

3.2. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ

Биоэлектрические явления — это клеточные процессы, сопровождающиеся перераспределением и транспортом электрических зарядов, обусловленные присутствием в клетках фиксированных (заряженные группы белков и фосфолипидов) и подвижных (свободные ионы и электроны) электрических зарядов.

В настоящее время принято классифицировать биоэлектрические явления на следующие типы:

— биоэлектрический потенциал — электрический потенциал плазматической мембраны клетки (мембранный потенциал), источником которого являются электрохимические градиенты различных ионов. Условно различают биоэлектрический потенциал покоя — стационарная разность электрического потенциала между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью в состоянии функционального покоя клетки и потенциал действия — быстрые изменения мембранного потенциала при функционировании (возбуждение нервных, мышечных и некоторых железистых клеток, а также клеток водорослей и проводящих пучков высших растений);

— окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) — разность потенциалов, возникающая в процессе окислительно-восстановительной реакции переноса электронов от донора к акцептору;

— электрокинетический потенциал (электрокинетические явления) — разность потенциалов, возникающая в системе при механическом движении фаз. В данном типе различают:

а) электрофорез — движение дисперсной фазы по отношению к дисперсионной среде в электрическом поле (например, дрожжевых клеток или форменных элементов крови в жидкой среде при помещении их в постоянное электрическое поле);

б) электроосмос — движение жидкости через пористую перегородку под влиянием внешнего электрического поля (например, аномальный осмос в почках);

в) потенциал течения — потенциал, возникающий между жидкой фазой и стенками сосуда при движении жидкости (ток крови по артериям и венам);

г) потенциал оседания (седиментации) — потенциал, который возникает в гетерогенной среде под влиянием силы тяжести между верхними и нижними слоями системы.

3.2.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БИОПОТЕНЦИАЛОВ

3.2.1.1. Физико-химические процессы формирования мембранного потенциала

Формирование мембранного потенциала обусловлено совокупностью электрических процессов на границе раздела фаз: трансмембранным потенциалом и потенциалом мембраны, а также явлениями, определяющими формирование двойного электрического слоя вокруг мембраны и поверхностного заряда.

Теория двойного электрического слоя была разработана в исследованиях Г. Гуи (H. Guy) и Р. А. Чапмена (R. A. Chapman) в 1910 году. Она постулирует, что распределение ионов в области заряженной поверхности мембраны определяет:

- электростатическое притяжение (связывание);
- тепловое движение ионов (отталкивание).

В случае теплового движения ионов их концентрация вблизи поверхности мембраны соответствует закону Больцмана:

$$C_x = C_{\text{нар}} \exp(-zFE/RT),$$

где R – газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Профиль потенциала в области двойного слоя рассчитывается по уравнению Пуассона – Больцмана:

$$d^2 E / dx^2 = -F / \epsilon \epsilon_{\text{нар}} z C_{\text{нар}} \exp(-zFE/RT).$$

Поверхностный заряд мембраны не может быть измерен, и, как правило, регистрируют параметр, близкий к нему, – дзета-потенциал, который возникает при движении слоя гидратированных ионов и пропорционален поверхностному заряду мембраны.

Трансмембранный потенциал клетки определяется из уравнения Нернста:

$$E = RT/F \ln C_{\text{вн}}/C_{\text{нар}}.$$

Межфазовый скачок потенциала возникает только в случае, когда коэффициенты распределения катионов и анионов различны. Величина данного потенциала определяется соотношением

$$E = RT/F \ln A_{\text{вн}}/A_{\text{нар}},$$

где $A_{\text{вн}}$, $A_{\text{нар}}$ – коэффициенты распределения иона соответственно между мембраной и окружающей средой.

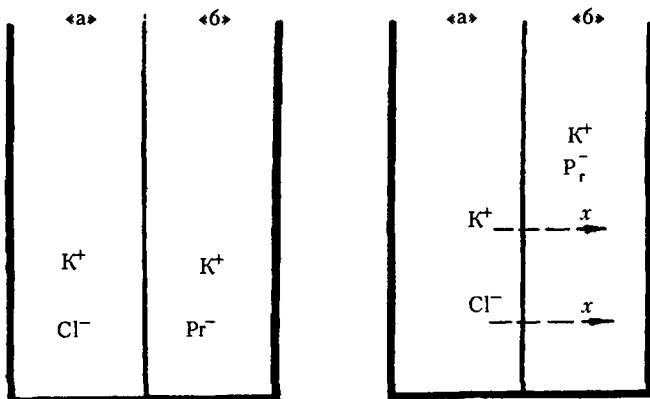
Понятие «биоэлектрические потенциалы» довольно общее и констатирует только различия величины потенциала между экстраклеточной и внутриклеточной средой. Однако в клетке существует совокупность различных биоэлектрических потенциалов, не только между ее внутренним содержимым и окружающей средой, но и между возбуж-

денным и невозбужденным участками одной и той же клетки или органа. Возникновение разности потенциалов обусловлено неравномерным распределением ионов между клеткой и окружающей средой.

Для объяснения механизма неравномерного распределения ионов по обе стороны мембраны Ф. Доннан (F. Donnan) предложил модель, в которой два раствора разделены мембраной, пропущиваемой для воды и электролитов, но непроницаемой для крупных молекул (рис. 3.17). В наружный отсек «а» помещают раствор электролита хлористого калия, во внутренний отсек «б» — протениата калия. В отсеке «б» хлор отсутствует и по градиенту концентрации проникает в него. Исходно растворы были электронейтральными. В отсеке «б» электронейтральность поддерживается тем, что движение ионов хлора сопровождается движением ионов калия. К моменту равновесия в отсек «б» проникает x ионов калия и x ионов хлора, в результате содержание ионов калия в нем составляет $C + x$, а ионов хлора — x ; в отсеке «а» эти показатели равны $C - x$. Ф. Доннан показал, что при равновесии произведения концентрации ионов, способных к диффузии, по обе стороны мембраны равны:

$$[K^+]_б [Cl^-]_б = [K^+]_а [Cl^-]_а,$$

Состояние системы, при котором выполняется это условие, называется доннановским равновесием.



Начальное состояние

Равновесное состояние

Внутри («б»)
 $K^+ = C_1$
 $Pr^- = C_1$
 $Cl^- = 0$
 Снаружи («а»)
 $K^+ = C_0$
 $Cl^- = C_0$

Внутри («б»)
 $K^+ = C_1 + x$
 $Pr^- = C_1$
 $Cl^- = x$
 Снаружи («а»)
 $K^+ = C_0 - x$
 $Cl^- = C_0 - x$

Рис. 3.17. Доннановское равновесие. Мембрана, разделяющая растворы, непроницаема для ионов белка (Pr^-), но пропускает остальные ионы

После простых преобразований определим величину x как равновесную концентрацию ионов, прошедших через мембрану и способных к диффузии. Разумеется, для этого необходимо знать начальный уровень ионов по обе стороны мембраны:

$$x = C_{\text{нар}}^2 / (C_{\text{вн}} + 2C_{\text{нар}}).$$

Напомним, что равновесие Доннана выведено при условии электронеутральности обоих растворов. Однако если с одной стороны мембраны раствор электролита более концентрирован, чем с другой, то возникает поток воды и создается избыточное гидростатическое или осмотическое давление. В растительной клетке осмотическое давление выше, чем в окружающей среде, но от разрыва ее предохраняет плотная клеточная стенка. Такой защитный механизм вполне пригоден для неподвижных растений, но не подходит для животных клеток. В процессе эволюции был выработан другой механизм: недостаток электролитов в наружной среде компенсируется присутствием соли — NaCl. Мембрана малопроницаема для ионов Na, поэтому Na^+ , содержащийся в окружающей клетку среде, является основным фактором, уравновешивающим осмотическое давление внутриклеточных анионов.

Диффузия ионов через мембрану создает разность электрических потенциалов. При диффузии молекулы вещества направляются по концентрационному градиенту — «вниз по склону». Можно вычислить скорость транспорта вещества (так называемый поток) или работу, необходимую для предотвращения его переноса. В данном случае рассматривается выход ионов K из клетки. Работа A_x будет равна:

$$A_x = 2,3 RT [K^+]_{\text{нар}} / [K^+]_{\text{вн}}.$$

Здесь обозначение A_x принято потому, что движение иона по концентрационному градиенту обусловлено химической силой. По мере развития диффузии ионов калия из клетки ионы хлора проникают в клетку также по концентрационному градиенту. Противоположные заряды притягиваются, что заставляет ионы калия стремиться в клетку вслед за ионами хлора. На преодоление этой электрической силы требуется работа A_3 ,

$$A_3 = FE,$$

где F — постоянная Фарадея (количество электрических зарядов в 1 моле вещества), Кл/моль; E — разность электрических потенциалов, возникающая вследствие разделения зарядов по обе стороны мембраны, В.

Когда в системе устанавливается равновесие, то суммарный поток вещества (в данном случае калия) становится равным нулю и сила «выталкивания» иона из клетки уравновешивается противоположно направленной электрической силой ($A_3 = A_x$).

Диффузионный потенциал E часто определяют с помощью уравнения Нернста

$$E = 2,3 \frac{RT}{F} \lg \frac{[K^+]_{\text{нар}}}{[K^+]_{\text{вн}}}.$$

Американский нейробиолог Г. М. Шеперд (G. M. Shepherd) считал, что если читатель из всей биофизики клетки хочет запомнить только одно уравнение, то пусть это будет уравнение Нернста, необходимое для понимания совокупности электрических процессов в клетке.

В качестве примера определим E_k для аксона кальмара при комнатной температуре (18°C). В этом случае $2,3 RT/F$ составляет 58 мВ, концентрация ионов калия в паружной и внутренней среде равна соответственно 40 и 400 ммоль. Тогда

$$E = 58 \lg 40/400 = -58 \text{ мВ},$$

где E — потенциал, при котором поток данного иона через мембрану прекращается (равновесный потенциал). Потенциал E часто называют мембранным, поскольку он формируется на мембране.

После физико-химического вступления перейдем к рассмотрению механизма формирования собственно биоэлектрических потенциалов — потенциала покоя и потенциала действия.

3.2.1.2. Потенциал покоя

Как отмечалось выше, в возникновении биоэлектрических потенциалов решающая роль принадлежит потенциалам, обусловленным несимметричным, неравномерным распределением ионов между клеткой и средой. Гипотезу механизма возникновения потенциалов в живой клетке впервые предложил Дж. Бернштейн (J. Bernstein) в 1912 г. Он рассматривал протоплазму как свободный раствор электролитов и считал, что мембрана в состоянии покоя проницаема лишь для ионов К и непроницаема для ионов Na. В этих условиях возникает разность электрических потенциалов.

В последующие годы предпринималось множество попыток проверить гипотезу Бернштейна, однако это оказалось возможным лишь после того, как были разработаны методы измерения регистрации внутриклеточных потенциалов, исследовано содержание и состояние ионов в протоплазме и прослежены с помощью меченых атомов и микроэлектродов потоки ионов через мембрану. Для мембранной теории генерации биопотенциалов исключительно важное значение имел факт, что большая часть ионов К в протоплазме находится в свободном состоянии, т. е. протоплазма в соответствии с предположением Бернштейна представляет собой свободный раствор этих ионов. А. Ходжкин (1965) и Р. Кейнс (R. Keynes, 1982), используя радиоактивный изотоп (^{42}K), доказали, что в гигантском аксоне кальмара не менее 90 % внутриклеточного калия свободно диффундирует и перемещается в протоплазме под действием электрических сил так же, как и во внешней среде. Так, например, в скелетных мышцах коэффициент активности ионов К, измеренный с помощью микроэлектродов, оказался близким к коэффициенту активности этих ионов в водном растворе. Концентрация ионов К внутри клетки в 10 — 20 раз выше, чем снаружи. Избыток положи-

тельных зарядов ионов К внутри клеток компенсируется в основном органическими анионами (аспарагиновой, уксусной, пировиноградной и другими органическими кислотами). Содержание неорганических анионов в клетках сравнительно небольшое, но их вклад значителен.

Итак, между внутренней и наружной поверхностями клеточной мембраны гигантского аксона кальмара существует разность электрических потенциалов — потенциал покоя, которую можно измерить с помощью микроэлектрода, введенного в клетку. Обычно микроэлектроды делают из тонких стеклянных трубочек (диаметром 0,5 — 2,0 мкм), заполненных концентрированным (2 — 4 моль) раствором КСl. Сопротивление такого электрода высоко и составляет 10^6 — 10^8 Ом (рис. 3.18).

