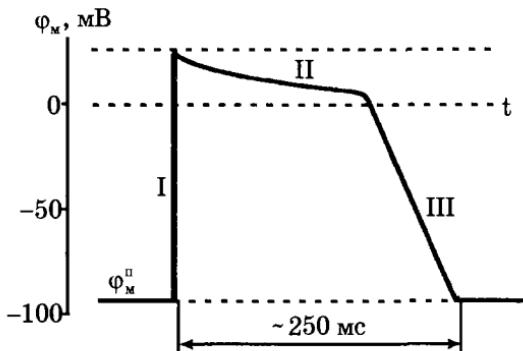


Рис. 4.7. Потенциал действия кардиомиоцита

Если длительность ПД аксона составляет 1 мс, клетки скелетной мышцы 2 – 3 мс, то длительность потенциала действия клетки сократительного миокарда желудочка и сердца составляет 250 – 300 мс. Как будет показано ниже (гл. 5, 7), это позволяет осуществить синхронное возбуждение и сокращение структур сердца для обеспечения выброса крови.