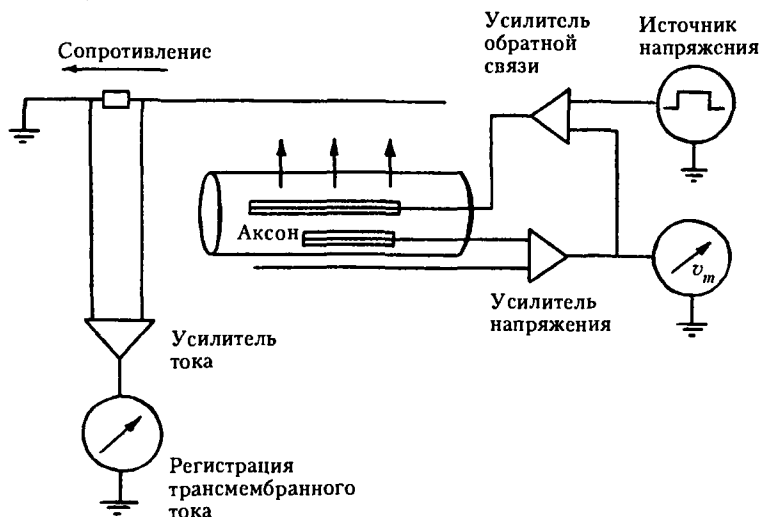
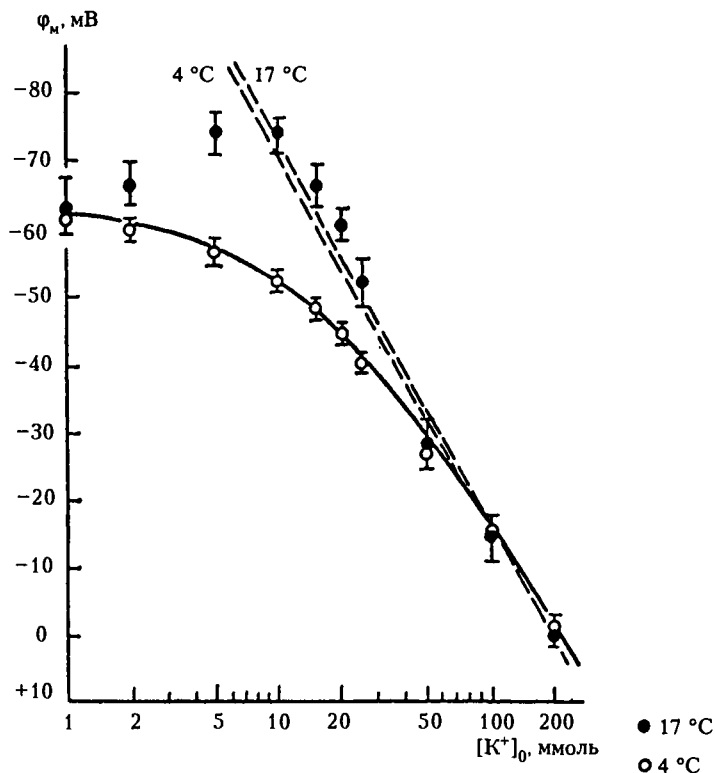


Рис. 3.18. Схема экспериментальной установки для исследования аксона кальмара методом фиксации потенциала. Потенциал мембраны устанавливается на определенном уровне с помощью источника напряжения. Для его регистрации используют усилитель, соединенный с усилителем обратной связи. С помощью последнего через мембрану пропускают ток, компенсирующий ионные токи при данном значении фиксированного потенциала; этот ток измеряют на сопротивлении

Механизмы, способствующие возникновению биопотенциалов, в основном были изучены на крупных клетках — гигантских аксонах кальмара, клетках водоросли *Chara*, гигантских нейронах пиявки *Hirudo* и др. Размеры этих клеток велики и составляют от 5 мкм до 1 мм, что важно для надежной регистрации ПП. На базе большого экспериментального материала было установлено, что цитоплазма клетки в состоянии покоя всегда имеет отрицательный потенциал по отношению к потенциалу межклеточной жидкости. ПП у различных клеток состав-

ляет от -50 до -125 мВ. В частности, потенциал покоя гигантского аксона кальмара меняется в пределах от -50 до -75 мВ, мышечных волокон сердца лягушки — от -61 до -82 мВ. Самый высокий потенциал покоя обнаружен у клеток водоросли *Nitella* — от -100 до -125 мВ.

Калиевый механизм возникновения потенциала покоя подтверждают данные, полученные при варьировании экстраклеточной концентрации калия (рис. 3.19). При изменении наружной концентрации калия наблюдается закономерное изменение величины потенциала покоя в широких пределах в соответствии с уравнением Нернста. В частности, когда концентрация калия в среде соответствовала его уровню в клетке, потенциал покоя равнялся нулю.



Р и с. 3.19. Зависимость потенциала покоя гигантского аксона кальмара от концентрации K^+ в среде. Величины K^+ представлены в логарифмическом масштабе. При 4°C потенциал покоя (\circ) подчиняется не уравнению Нернста ($-\cdot-\cdot-$), а уравнению Гольдмана (\longrightarrow). При 17°C , когда работает система активного транспорта Na^+ и K^+ , потенциал покоя (\bullet) ближе к рассчитанному по уравнению Нернста, чем при 4°C , когда Na , K -АТФ-аза неактивна

В состоянии покоя клеточная мембрана проницаема не только для ионов K, но и (в некоторой степени) для ионов Na и Cl. Таким образом, ПП клеток представляет собой результат суммы электродвижущих сил, генерируемых этими тремя ионами. Проницаемость иона Na из окружающей среды внутрь клетки по концентрационному градиенту несколько уменьшает ПП. Диффузия через мембрану ионов Cl, содержание которых в межклеточной жидкости большинства тканей выше, чем в клетках, вызывает некоторое увеличение мембранного потенциала. Следовательно, для более точного вычисления ПП необходимо введение дополнительной поправки на диффузию ионов не только K, но и Na и Cl. Уравнение Нернста позволяет выразить мембранный потенциал только приблизительно, и хотя получаемые величины близки к реальным, для более точного расчета применяют так называемое обобщенное уравнение Гольдмана:

$$E_m = 58 \lg \frac{P_K [K^+]_{нар} + P_{Na} [Na^+]_{нар} + P_{Cl} [Cl^-]_{вн}}{P_K [K^+]_{вн} + P_{Na} [Na^+]_{вн} + P_{Cl} [Cl^-]_{нар}}$$

где P_K, P_{Na}, P_{Cl} — коэффициенты проницаемости для соответствующих ионов; $[K^+]_{нар}, [Na^+]_{нар}, [Cl^-]_{нар}, [K^+]_{вн}, [Na^+]_{вн}, [Cl^-]_{вн}$ — концентрация ионов соответственно вне и внутри клетки.

Одним из достоинств уравнения Гольдмана является то, что с его помощью можно определить мембранный потенциал не только в покое, но и при возбуждении клетки. При этом необходимо знать коэффициент проницаемости для ионов. Если мембрана проницаема только для одного вида ионов (например, K), то $P_{Na} = P_{Cl} = 0$. Уравнение Гольдмана в данном случае примет вид уравнения Нернста. На основании экспериментальных и расчетных результатов А. Ходжкин и Б. Катц показали, что для аксона кальмара в состоянии покоя отношение коэффициентов проницаемости

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45 \text{ (или } 100 : 4 : 45\text{)}.$$

3.2.1.3. Потенциал действия

Мембранный потенциал нервного волокна обычно составляет от -70 до -90 мВ. При деполяризации аксолеммы сначала возникает местный (локальный) процесс градуального изменения уровня ПП, который переходит в потенциал действия, или распространяющийся потенциал, при сдвиге МП в сторону деполяризации на 15 — 20 % (рис. 3.20, 3.21).

Потенциал действия — это кратковременный регенеративный электрический потенциал, распространяющийся вдоль аксона или мышечного волокна и возникающий в соответствии с законом «все или ничего». Критическая (пороговая) деполяризация мембраны ведет к увели-

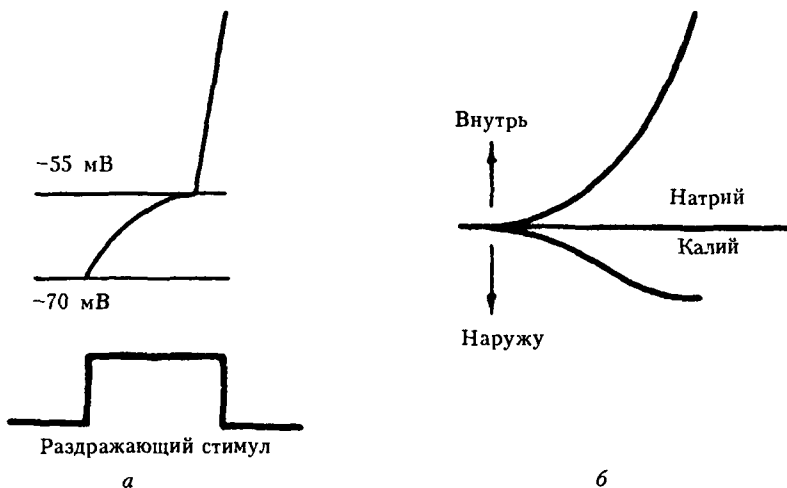


Рис. 3.20. Схема возникновения потенциала действия: *a* — переход местного процесса в распространяющийся; *б* — направление движения ионов натрия и калия

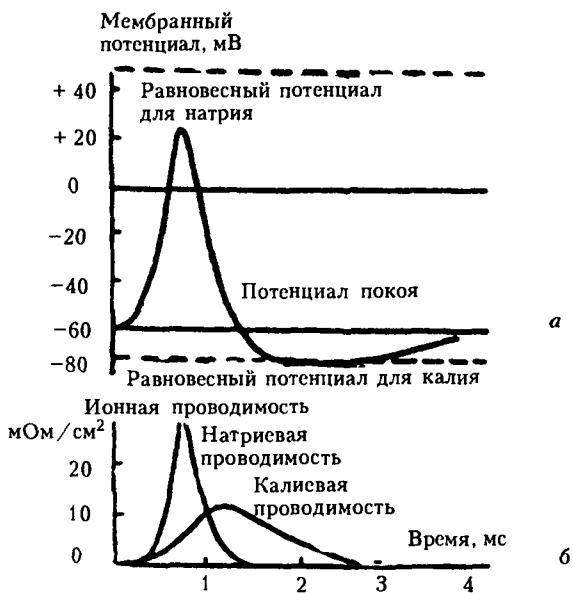


Рис. 3.21. Теоретически рассчитанные кривые распространяющегося потенциала действия (*a*) и изменения проводимости мембраны для ионов натрия и калия (*б*)

чению проницаемости для натрия (g_{Na}), что обеспечивает появление восходящей фазы высоковольтной части ПД (пика, или спайка).

При длительной деполаризации натриевая проницаемость снижается, а калиевая (g_K) возрастает, что обеспечивает нисходящую фазу ПД. К. С. Коул (K. S. Cole) и Г. Дж. Кертис (H. J. Curtis) в 1938 г. с помощью метода фиксации МП доказали, что при развитии потенциала действия наряду с изменением проницаемости происходит кратковременное увеличение электропроводности клеточной мембраны. По их данным, сопротивление мембраны аксона кальмара изменяется от 1 000 Ом/см² в состоянии покоя до 25 Ом/см² в момент возбуждения, а у клетки водоросли — от 1 МОм/см² до 500 Ом/см². Повышение электропроводности мембраны при возбуждении объясняют увеличением ее проницаемости для ионов. При генерации ПД происходит деполаризация мембраны — падение уровня мембранного потенциала, а затем смена знака цитоплазматического заряда мембраны. При этом наружная поверхность мембраны обладает уже отрицательным суммарным зарядом, а внутренняя — положительным. В целом амплитуда ПД может достигать 100 — 120 мВ.

Усиление потока положительно заряженных ионов натрия, направленного внутрь клетки, уравновешивает концентрационный градиент, и поступление ионов Na в клетку прекращается. Избыточный отрицательный заряд на внутренней стороне мембраны исчезает, что обеспечивает перезарядку мембраны. Это изменение проницаемости мембраны для ионов отмечается в первой фазе потенциала действия — фазе деполаризации. По данным А. Ходжкина, в это время отношение коэффициентов проницаемости мембраны аксона кальмара составляет $R_K : R_{Na} : R_{Cl} \sim 1 : 20 : 0,45$. При сравнении его с приведенным выше аналогичным соотношением в состоянии покоя видно, что для ионов K и Cl в первой фазе возбуждения проницаемость не изменилась, а для ионов Na она увеличилась в 500 раз за короткий промежуток времени (0,5 — 1 мс). Затем возрастает проницаемость мембраны для ионов K, и усиливается диффузия этих ионов из клетки. Интенсификация потока ионов K, направленного из клетки наружу, приводит к уменьшению мембранного потенциала, что в свою очередь снижает проницаемость мембраны для ионов Na, и продолжается до тех пор, пока потенциал покоя не восстановится. После этого проницаемость для ионов K падает до исходной величины, а наружная поверхность мембраны снова приобретает положительный потенциал за счет вышедших в среду положительно заряженных ионов K. Фаза, в течение которой мембранный потенциал возвращается к уровню потенциала покоя, называется реполяризацией, она всегда более продолжительна, чем деполаризация. Таким образом, реполяризация мембраны возбудимой клетки осуществляется не в результате обратного перемещения ионов Na, а вследствие выхода из клетки эквивалентного количества ионов K. В ряде случаев проницаемость мембраны для ионов K после окончания возбуждения остается повышенной, что формирует фазу так называемой гиперполяризации.

Следовательно, формирование ПД обусловлено двумя ионными потоками через биологическую мембрану. Поток ионов Na внутрь клетки приводит к перезарядке мембраны, а противоположно направленный поток ионов калия — к восстановлению исходного потенциала покоя. Потоки приблизительно равны по величине, но сдвинуты во времени, благодаря чему и становится возможным генерация ПД.

Р. Кейнс показал, что в гигантском аксоне за время одного ПД в клетку поступает $3,7 \text{ пмоль Na}^+$ на 1 см^2 поверхности волокна. Примерно такое же количество ионов K выходит из клетки. Исходя из общего содержания ионов K и Na в клетке и их расхода на один ПД, А. Ходжкин подсчитал, что при экономном использовании энергии градиентов нервные клетки способны генерировать сотни тысяч импульсов без подзарядки своих мембранных «концентрационных батарей».

Поскольку процесс возбуждения скоротечен, т. е. занимает короткие интервалы времени, а между деполяризацией, проницаемостью и ионным током существуют положительные обратные связи, развитие ПД носит взрывоподобный характер. В связи с этим для изучения механизма возбуждения был разработан адекватный метод — метод фиксации мембранного потенциала (см. рис. 3.18).

Метод фиксации потенциала позволяет непосредственно регистрировать ионные токи, текущие через мембрану при заданном уровне мембранного потенциала. Впервые он был применен К. С. Коулом, затем А. Ходжкиным, А. Ф. Хаксли (A. F. Huxley) и Б. Катцем (B. Katz). Сущность метода состоит в том, что мембранный потенциал на ограниченном участке мембраны смещают до некоторой новой величины и удерживают его с помощью электронной схемы с обратной связью, тем самым автоматически подавляя развитие ПД. Ток, протекающий через этот участок под влиянием приложенного напряжения, далее усиливается и фиксируется. Когда ПД распространяется по нервному волокну, через каждый его участок протекают токи, меняющиеся во времени, что сильно усложняет процесс регистрации. При использовании данного метода в гигантский аксон кальмара вводили металлическую проволоку, нивелируя таким образом различия в процессах, происходящих вдоль аксолемы. В условиях фиксации потенциала ток, проходящий через мембрану I_m , представляет собой сумму двух токов — I_i , переносимого ионами через проводящие пути (g_{Na} , g_K , g_{Cl}), и емкостного тока I_c , заряжающего или разряжающего электрическую емкость мембраны.

Метод фиксации потенциала позволяет быстро смещать мембранный потенциал и удерживать его на новом уровне. С помощью этого метода А. Ходжкин и А. Ф. Хаксли показали, что при деполяризации мембраны Na- и K-каналы ведут себя неодинаково: проводимость мембраны для ионов Na возрастает достаточно быстро, достигая максимума, затем она снижается (инактивация), а проводимость мембраны для ионов K увеличивается медленнее, но удерживается в течение всего периода деполяризации нерва.

При изучении работы ионных каналов в условиях фиксации потенциалов нередко возникает необходимость введения в клетку веществ, взаимодействующих с ионными каналами или меняющих ионный состав внутриклеточной среды. В связи с этим был разработан *метод внутриклеточной перфузии* гигантского аксона кальмара, который заключается в удалении аксоплазмы и замещении ее раствором заданного состава. Перфузированный гигантский аксон кальмара сохраняет электрическую возбудимость и генерирует ПД. Результаты опытов на перфузированном аксоне подтвердили предположения о механизмах возникновения ПП и ПД. Внутриклеточная перфузия применяется и при работе с другими гигантскими нервными и мышечными волокнами беспозвоночных животных.

При изучении свойств ионных каналов мембраны тела (сомы) нервной клетки также широко используют метод фиксации потенциала, особенно при исследовании гигантских униполярных нейронов моллюсков. Форма их тела приближается к сферической (диаметр достигает 200 — 800 мкм); от тела отходит один отросток. В опытах используют принцип точечной фиксации потенциалов. В тело нейрона вводят два микроэлектрода, один из которых служит для измерения мембранного потенциала, второй — для пропускания тока. Для мембраны нейрона характерно наличие нескольких популяций потенциалзависимых ионных каналов, поэтому токи, текущие через различные типы ионных каналов, во время деполяризации мембраны, как правило, суммируются. Для их разделения необходимо изменить состав внутриклеточной среды. С этой целью был разработан специальный метод перфузии изолированных нейронов, заключающийся в следующем. К изолированной клетке подводится пипетка, которая плотно примыкает к мембране клетки. Затем мембрана разрушается, тем самым открывается доступ к внутреннему содержимому клетки, что создает возможность для внутриклеточной перфузии и одновременной фиксации потенциалов. Данный метод позволяет из токовых кривых, отражающих суммарную картину движения электрических зарядов через мембрану, выделить компоненты, характеризующие транспорт кальция.

Метод фиксации МП и перфузии применяют при изучении ионных каналов мембраны тела нервных клеток моллюсков, нейробластомы, нейронов спинальных ганглиев млекопитающих, ооцитов, миокардиоцитов, мышечных (гладкомышечных) клеток.

В последние годы получил широкое распространение *метод фиксации потенциалов на микрофрагменте клеточной мембраны* («пэчклямп»). Он позволяет регистрировать токи одиночных ионных каналов (рис. 3.22). Впервые эти токи были зарегистрированы Э. Неером (E. Neher) и Б. Сакманном (B. Sakmann) в 1976 г. Размер микрофрагмента мембраны находится на грани разрешения светового микроскопа. Основой для создания метода послужило обнаружение контакта (в определенных условиях) клеточной мембраны с кончиком стеклянной микропипетки (гигаомный контакт), в результате которого образуется

электрически изолированный участок мембраны. Контакт мембраны с микропипеткой механически очень прочен: участок мембраны можно либо изолировать, либо разрушить и проникнуть таким образом в клетку. Важным условием образования гигаомного контакта между пипеткой и клеточной мембраной является освобождение клеточной поверхности от соединительной ткани. При методе «пэтч-клямп» используют ферментативно-диспергированные клетки или клеточные культуры.

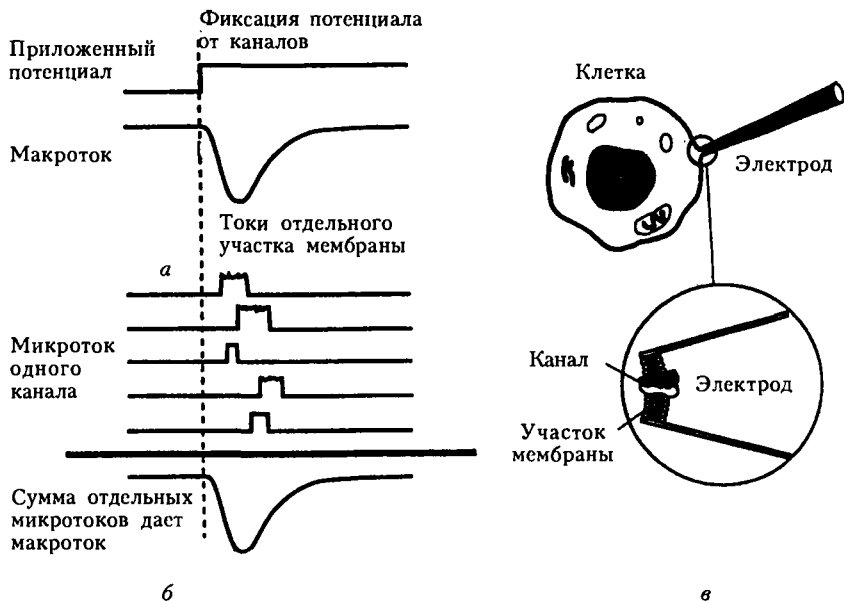


Рис. 3.22. Макротоки (а) и микротоки (б) при регистрации методом «пэтч-клямп» (в)

Полный цикл потенциала действия

Заключая раздел, посвященный генерации ПД, отметим, что спайк, который был рассмотрен достаточно подробно, есть лишь часть цикла развития и генерации потенциала действия. Полный цикл ПД более сложен и имеет значительно большую протяженность во времени (рис. 3.23). За быстропротекающим спайком следуют более медленные и небольшие по амплитуде изменения уровня мембранного потенциала — следовая гиперполяризация и следовая деполяризация. Они совпадают по времени с повышением и понижением уровня возбудимости клетки.

В структуру ПД входят локальный потенциал, спайк и следовые потенциалы. Локальные потенциалы подразделяются на:

- локальный потенциал при генерации ПД;
- возбуждающий постсинаптический потенциал;

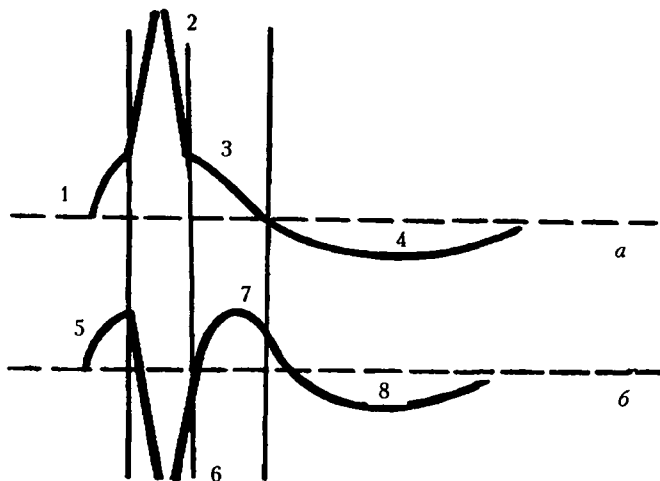


Рис. 3.23. Потенциал действия (а) и цикл изменений возбудимости (б) в нерве: 1 — местный процесс; 2 — спайк (пиковый потенциал); 3 — отрицательный следовой потенциал; 4 — положительный следовой потенциал; 5 — период латентной суммации; 6 — рефрактерный период; 7 — период экзальтации; 8 — субнормальный период; пунктирной линией обозначены уровень потенциала покоя (а) и исходный уровень возбудимости (б)

- ингибиторный постсинаптический потенциал;
- генераторный рецепторный потенциал.

При развитии локального потенциала, так же как и при ПД, наблюдается снижение сопротивления и возбудимости плазматической мембраны клетки; различия заключаются в отсутствии в случае локального ответа порога абсолютной рефрактерности и распространении по закону «все или ничего».

В табл. 3.2 приведены временные характеристики ПД для миелиновых нервных волокон холоднокровных и теплокровных животных.

В отличие от спайка следовые потенциалы очень изменчивы. Считается, что изменения следовой части ПД отражают метаболические процессы, протекающие в возбудимом образовании во время возбуждения и (главным образом) после него, т. е. во время восстановления исходного состояния мембранного потенциала.

При генерации ПД в растении, так же как и в нервной клетке, возникают ионные токи: под влиянием деполяризации увеличивается проницаемость мембраны для ионов кальция в результате активации кальциевых каналов. Вход кальция активирует хлорные каналы, что сопровождается выходом ионов хлора и деполяризацией плазматической мембраны растительной клетки. Возникает восходящая фаза ПД. Деполяризация приводит к активации К-каналов, выходу ионов калия и в результате к реполяризации плазматической мембраны растительной клетки.

Таблица 3.2

**Характеристика потенциала действия в нервах холоднокровных
и теплокровных животных, мс**

Фаза потенциала действия	Земноводные	Млекопитающие
Местная реакция	0,04	Не зарегистрирована
Спайк	2	0,4 – 0,5
Абсолютная рефрактерность	2	0,4 – 1,0
Следовая негативность (3 – 5 % от амплитуды спайка)	20 – 30	12 – 20
Следовая позитивность (0,2 % от амплитуды спайка)	100	40 – 60

3.2.2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ

С генерацией ПД связан один из важнейших клеточных процессов — проведение возбуждения, т. е. процесс, обеспечивающий координацию и связь между различными клетками. Безусловно, для организма связь между органами и тканями (передача информации, координация протекающих в организме процессов и управление ими) имеет существенное значение. В настоящее время различают три типа связи (передачи) информации между клетками:

- прямая, когда сигнал передается непосредственно от клетки к клетке и изменение состояния одной клетки в ответ на воздействие ведет к изменению функционирования других клеток (химический и механический синапс);

- гуморальная, когда в межклеточную среду организма поступают продукты обмена веществ или секрети; сигнал адресован «всем, всем, всем» (по образному выражению А. А. Ухтомского) и достигает эффекта достаточно медленно;

- нервная, когда по нервным волокнам передаются импульсы, которые обеспечивают высокую скорость и распознаваемость сигнала; эволюционно это достигается не сразу, например, в диффузной нервной системе в реакции на раздражение участвует весь организм, но быстрая распространения сигнала уже высока.

Все виды связи существуют в организме одновременно и совершенствуются с эволюцией. Для высших беспозвоночных и позвоночных животных особенно важен последний вид связи. С ПД часто отождествляют нервный импульс. *Нервный импульс* — единица распространяющегося возбуждения, средство передачи информации из одного участка организма в другой; в физико-химическом аспекте — это временное перемещающееся обратимое изменение мембранного потенциала нервной клетки.

В норме по нервным волокнам распространяются не одиночные

импульсы, а их ряды и залпы различной частоты и длительности — ритмическое возбуждение. Кодирование передаваемой по нервным волокнам информации осуществляется за счет разной конфигурации рядов импульсов (различная частота следования, постоянный или меняющийся ритм, продолжительность рядов и т. п.) (рис. 3.24). В нервной системе волокна служат согласующим звеном, и их функция заключается в передаче заданной информации без искажений, с высокой скоростью и лабильностью.

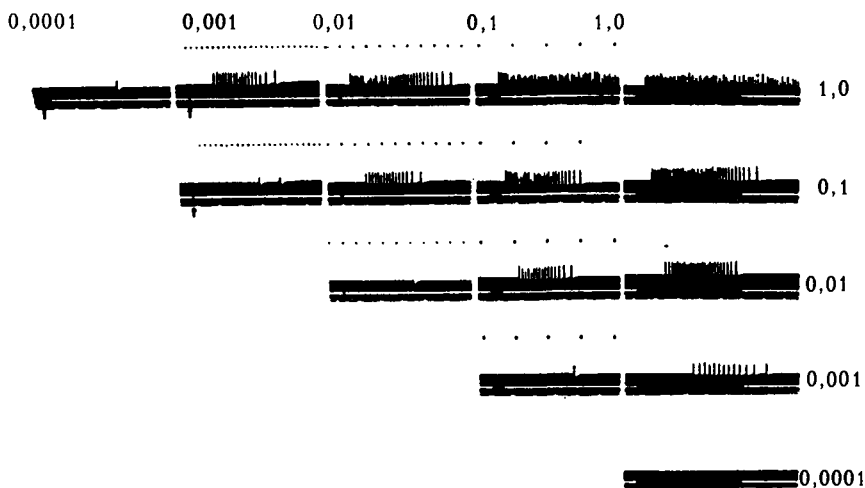


Рис. 3.24. Импульсы в зрительном нервном волокне. Цифры сверху — длительность вспышки света от 0,0001 до 1,0 с; цифры справа — относительная интенсивность вспышки; период освещения глаза указан разрывом белой линии; отметка времени (0,2 с) показана точками

Прежде чем остановиться на сути этих закономерностей распространяющегося возбуждения, ознакомимся с механизмом проведения ПД по нервным волокнам.

3.2.2.1. Проведение потенциалов действия (теория местных токов)

Теория местных токов, объясняющая процесс распространения ПД по мышечным и нервным волокнам, была предложена Л. Германном (L. Hermann) во второй половине XIX в. Согласно этой теории между возбужденным и невозбужденным участками волокна возникают токи (как и между интактным и поврежденным участками). Ток, выходящий из данного участка мембраны нервного волокна, служит своеобразным раздражителем для соседнего участка, затухая в месте его инициации (рис. 3.25). Теория местных токов сохраняет свое значение и сегодня, когда разработаны представления о мембранах и их роли в физиологических процессах.

Проведение ПД возможно благодаря кабельным свойствам нервных волокон. Кабелем называют проводник электричества, окруженный изолятором и погруженный в проводящую среду. При подаче сигнала создается разность потенциалов между «жилой» кабеля и окружающей средой. Так как изоляция кабеля неидеальна, то ток вытекает в окружающую среду. Сигнал проходит по кабелю независимо от того, что находится на другом его конце, где этот конец расположен, как он изолирован. Чтобы сигнал прошел по всей длине кабеля без затухания, необходима надежная изоляция. Эта проблема впервые возникла у инженеров при прокладке трансатлантического телеграфного кабеля.

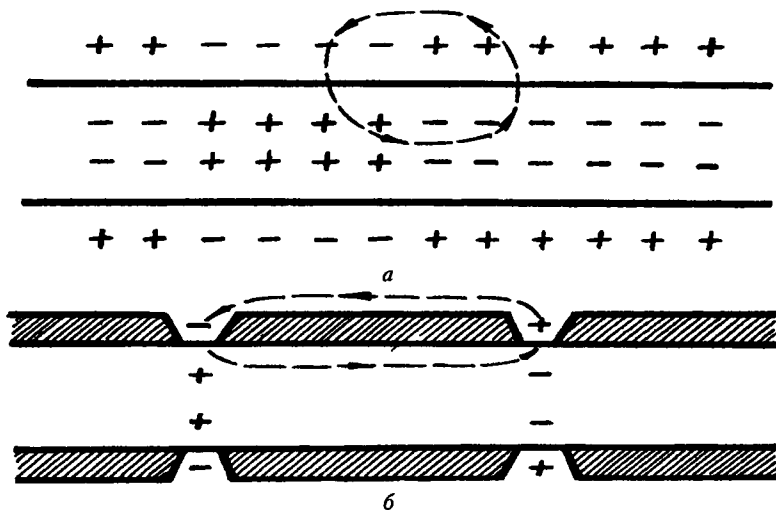


Рис. 3.25. Механизм проведения нервного импульса: *a* — непрерывное проведение в немиелиновом волокне; *б* — сальтаторное (скачкообразное) проведение в миелиновом волокне от одного перехвата Ранвье к другому

Нервное волокно можно с полным основанием сравнить с кабелем: мембрана имеет высокое сопротивление (от 500 до 10 000 Ом/см²) и большую емкость (1 — 5 мкФ/см²). Она разделяет два раствора с низким сопротивлением — окружающую среду и аксоплазму, которую лишь условно можно называть раствором. По существу, ПД при распространении возбуждения возникает бесконечное число раз, создавая цепь возбужденный участок — аксоплазма — невозбужденный участок — внешняя среда. Согласно теории местных токов скорость распространения возбуждения должна зависеть от сопротивления среды, окружающей волокно (сопротивление аксоплазмы практически постоянно), что было подтверждено А. Ходжкиным. Он определял скорость проведения ПД, помещая нервные волокна в среды с разным сопротивлением (в морскую воду и масло). В экспериментах с гигантским

аксоном было показано, что разница в скорости проведения ПД волокна, находящегося в морской воде и масле, весьма заметна: в последнем скорость проведения значительно ниже.

3.2.2.2. Факторы, определяющие скорость проведения потенциала действия

На примере распространения ПД можно проследить связь между физическими параметрами возбудимых клеток и рядом физиологических процессов. При сдвиге мембранного потенциала (потенциала покоя) до критического уровня местный процесс формирования локального ответа переходит в распространяющийся. Скорость проведения ПД определяется несколькими факторами, в частности диаметром волокна и степенью его изоляции от внешней среды (миелинизация).

При проведении возбуждения в каждом последующем участке первого волокна ПД возникает вновь; скорость его появления и дальность распространения локальных изменений определяют скорость проведения ПД (v). В немиелиновом волокне v находят по формуле

$$v = S\lambda/\tau,$$

где S — фактор надежности; λ — пространственная константа; τ — временная константа.

Временная константа характеризует длительность нарастания и падения изменений мембранного потенциала и зависит от сопротивления и емкости мембраны:

$$\tau = R_m C_m,$$

где R_m — сопротивление мембраны; C_m — емкость мембраны.

Пространственная константа характеризует протяженность распространения надпороговой деполяризации:

$$\lambda = (R_m/R_i)^{1/2},$$

где R_m — сопротивление мембраны; R_i — сопротивление внешней среды.

На рис. 3.26 показано соотношение λ и l (l — расстояние от места раздражения, мм, на котором местный градуальный потенциал снижается до $1/l$ своей исходной величины). С λ и l связана скорость распространения ПД. Так, для гигантского аксона кальмара $\lambda \approx 5$ мм, а скорость проведения ПД равна 25 м/с; для скелетной мышцы лягушки $\lambda = 2$ мм, а скорость проведения — от 3 до 7 см/с.

Для перехода местного процесса — локального ответа возбудимой мембраны в распространяющийся уровень деполяризации должен иметь величину, характерную для данной возбудимой клетки. Раздражителем служит ПД, который вызывает деполяризацию соседнего участка волокна. Фактор надежности этого процесса определяют как соотношение между амплитудой ПД и критическим уровнем деполяризации мембраны. Например:

$$S = \text{ПД} / (\text{ПП} - \text{МП}_{\text{кр}}) = 120 / (70 - 55) = 8.$$

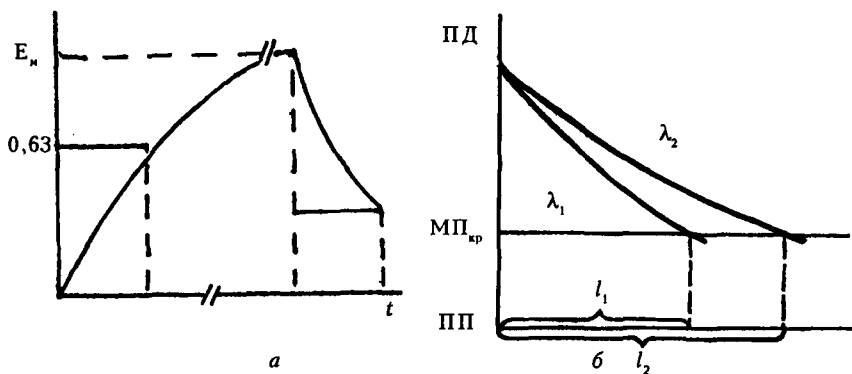


Рис. 3.26. Факторы, определяющие скорость проведения потенциала действия: *a* — временная константа характеризует время нарастания и спада мембранного потенциала, зависит от сопротивления и емкости мембраны; *б* — пространственная константа (λ) характеризует дальность (l) распространения надпороговой деполяризации

Скорость проведения ПД в немиелиновых волокнах может быть повышена лишь за счет увеличения диаметра волокна, т. е. поперечно-го сечения, и, следовательно, уменьшения сопротивления. В большинстве первых волокон беспозвоночных животных диаметром от 0,5 до 20,0 мкм скорость проведения не превышает 4 — 5 м/с, что вполне достаточно для животных с малоподвижным образом жизни. Однако и здесь встречаются исключения; в первую очередь это относится к некоторым видам головоногих моллюсков — кальмарам и каракатицам. В норме по тонким волокнам нервных стволов кальмара или каракатицы идут редкие импульсы (не выше нескольких в секунду или один в несколько секунд). Однако образ жизни этих моллюсков предусматривает и стремительные рывки (нападение на добычу или уход от опасности). В таком случае требуются быстрая передача сигнала, высокая скорость проведения ПД.

Для выполнения функции проведения возбуждения в экстремальных условиях жизни животного у головоногих моллюсков в ходе эволюции произошло слияние нескольких десятков и даже сотен тонких волокон, в результате чего образовались гигантские аксоны диаметром до 1 мм. Проведение РВ в таком аксоне требовало рационального энергообеспечения. Действительно, при проведении ПД через 1 см^2 мембраны аксона выходит 4 мкмоль калия. С учетом того что диаметр волокна составляет 500 мкм, при одном ПД теряется $1/10^6$ всего калия аксоплазмы. Другими словами, гигантский аксон способен провести $5 \cdot 10^5$ ПД без «перезарядки» калиевой «батареи» за счет энергии АТФ.

Сказанное свидетельствует о том, что проведение одиночного ПД не нуждается в экстремном энергообеспечении. Проведение РВ в тонких волокнах (обладающих высоким соотношением поверхность —

объем) требует значительных затрат АТФ. Действительно, при диаметре волокна 1 мкм и при аналогичном выходе калия потеря соответствует $1/10^3$ части калия аксоплазмы. Очевидно, гигантское волокно в большей мере приспособлено к проведению залпов импульсов высокой частоты с большой скоростью. Оно обладает значительным запасом прочности, так как залпы высокой частоты в аксоне коротки и возникают достаточно редко (стремительные броски животного). Так, в порме частота проводимых ПД в гигантском аксоне составляет 3 — 6 имп./мин, а при броске возрастает приблизительно в 10 000 раз.

Таким образом, на примере аксона кальмара показаны связь структуры и функций нервного волокна, а также зависимость характеристик возбуждимых образований от образа жизни животных. Однако гигантский аксон скорее исключение, чем правило. Путь повышения скорости проведения ПД путем наращивания диаметра аксона не мог быть перспективным для позвоночных животных, образ жизни которых постоянно требует более высоких скоростей распространения нервного импульса. Согласно теории местных токов повышение скорости проведения ПД может быть достигнуто не только за счет падения внутреннего сопротивления (увеличение поперечного сечения волокна), но и вследствие повышения сопротивления мембраны, окружающей аксон. Эту функцию в процессе эволюции выполняет миелин (табл 3.3).

Таблица 3.3

Характеристика волны возбуждения в нерве краба и лягушки

Параметр	Нерв холодильной конечности травяного краба	Седалищный нерв лягушки
Длительность высоковольтной части (пика, или спайка) потенциала действия, мс	3 — 4 (общий ствол)	2 — 3 (общий ствол) 0,6 — 0,9 (волокна А)
Скорость проведения, м/с	5,3 (быстрые волокна)	47 (волокна А)
Следовая негативность (после стимуляции 1 мин)	2 — 3 мин	1,5 с
Теплопродукция покоя, Дж/г в 1 ч	0,69	0,25
Начальное тепло на 1 имп., Дж/г	$3 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
Потребление O_2 в покое, см ³ /г в 1 мин	$143 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
Потребление O_2 на 1 имп., см ³ /г	$23 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$

* Данные для одного импульса определяли при пересчете результатов, полученных при более или менее продолжительной ритмической стимуляции нерва.

Для миелиновых нервов характерно сальтаторное проведение. Поскольку сопротивление в миелиновых сегментах значительно выше,

чем в межмиелиновых перехватах, ПД генерируется именно в последних и распространяется скачкообразно от перехвата к перехвату. Обсуждая факторы, определяющие скорость проведения ПД в миелиновых волокнах, как правило, учитывают расстояния между перехватами (L), соотношение между диаметром волокна (D) и его осевого цилиндра (d):

$$L/D = d/D (\ln D/d)^{1/2}.$$

Увеличение расстояния между перехватами обычно сопровождается усилением миелинизации: отношение $D/d = 1/0,6$, скорость проведения потенциала действия $v = d \cdot 6$, время «перескока» с перехвата на перехват — 0,07 мс. Эта величина практически одинакова у всех миелиновых волокон, хотя отношение L/D может варьировать.

Если в немиелиновых волокнах скорость проведения пропорциональна $D^{1/2}$, то в миелиновых — D . Таким образом, эволюция нервной системы отработала два механизма повышения скорости распространения ПД: увеличение диаметра нервного волокна и усиление миелинизации, повышающее кабельные свойства волокна (см. табл. 3.3).

Известно, что длина и площадь перехвата Ранвье меняются даже при незначительном изменении функционального состояния нервного волокна (например, при длительном РВ). Если перехват между миелиновыми сегментами возрастает, то сопротивление падает и процесс «перескока» ПД облегчается, что снижает суммарный порог и увеличивает скорость проведения возбуждения.

3.2.3. ИОННЫЙ КАНАЛ

В настоящее время считается доказанным, что возбудимость нервных и мышечных клеток, генерация и распространение ПД связаны с функционированием специализированных мембранных белков — ионных каналов. Ионные токи, проходящие через каналы, являются непосредственной причиной возникновения ПД. Между изменениями мембранного потенциала и величинами ионных токов в мембране существует характерная зависимость: сдвиг мембранного потенциала при стимуляции приводит к изменению ионной проводимости мембраны и соответственно величины и направления ионных токов.

При переходе возбудимой клетки от состояния покоя к функционированию ионные каналы претерпевают комплексные конформационные изменения. Хотя и существует несколько представлений о численности конформационных состояний канала (теория одиночного канала-поры или теория канала — агрегата протоканалов), но последовательность изменений конформации (на примере Na-канала) можно представить как комплекс следующих состояний: закрытое — активированное — инактивированное.

В настоящее время рассматриваются две основные структурно-функциональные модели ионного канала:

1) ионный канал имеет единственную пору. Подсостояния канала (промежуточные состояния канала при прохождении цикла от состояния покоя до состояния инактивации) возникают благодаря флуктуации эффективного диаметра поры;

2) одиночный канал — это ансамбль (агрегат) протоканалов (одиночных пор), расположенных в мембране параллельно друг другу. Все протоканалы взаимосвязаны, функционируют синхронно, что проявляется как работа одного канала. Подсостояния канала следующие:

— при активации протоканалов подсостояния кратны и квантованы;

— величина электрического скачка проводимости активированного протоканала составляет несколько пикосименсов;

— переход канала между подсостояниями проводимости является кооперативным процессом;

— при активации протоканалов подсостояния проводимости могут распадаться на независимые группы (олигомеры) вплоть до мономеров;

— свойства канала (селективность, потенциалзависимость) идентичны во всех кооперативных подсостояниях;

— при распаде совокупности протоканалов на олигомеры свойства проводимости меняются;

— реагенты на S—S-группы белков способствуют формированию олигомеров, а реагенты на SH-группы восстанавливают синхронность работы всех протоканалов канала;

— двухвалентные катионы (Ca и Ba) синхронизируют переходы протоканалов между подсостояниями.

Согласно теории Ходжкина—Хаксли активация ионного канала последовательно проходит ряд состояний: в ответ на положительный сдвиг мембранного потенциала субъединицы канала переходят в активную конформацию, затем взаимодействуют друг с другом; после взаимодействия трех (в случае Na-канала) субъединиц данный канал переходит в активное состояние (открывается), пропуская ионы натрия в клетку. Дальнейшие изменения конфигурации субъединиц переводят канал в инактивированное состояние. Предполагается, что каждый переход может совершаться в обоих направлениях, но на практике большая часть каналов проходит полный цикл — от состояния покоя до инактивации и обратно. Механизмы активного и инактивированного канала представлены на рис. 3.27, 3.28.

В соответствии с теорией Ходжкина — Хаксли проводимость натриевого (g_{Na}) и калиевого (g_K) канала может быть описана следующими уравнениями:

$$g_{Na} = *g_{Na} m^3 h;$$
$$dm/dt = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m;$$
$$dh/dt = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h;$$

$$g_K = *g_K n^4,$$

$$dn/dt = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n,$$

где $*g_{Na}$ — максимальная проводимость канала; m — вероятность активации канала; h — вероятность инактивации канала; α, β — потенциал-зависимые константы скорости прямой и обратной реакции процесса активации канала; $*g_K$ — максимальная проводимость канала; n — вероятность активации канала.

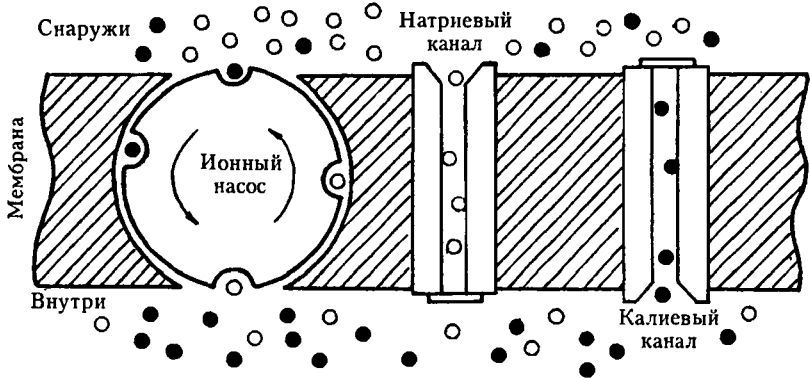


Рис. 3.27. Схематическое изображение ионных каналов в плазматической мембране. На схеме натриевый и калиевый каналы-поры показаны с закрытыми «воротами». При открытии каналов ионы движутся по градиенту («вниз по склону»). Канал-насос переносит ионы натрия (о) и калия (•) против градиента («вверх по склону»)

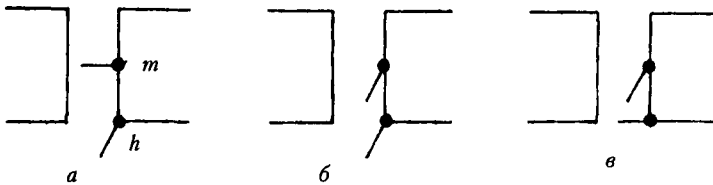


Рис. 3.28. Схематическое изображение положения активационных (m) и инактивационных (h) «ворот» натриевых каналов: a — в состоянии покоя; b — при активации; v — при инактивации

Физические принципы при моделировании транспорта иона через канал

В настоящее время при оценке физических параметров, регулирующих проникновение иона через канал, постулируется следующее:

— поступление иона в канал сопровождается заменой воды гидратной оболочки на полярные группы селективного фильтра канала (гидратация иона);

— взаимодействие иона с зарядами, выстилающими пору канала, определяется профилем энергии барьера (W):

$$W = \frac{e^2}{2a(1/\epsilon_k - 1/\epsilon_c)} - \frac{e^2}{(a+c)\epsilon_k},$$

где a — радиус иона; ϵ_k — диэлектрическая проницаемость канала; ϵ_c — диэлектрическая проницаемость среды; c — радиус анионной группы;

— при прохождении через канал ион долго задерживается в «потенциальной яме», «перескок» возможен только в пустую «потенциальную яму», второй ион не может находиться в занятой «потенциальной яме»;

— «перескоки» между «потенциальными ямами» осуществляются под действием тепловых флуктуаций. Вероятность «перескока» зависит от величины приложенного электрического поля.

В рассматриваемой модели предполагается, что при активации канала происходит переход от неактивного состояния канала (число неактивных каналов — N_n) к активному (число активных каналов — N_a). Тогда если $N = N_n + N_a$, a и b — константы соответственно прямой и обратной реакции активации канала, то

$$dN/dt = aN_n - bN_a = aN - aN_a = aN - (a + b)N_a.$$

При сдвиге МП, приводящем к открыванию всех каналов, кинетика перехода будет соответствовать выражению

$$N_a(t) = N[1 - \exp(-t/\tau)],$$

где τ — характерное время, $\tau = 1/(a + b)$.

В рассмотренной модели проводимость возрастает по экспоненте до стационарного уровня.

3.2.4. ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Ионные каналы — это белковые молекулы, окруженные заряженными липидами, которые активно участвуют во всех мембранных процессах. На поверхности клеточной мембраны находятся фиксированные заряженные группы белков и липидов, участвующие в формировании трансмембранного потенциала. В комбинации с диффузионным потенциалом потенциал заряженных групп влияет на проницаемость мембраны и функционирование ионных каналов. Количественное описание поверхностных потенциалов и их изменений основывается на модели, разработанной Г. Гуи и Р. А. Чапменом (рис. 3.29, 3.30).

Регистрируемый с помощью микроэлектродов клеточный мембранный потенциал (E_m) складывается из суммы поверхностных потенциалов обеих сторон мембраны и потенциала покоя:

$$E_m = E_{нар} + E_{вн} + ПП,$$

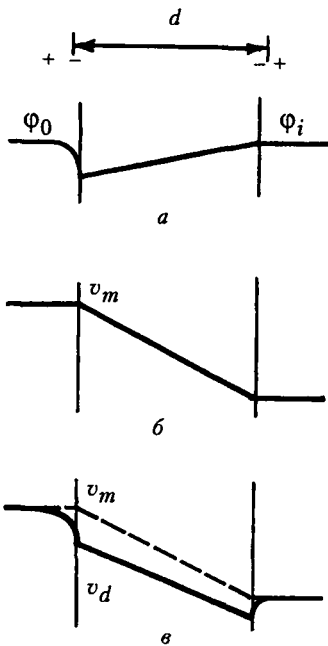


Рис. 3.29. Распределение потенциала в системе раствор — мембрана — раствор: *a* — в отсутствие градиента концентрации проникающего иона и при наличии фиксированного заряда на мембране; *b* — в отсутствие фиксированного заряда на мембране и при наличии градиента концентрации проникающего иона; *v* — отрицательные фиксированные заряды и градиент концентрации проникающего иона. Здесь v_m — разность потенциалов между растворами; Φ_0 — потенциал внешней поверхности мембраны; Φ_i — потенциал внутренней поверхности мембраны; v_d — разность потенциалов на мембране; d — толщина мембраны

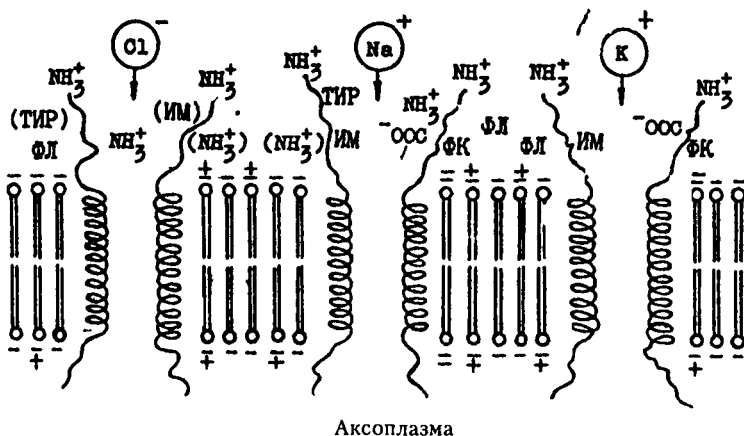


Рис. 3.30. Схема распределения поверхностного заряда на мембране, участвующего в регуляции ионной проводимости нервного волокна. ФК — фосфатидная кислота; ИМ — имидазол; ТИР — тирозин; ФЛ — фосфолипиды; -ООС — ионизированные карбоксильные и фосфатные группы фосфолипидов

где $E_{\text{нар}}$, $E_{\text{вн}}$ — потенциал соответственно наружной и внутренней поверхности мембраны.

Известно, что модуляции поверхностного заряда мембраны влияют на характер активации потенциалзависимых каналов, т. е. меняют их вольт-амперные характеристики. Изменения E_m , зависящие от трех указанных выше компонентов, в целом влияют и на порог возбудимости клетки. Фиксированные заряды, формирующие поверхностный заряд, принадлежат мембранным белкам и липидам. На мембранах и в примембранных слоях существуют отрицательно и положительно заряженные группы. Так, при исследовании нервных волокон лягушки были выявлены 3 типа зарядов, причем 2 из них обусловлены кислотными группами белков и фосфолипидов ($C = O$), а третий — основными NH -группами. При низком рН кислотные группы нейтрализуются, основные заряжаются положительно. При высоком рН основные группы нейтрализуются, а кислые заряжаются отрицательно.

В модели Гуи — Чапмена рассматривается находящаяся в растворе электролита плоская поверхность мембраны с равномерно распределенными зарядами. На ионы, содержащиеся в растворе электролита в примембранном слое, действуют электростатические силы, наличие которых создает двойной электрический слой. Тепловое движение ионов регулирует диффузию ионов в двойном примембранном слое. Модель Гуи — Чапмена предусматривает экранирование поверхностного заряда ионами, находящимися в растворе электролита. Эффективность экранирования поверхностных зарядов двухвалентными ионами выше, чем одновалентными.

Важно, что изменения порога при генерации ПД нервных и мышечных клеток обычно зависят от экстраклеточной концентрации двухвалентных катионов и рН. Изменения поверхностного заряда при увеличении концентрации двухвалентных катионов приводят к гиперполяризации мембраны, и порог повышается. Такое действие двухвалентных катионов называют стабилизирующим. Согласно расчетам Г. Эйзенмана, при поверхностном потенциале 116 мВ и наружной концентрации ионов при $C_a 10^{-3}$ моль/л их примембранная концентрация составляет примерно 10 моль/л, т. е. в 10 000 раз больше, чем в растворе.

Воротные механизмы в ионных каналах

Активация потенциалзависимых каналов связана с перемещением в мембране подвижных зарядов, что создает воротный ток. Параллельно с ним возникает ионный ток, обусловленный прохождением ионов через канал. Для разделения этих токов используют блокаторы ионных каналов, не влияющие на воротные токи, или ионы, не проникающие через каналы. Воротные токи Na -каналов впервые были зарегистрированы К. Армстронгом (С. Armstrong), Р. Кейнсом, Ф. Безанилло (F. Bezanilla) и Е. Рохасом (E. Rojas) в исследованиях на внутриклеточно перфузируемом гигантском аксоне кальмара. Для подавления

Na-тока применяли блокатор Na-каналов тетродотоксин. Вместо ионов Na использовали крупные непроницающие катионы, а калий заменяли цезием. В этих условиях был выявлен воротный (или так называемый асимметричный) ток.

Рассмотренная ранее модель активации потенциалзависимого канала предполагает, что его открыванию предшествует перемещение воротных заряженных частиц (связанных с мембраной). Ток воротных частиц не зависит от величины и направления градиента проникающих ионов и сохраняется в присутствии блокаторов (тетраэтиламмония и др.). Ток смещения воротных заряженных частиц асимметричен, т. е. проявляется только при деполяризации мембраны нервного волокна. Так как кинетика воротного тока может быть представлена в виде соотношения $N_a(t) = N[1 - \exp(-t/\tau)]$, то воротный ток

$$I_B = dN_a/dt = -N \exp(-t/\tau).$$

Тогда доля открытых каналов может быть определена из следующего соотношения (рис. 3.31):

$$N_a / N = \frac{a}{a+b} = \frac{1}{1+b/a}.$$

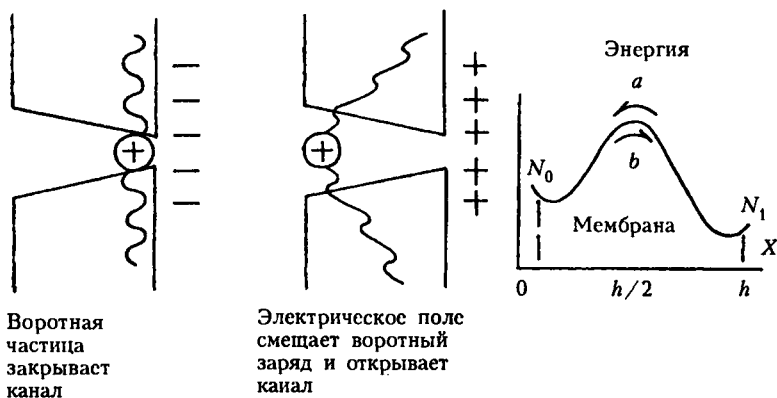


Рис. 3.31. Схема воротных механизмов в ионных каналах

Электрический потенциал мембраны влияет на перенос воротных частиц так же, как и на перенос транспортируемого иона, т. е.

$$a = a_a \exp(zE/2), \quad b = b_a \exp(zE/2).$$

В итоге

$$N_a / N = \frac{1}{1 + k_a \exp(-zE)}, \quad \text{если } k_a = b_a / a_a.$$

Ток через мембрану, содержащую N каналов, равен $I = iNp$, где i — ток через один канал, $i = g(E - *E)$; p — вероятность открытого состояния канала, $p = N_a/N$.

Через открытый канал протекает ток, пропорциональный его проводимости (g). Если мембранный потенциал E равен равновесному потенциалу $*E$, то тока нет; при $E > *E$ ток выходит из клетки, а при $E < *E$ ток направлен внутрь. Например, для натриевого канала $*E = 50$ мВ. Таким образом, для возбудимых мембран характерны вольт-амперные характеристики с участком отрицательного наклона (отрицательного сопротивления).

3.2.5. ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ КАНАЛЫ

3.2.5.1. Потенциалзависимый натриевый канал

Понятие «ионный канал» в современной мембранологии означает интегральный мембранный белок (или гликопротеид), находящийся в липидном бислое мембраны и осуществляющий перенос ионов с одной стороны мембраны на другую за счет электрохимического градиента. Во многих случаях канал структурно связан с другими мембранными белками и компонентами цитоскелета. Протеиновый комплекс канала может состоять из нескольких тысяч аминокислот, организованных в одну или несколько полипептидных цепей с несколькими сотнями ковалентно связанных полисахаридных цепей на наружной поверхности. Гидрофильные аминокислоты «выстилают» внутренность поры, а гидрофобные контактируют с липидным бислоем.

Молекулярная структура (полная аминокислотная последовательность) установлена пока для небольшого числа ионных каналов (в частности, для Na- и Ca-каналов) и нескольких типов рецепторов, в частности для ацетилхолинового рецептора. Наиболее полные сведения о первичной структуре каналов можно получить с помощью методов молекулярной биологии — расшифровка аминокислотной последовательности белков по нуклеотидной последовательности комплементарной ДНК и др. Группа японских ученых-биохимиков установила первичную структуру Na-канала, выделенного из плазматических мембран электрической пластинки угря. В структуре белка обнаружены четыре гомологичных домена, содержащих по пять гидрофобных, амфифильных и один характерный сегмент с большим положительным зарядом (гомологичные домены расположены последовательно) (рис. 3.32).

Ионная пора образуется при свертывании гомологичных доменов в цилиндрическую структуру так, что внутри цилиндра остаются гидрофильные участки амфифильных сегментов (они образуют стенки поры), а снаружи — гидрофобные участки, контактирующие с липидами мембран. Сведения о функциях ионных каналов получены лишь в

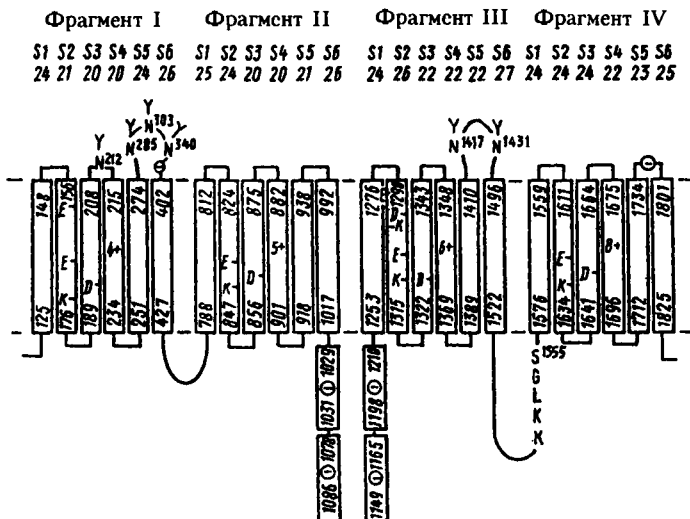


Рис. 3.32. Модель укладки последовательности аминокислот Na-канала в мембране. Блоками показаны трансмембранные сегменты S1 – S6 четырех повторяющихся фрагментов I – IV. Номера сегментов и число образующих их аминокислотных остатков объединенной структуры приведены по краям блоков. Функционально важные остатки сегментов обозначены в однобуквенном коде. Вилки показаны общие для структур участки N-гликозилирования (Asn-X-Ser(Thr)), где X – любая аминокислота, за исключением Pro). S⁵⁵⁵ – единственный общий для всех структур участок фосфорилирования с АМФ-зависимой протеникиназой (Lys(Arg)-Lys (Arg)-X(X)-Ser(Thr)). Знаки ↔ и ↔ обозначают доминирующий заряд выделенных участков цепи

результате исследований ионных потоков при воздействии на каналы различными физико-химическими и фармакологическими агентами. Практически вся информация о свойствах Na-каналов выявлена при изучении гигантского аксона кальмара и перехватов Ранвье. Так, В. К. Чандлер (W. K. Chandler) и Г. Мевес (H. Meves) установили, что проницаемость Na-каналов для катионов щелочных металлов меняется следующим образом:



Если принять проницаемость канала для Na⁺ за единицу, то для лития, натрия, калия, рубидия и цезия она будет равна соответственно 1,1; 1,0; 0,083; 0,025; 0,016.

Данные, полученные при анализе проницаемости Na-каналов в перехватах Ранвье нервных волокон, послужили Б. Хилле (B. Hille) основанием для создания модели структуры канала, согласно которой вход в Na-канал имеет прямоугольную форму; размер поры составляет примерно 0,3 – 0,5 нм (рис. 3.33, 3.34). Это минимальный размер

селективного фильтра, который необходим для того, чтобы органические катионы, образующие водородные связи с атомами кислорода, могли пройти через Na-канал. Фильтр окружен восемью атомами кислорода. В нем находится ион Na с молекулой воды. Связанная с ионом молекула воды образует водородные связи с атомами кислорода. При исследовании проницаемости Na-каналов Б. Хилле обнаружил такую последовательность: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Tl}^+ > \text{K}^+$.

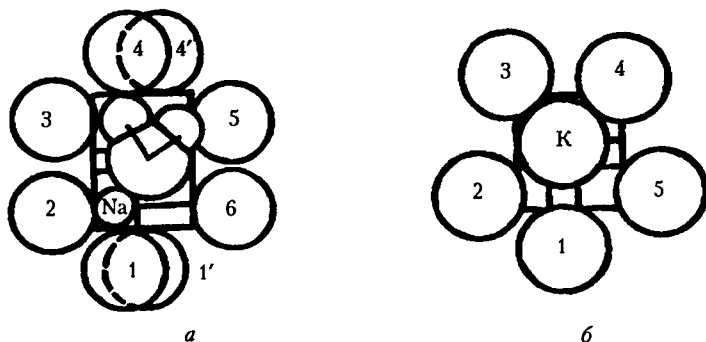


Рис. 3.33. Гипотетическая структура селективных фильтров Na- и K-каналов с проникающими ионами. В Na-канале находится молекула H_2O ; 1 и 1' (Na-канал) – отрицательно заряженная группа $-\text{COO}^-$. Все остальные кружки с цифрами – атомы кислорода; а – Na-канал; б – K-канал



Рис. 3.34. Схема строения ионного (натриевого) канала

Соотношение P_K/P_{Na} составляет 1/12. В Na-канале имеется карбоксильная кислотная группа. Она создает сильное электрическое поле и обеспечивает селективность транспортируемых ионов.

Важную роль в идентификации ионных каналов и разделении ионных токов, проходящих через все типы ионных каналов, играют вещества, избирательно подавляющие ионную проницаемость. Среди блокаторов особое место принадлежит тетродотоксину и сакситоксину. Первый содержится в яичниках, печени и коже рыб семейства Tetrodotidae (иглобрюхие) и, действуя на наружное устье канала, подавляет ПД в нервах и мышцах. Второй присутствует в организме некоторых жгутиковых и ингибирует натриевую проводимость в тех же концентрациях, что и ТТХ.

В медицинской практике многие годы применяются местные анестетики, которые, блокируя Na-каналы, препятствуют возникновению ПД. Большинство из них являются третичными аминами и могут находиться в двух формах — заряженной и нейтральной. Многочисленные исследования показали, что местные анестетики в заряженной форме блокируют Na-каналы, лишь размещаясь внутри клетки и проникая во внутреннее устье Na-канала. Там они связываются с рецептором, расположенным между воротами и селективным фильтром канала. Таким образом, для взаимодействия молекулы заряженного анестетика с Na-каналом необходимо, чтобы канал был открыт (активирован). В нейтральной форме местные анестетики, растворяясь в липидах мембраны, могут взаимодействовать с тем же рецептором вне внутреннего устья канала. В данном случае они связаны как с открытыми, так и с закрытыми Na-каналами.

Существуют также агенты, ликвидирующие инактивацию Na-каналов. К ним относятся верапамил, аконитин, батрахотоксин. Все они липидорастворимы. При их действии открытое состояние длится в 50 раз дольше, чем в нормальных условиях.

3.2.5.2. Потенциалзависимый калиевый канал

Потенциалзависимые калиевые каналы играют важную роль в электрической активности многих клеток. Активация этих каналов способствует: реполяризации мембраны во время ПД; развитию гиперполяризации мембраны, что играет большую роль в формировании ритмической активности ряда возбудимых клеток. Существует несколько разновидностей потенциалзависимых K-каналов, различающихся по способности инактивироваться (кинетика активации и инактивации) и реакцией на действие фармакологических агентов. В глиальных клетках обнаружены потенциалзависимые K-каналы, которые регулируются как мембранным потенциалом, так и нейромедиаторами и гормонами. В нейронах симпатических ганглиев амфибий обнаружены K-каналы, деактивирующиеся при воздействии на нейрон ацетилхолина, вызывающего активацию мускариновых холинорецепторов. Эта активация приводит

к появлению внутри клетки вторичного посредника и подавлению функции калиевых каналов.

Данные о свойствах калиевых каналов получены преимущественно в результате исследований, проведенных на гигантском аксоне кальмара, а также на перехватах Ранвье миелинизированных нервных волокон лягушки. В первом случае было выявлено, что во время деполяризации происходит относительно быстрый, но кратковременный рост натриевой проводимости и более медленный, стойкий — калиевой. Натриевые и калиевые каналы возбудимых мембран пространственно разобщены. В качестве доказательства этого обычно приводят данные о возможности изолированного подавления как натриевой, так и калиевой проводимости мембраны при действии ТТХ, СТХ и блокатора К-канала — ТЭА. К. Армстронг рассматривал К-канал как пору, активационные «ворота» которой расположены на цитоплазматической стороне канала. Внутреннее устье канала расширено и открыто для полностью гидратированных ионов калия, а также ТЭА. За расширенным устьем следует избирательная узкая часть канала. При изучении избирательности калиевых каналов в перехватах Ранвье миелинизированных нервных волокон для небольших катионов Б. Хилле обнаружил такую последовательность:

$$P_{\text{Тl}} : P_{\text{К}} : P_{\text{Rb}} : P_{\text{NH}_4} = 2,3 : 1,0 : 0,92 : 0,13.$$

Проводимость калиевых каналов (как и натриевых) блокируется при снижении экстраклеточного рН вследствие протонирования кислотной группы, находящейся в канале. Диаметр узкой части калиевого канала составляет 0,3 нм. Она проницаема для ионов с кристаллическим диаметром от 0,26 (K⁺) до 0,296 нм (Rb⁺, NH₄⁺). Через нее не могут пройти как большие (Cs⁺ — 0,33 нм, ТЭА⁺ — 0,8 нм), так и меньшие (Na⁺ — 0,19 нм, Li⁺ — 0,14 нм) ионы. Ион, проходящий через пору, должен потерять гидратную оболочку, что важно только для взаимодействия дегидратированного иона с зарядами поры. Ион диаметром более 0,33 нм не может войти в пору, а менее 0,26 нм не проникает в нее, поскольку не взаимодействует с атомами кислорода, локализованными в ее стенке. Например, ион калия связывается со всеми пятью атомами кислорода, окружающими просвет поры, а ионы натрия — лишь с двумя. Три других атома кислорода не могут приблизиться к иону натрия из-за ригидности стенки поры, поэтому вход в нее ионов натрия маловероятен.

3.2.5.3. Потенциалзависимый кальциевый канал

Селективное поступление ионов кальция в клетку происходит через потенциалзависимые и лигандозависимые кальциевые каналы. На основании электрофизиологических данных и фармакологических исследований выделены несколько типов потенциалзависимых Ca-каналов, различающихся пороговым уровнем активации, временем жизни в

открытом состоянии, скоростью инактивации, величиной элементарной проводимости и фармакологическими свойствами. Потенциалзависимые кальциевые каналы присутствуют в плазматической мембране практически всех клеток, обладающих электрической возбудимостью (рис. 3.35). Второй тип кальциевых каналов связан с мембранными рецепторами, взаимодействующими в основном с нейромедиаторами и гормонами. Этот класс изучен значительно меньше.

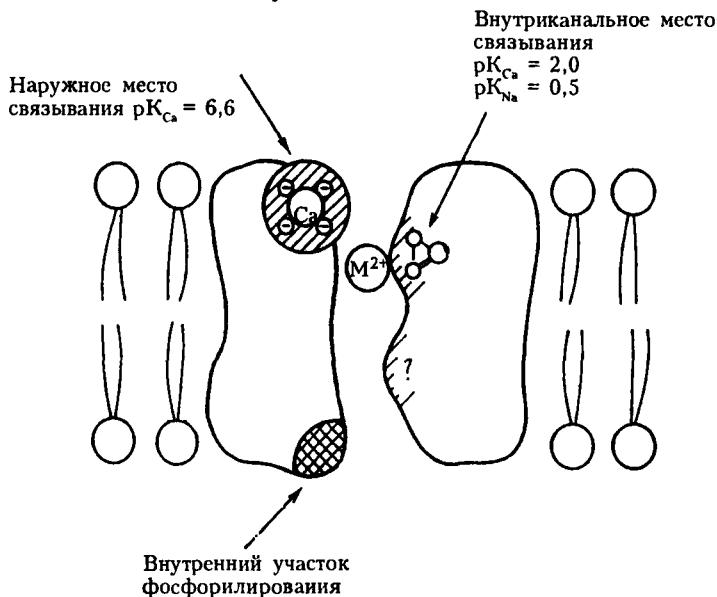


Рис. 3.35. Схематическое изображение участков связывания в кальциевом канале

Рассмотрим основные типы Са-каналов.

Дигидропиридинчувствительные Са-каналы L-типа (ДКК). Этот тип Са-каналов хорошо изучен и идентифицирован во многих клетках: нейронах ПНС и ЦНС, клетках сердечной мышцы, гладких мышц и нейронах моллюсков. ДКК играют важную роль в сократительной активности клеток скелетных мышц, активируются при высоких значениях мембранного потенциала (более -10 мВ), характеризуются высокой проводимостью (25 пСм) и медленной кинетикой инактивации. ДКК блокируются кальциевыми антагонистами трех различных групп: верапамилом, нифедипином, а также D-цис-дилтиаземом.

Са-каналы T-типа (ККТ) характеризуются при слабой деполяризации быстрой кинетикой инактивации, относительной нечувствительностью к дигидропиридидам и низкой проводимостью для Ca^{2+} . ККТ выделены во многих возбудимых и невозбудимых клетках (фибробласты, В-лимфоциты). Сходство ККТ и ДКК заключается в том, что они

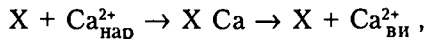
проницаемы для ионов натрия в среде, не содержащей двухвалентных катионов, и блокируются микромолярными концентрациями ионов Са потенциалзависимым образом. ККТ обеспечивают пейсмейкерную активность и вход ионов Са при отрицательных мембранных потенциалах, блокируются тетраметрином, амилоридом и октанолом.

Са-каналы N-типа (ККН). Для ККН характерны активация при высоких потенциалах (более -20 мВ), относительно быстрая инактивация, проводимость (13 пСм), чувствительность к конотоксину и устойчивость к дигидропиридинам. ККН обнаружены в синапсосамах мозга, а также в нейронах коры мозга крыс. Каналы очень чувствительны к блокирующему действию ионов La и по селективным свойствам близки к ДКК. ККН активируются, как правило, при высвобождении медиаторов.

Са-каналы P-типа (ККП), впервые обнаруженные в клетках Пуркинье мозжечка, найдены в нейронах ЦНС и ПНС. Они активируются при потенциалах более чем -50 мВ, имеют очень медленную кинетику инактивации, нечувствительны к дигидропиридинам и конотоксину.

Са-каналы R- и Q-типа (ККRQ). В последнее время идентифицированы два новых типа Са-каналов, активирующихся при высоких мембранных потенциалах. ККRQ найдены в гранулярных клетках мозжечка, нейронах гипокампа и коры мозга. ККRQ обладают проводимостью в 15 пСм и высокой чувствительностью к блокирующему действию ионов Ni и конотоксина.

С. Хагивара (S. Hagiwara) и К. Такахаша (K. Takahashi) предположили, что важным промежуточным этапом в механизме проникновения ионов кальция через мембрану является их связывание с определенной структурой кальциевого канала. Переход ионов кальция из наружного раствора внутрь клетки схематически выглядит следующим образом:



где X — место связывания кальция; $Ca_{нар}^{2+}$ и $Ca_{вн}^{2+}$ — ионы кальция, находящиеся соответственно снаружи и внутри клетки. Согласно представленной схеме ионы кальция могут проходить через кальциевые каналы только внутрь клетки.

Повышение содержания кальция в наружном растворе вызывает увеличение кальциевого тока только в определенных пределах. Через кальциевые каналы достаточно легко проходят ионы Sr и Ba. Токи, переносимые ионами бария, нередко превышают кальциевые токи. Ионы бария обладают также способностью подавлять калиевые токи, поэтому в присутствии Ba^{2+} более четко выделяются токи, идущие по кальциевым каналам. Для кальциевых каналов плазматической мембраны гигантских мышечных волокон морского желудя характерно следующее соотношение токов при эквимольных концентрациях ионов в наружном растворе:

$$I_{Ca} : I_{Sr} : I_{Ba} = 1,00 : 1,05 : 1,30.$$

Многие двухвалентные ионы подавляют токи, текущие по кальциевым каналам. Основу такого действия составляет конкурентное связывание кальциевым каналом блокирующих ионов. С ионами кальция конкурируют ионы лантана. По данным С. Хагивары и К. Такахаша, по способности связываться с кальциевыми каналами мембран мышечных волокон морского желудка катионы располагаются следующим образом:



Ионы Ni, Cd, Co и Mn широко используются в качестве блокаторов Ca-каналов. При изучении свойств кальциевых каналов нейронов моллюсков П. Г. Костюк и О. А. Крышталь обнаружили, что в бескальциевом растворе, содержащем кальциевые хелаторы этиленгликольтетраацетат или этилендиаминтетраацетат, происходит модификация кальциевых каналов. Последние, сохраняя свою потенциалзависимость для ионов Ca, приобретают способность пропускать ионы Na. Обнаруженный феномен объясняется устранением селективного фильтра кальциевых каналов, благодаря чему в них могут проникать ионы натрия. Аналогичные результаты были получены на других возбудимых клетках — кардиомиоцитах сердца лягушки.

Инактивация кальциевых каналов представляет собой более сложный процесс, чем в случае натриевых каналов. Наряду с потенциалзависимой инактивацией в некоторых клетках отмечается инактивация, зависящая от силы входящего в клетку кальциевого тока, что рассматривается как результат повышения внутриклеточного уровня ионизированного кальция.

3.2.6. СИНТЕЗ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Синтез мембранных белков, в частности ионных каналов, а также секретируемых клеткой белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме. Синтезированные белки проникают в цистерны эндоплазматического ретикулума, а затем, поступив в полость комплекса Гольджи, подвергаются ковалентным модификациям, в результате которых приобретают конечную форму. Известно, что одной из главных функций последнего является сортировка белков. Синтез ионных каналов осуществляется в комплекс Гольджи нейрона, а затем они транспортируются в аксон, дендриты и нервные окончания.

Динамический характер популяции ионных каналов формирует изменения возбудимости, происходящие в период эмбрионального развития или после денервации нерва. Для скелетных мышечных волокон позвоночных характерно наличие холинорецепторов (ионных каналов, управляемых ацетилхолином) только в области синапсов (концевых пластинок). После денервации скорость синтеза холинорецепторов увеличивается и они распространяются по всей поверхности мы-

щечного волокна, а не только в области концевой пластинки, как до денервации. В открытом состоянии эти каналы имеют меньшую проводимость и большее время жизни, чем в норме. Кроме того, в плазматической мембране появляются натриевые каналы, которые в 1 000 раз менее чувствительны к ТТХ, чем нормальные. Воротные процессы в них протекают значительно медленнее (подобными свойствами обладают холинорецепторы и натриевые каналы культуры периннервированных эмбриональных мышц). После реиннервации холинорецепторы, расположенные вне синапсов, исчезают, как и натриевые каналы, мало чувствительные к ТТХ.

3.2.7. ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ

В настоящее время установлено, что генерация ПД и его проведение по нервным волокнам (как и другим специализированным возбудимым клеткам) не требуют непосредственного расхода энергии АТФ. Механизмы распространения возбуждения относительно независимы от метаболизма, который главным образом обеспечивает процессы восстановления и поддержания готовности к возбуждению. Нерв, находящийся в состоянии покоя, потребляет около половины энергии от той, которую он использует при максимальном РВ. Первые сведения о том, что работа возбудимых образований связана с затратами энергии, получены еще в начале XX в. Так, в 1913 г. было установлено, что при проведении нервом возбуждения выделяют углекислый газ и аммиак. В 1920-х гг. Р. В. Джерард (R. W. Gerard) и другие исследователи собрали сведения о метаболизме макроэргических фосфатов в нервных проводниках. Так, при длительной ритмической стимуляции уровень АТФ и креатинфосфата в нерве лягушки снижается примерно в два раза. Было обнаружено также изменение соотношения разных макроэргических фосфатов и получены доказательства связи этих изменений с характером и объемом выполняемой нервом работы (частота, продолжительность РВ и т. п.).

Исключительно большое значение в исследовании метаболизма возбудимых образований имеют публикации А. Хилла (A. Hill) и его учеников, посвященные измерению теплопродукции нерва. Установлено, что при возбуждении она проходит две стадии. Так называемое начальное тепло выделяется во время проведения возбуждения или сразу после ПД, что составляет всего $1/30$ часть общей теплопродукции. При восстановлении МП после РВ теплота, постепенно уменьшаясь, выделяется примерно еще час.

Начальное теплообразование изучено подробнее, чем теплообразование восстановления. Так, на нерве краба доказано, что изменение начального тепла происходит в две фазы:

- повышение температуры нерва на 10^{-5} °С;
- понижение температуры на $8 \cdot 10^{-6}$ °С.

Таким образом, за один импульс температура повышается на

$2 \cdot 10^{-6} \text{ }^{\circ}\text{C}$. На миелиновых нервах двухфазность выделения тепла наблюдать не удается, а на вегетативных это возможно лишь при условии охлаждения первого волокна.

Более четкие данные о потреблении энергии нервом в состоянии покоя были получены М. Березиной в 1932 г. Нерв краба в покое при температуре $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии O_2 высвобождает энергию, равную $9^{-2} \text{ Дж/г} \cdot \text{с}$. При возбуждении, вызванном непрерывным раздражением того же нерва с максимальной частотой, количество выделяемого тепла возрастает в два раза. Эти данные долго не получали объяснения, и лишь сравнительно недавно было установлено, что в нервах краба от 50 до 90 % энергии метаболизма используется на работу Нанасоса, «откачивающего» из клетки ионы Na . Впоследствии К. М. Коннелли (С. М. Connelly) удалось доказать, что в покое нерв поглощает кислород, что также свидетельствует об активных метаболических процессах, происходящих в нем в этом состоянии (рис. 3.36).

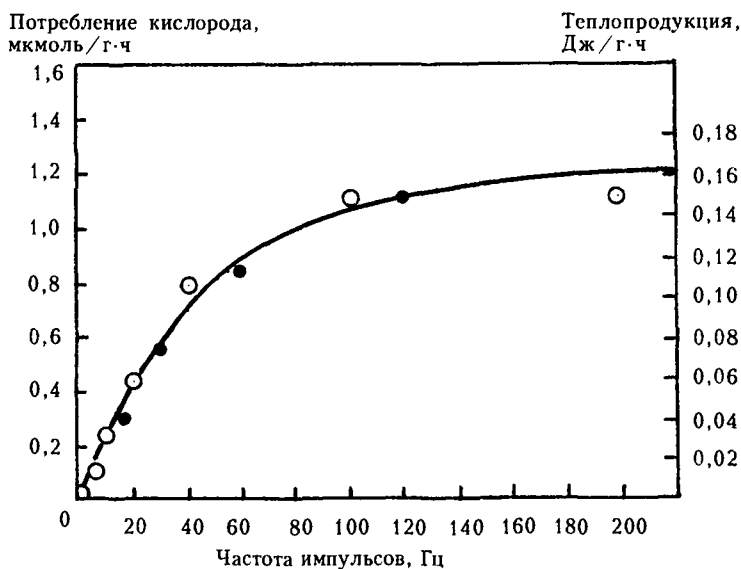


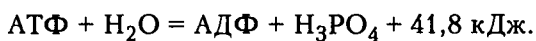
Рис. 3.36. Зависимость потребления кислорода (○) и теплопродукции (●) в седалищном нерве лягушки от частоты ритмического возбуждения

При анализе данных по энергетическому метаболизму нервов становится ясно, что существует корреляция между изменениями теплопродукции, потребления кислорода, содержанием и гидролизом макроэргов. Оказалось, что повышение функциональных возможностей нервов в эволюции происходит при одновременном снижении энергетических затрат на выполнение идентичной работы. Еще в первых публикациях, посвященных метаболизму нерва, отмечалось, что при переходе к более интенсивной работе (например, к более высоким ритмам

возбуждения) расход кислорода, макроэргических фосфатов или теплопродукция в пересчете на один ПД снижаются.

Следовательно, параллельно с волной электрических и электрохимических обратимых процессов, связанных с изменением уровня поляризации плазматической мембраны, распространяется волна структурно-метаболических изменений. На очереди у исследователей стоит расшифровка на молекулярном и субмолекулярном уровнях связи метаболизма и структурных (конформационных) изменений в мембране.

Биохимические процессы, поставляющие возбудимым клеткам энергию, не отличаются от таковых для живых клеток вообще. Основным источником энергии служит АТФ, а первичной реакцией, обеспечивающей работу, является ферментативное расщепление аденозинтрифосфата (рис. 3.37):



Рабочий механизм клетки

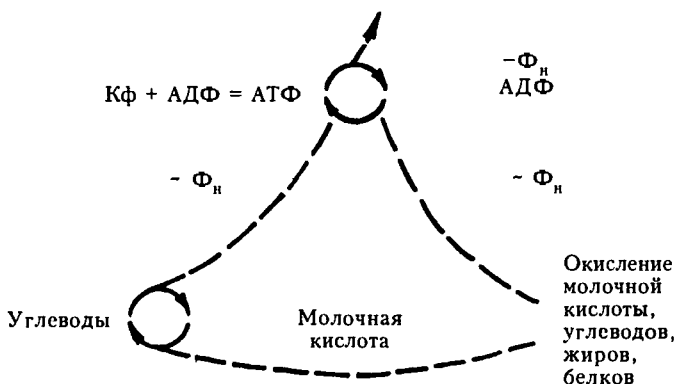


Рис. 3.37. Схема метаболизма, обеспечивающего энергией рабочий механизм клетки; пунктиром показан переиос энергии

Ресинтез АТФ может осуществляться анаэробным и аэробным путями. При недостатке кислорода энергию можно получить из креатинфосфата (у позвоночных) или из аргининфосфата (у большинства беспозвоночных), а также путем обогащения неэнергетизированных фосфатных связей за счет энергии, высвобождающейся в ходе ферментативного расщепления углеводов. Креатинфосфат и аргининфосфат содержат макроэргическую связь в готовом виде.

Открытие Дж. Скоу в 1957 г. Na, K-АТФ-азы способствовало пониманию роли метаболизма в процессах биоэлектrogenеза и расшифровке функции биологических мембран. Хотя конкретных результатов получено недостаточно, как мы уже убедились при выяснении роли

ионных каналов, некоторые факты заслуживают пристального внимания.

Окислительное фосфорилирование (основной источник макроэргических фосфатов) связано с митохондриями, которые в аксонах осуществляют синтез АТФ и регулируют ионный состав аксоплазмы. Контроль за содержанием АТФ в аксоне проводит и Na, K-АТФ-аза. Известно, что активация Na, K-АТФ-азы увеличивает содержание в клетке АДФ и F_{H_2} , что в свою очередь стимулирует окислительное фосфорилирование и поглощение кислорода. Детально механизм взаимосвязи работы митохондрий и АТФ-азы пока не изучен, но известно, что митохондрии скапливаются в местах с высокой активностью АТФ-азы (например, в области перехвата Ранвье во время возбуждения).

Установлено, что при ритмическом возбуждении характер электронно-транспортных процессов меняется. В опытах Б. Чанса (B. Chance) регистрировались изменения флуоресценции восстановленного НАД·Н₂ в зависимости от характера функционирования нерва. Обнаружено, что в начале РВ уровень флуоресценции снижается, а по окончании — возвращается к исходному значению. В связи с участием митохондрий в энергообеспечении РВ внимания заслуживают исследования корреляции между изменениями сигнала ЭПР и РВ нерва.

Следует отметить, что об энергетическом обеспечении клеточных процессов известно довольно много. Значительно меньше сведений о структурных перестройках в мембранах в результате их разнонаправленного функционирования; в частности, представления о конформационных изменениях в ионных каналах пока остаются гипотетическими. Поэтому представляют интерес данные П. Г. Костюка и других ученых о кальциевых каналах. Установлено, что наряду с обычными потенциалзависимыми Са-каналами существует другая их разновидность — каналы, непосредственно связанные с метаболизмом. В последние годы обнаружено, что циклический аденозин 365-монофосфат оказывает первичное действие на воротный механизм кальциевого канала в мембране сердечной мышцы за счет фосфорилирования его компонентов. Если эти данные будут уточнены и расшифрованы, то можно будет утверждать, что кальциевые каналы существенно отличаются от ранее идентифицированных натриевых и калиевых каналов. Для Na- и K-каналов метаболизм лишь поставляет энергию электрохимического градиента. Что касается Са-канала, то его функционирование требует фосфорилирования белка, и если оно нарушается, канал теряет способность переходить в активное состояние. Эту особенность Са-каналов можно объяснить участием ионов кальция практически во всех внутриклеточных процессах — регуляции синтеза ряда важных для клетки веществ, их внутриклеточном транспорте, выделении и т. д. Возможно, именно поэтому существует обратная связь — поступление или выход кальция должны зависеть от внутриклеточных процессов.