

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра зоологии и ботаники

КЛЕТОЧНАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

Курс лекций

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2021*

УДК 612(075.8)
ББК 28.707.3я73
К48

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 1 от 27.10.2021.

Составитель: доцент кафедры зоологии и ботаники ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **М.В. Шилина**

Р е ц е н з е н т :
заведующий кафедрой химии и естественнонаучного образования
ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук,
доцент *О.М. Балаева-Тихомирова*

К48 **Клеточная электрофизиология : курс лекций / сост. М.В. Шилина. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 64 с.**

В издании излагаются общие вопросы мембранологии и электрогенеза в клетках, рассматриваются этапы генерации мембранного потенциала и электромеханического сопряжения в поперечнополосатых мышцах и кардиомиоцитах.

Курс лекций предназначен для студентов факультета химико-биологических и географических наук II ступени высшего образования (магистратура) дневной и заочной форм обучения специальности 1-31 80 01 Биология.

УДК 612(075.8)
ББК 28.707.3я73

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Лекция 1</i> Структура и свойства биологических мембран	4
1. Основные функции биологических мембран	4
2. Структура биологических мембран	6
3. Динамика мембран. Подвижность фосфолипидных молекул в мембранах	11
4. Фазовые переходы липидов в мембранах	13
<i>Лекция 2</i> Физика процессов транспорта веществ через биологические мембраны	17
1. Химический и электрохимический потенциал	17
2. Пассивный перенос веществ через мембрану	18
3. Активный транспорт веществ. Опыт Уссинга	22
4. Электрогенные ионные насосы	23
5. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран	26
<i>Лекция 3</i> Биоэлектрические потенциалы	32
1. Мембранный потенциал	32
2. Распространение нервного импульса вдоль возбудимого волокна	43
3. Свойства ионных каналов клеточных мембран	45
4. Типы управляемых каналов и насосы	49
<i>Лекция 4</i> Синапс. Синаптическая передача	51
1. Нервно-мышечный синапс. Потенциал концевой пластинки и потенциал действия	51
2. Типы медиаторов (трансммиттеров) и механизмы их действия ...	52
<i>Лекция 5</i> Электромеханическое сопряжение в мышцах	55
1. Электромеханическое сопряжение в поперечнополосатой мышце	55
2. Электромеханическое сопряжение в кардиомиоцитах	60
Список использованных источников	63

Лекция 1

СТРУКТУРА

И СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Рассматриваемые вопросы:

1. Основные функции биологических мембран.
2. Структура биологических мембран.
3. Динамика мембран. Подвижность фосфолипидных молекул в мембранах.
4. Фазовые переходы липидов в мембранах.

Многие жизненные процессы протекают на биологических мембранах. Нарушение мембранных процессов – причина многих патологий. Лечение также во многих случаях связано с воздействием на функционирование биологических мембран.

1. Основные функции биологических мембран

Элементарная живая система, способная к самостоятельному существованию, развитию и воспроизведению – это живая клетка, основа строения всех животных и растений. Важнейшими условиями существования клетки (и клеточных органелл) являются:

- 1) автономность по отношению к окружающей среде (вещество клетки не должно смешиваться с веществом окружения, должна соблюдаться автономность химических реакций в клетке и ее отдельных частях);
- 2) связь с окружающей средой (непрерывный, регулируемый обмен веществом и энергией между клеткой и окружающей средой). Живая клетка - открытая система.

Единство автономности от окружающей среды и одновременно тесной связи с окружающей средой – необходимое условие функционирования живых организмов на всех уровнях их организации. Поэтому важнейшее условие существования клетки, и, следовательно, жизни - нормальное функционирование биологических мембран.

Три основные функции биологических мембран:

барьерная – обеспечивает селективный, регулируемый, пассивный и активный обмен веществом с окружающей средой (селективный – значит, избирательный: одни вещества переносятся через биологическую мембрану, другие – нет; регулируемый - проницаемость мембраны для определенных веществ меняется в зависимости от генома и функционального состояния клетки);

матричная – обеспечивает определенное взаимное расположение и ориентацию мембранных белков, обеспечивает их оптимальное взаимодействие (например, оптимальное взаимодействие мембранных ферментов);

механическая – обеспечивает прочность и автономность клетки, внутриклеточных структур.

Кроме того, биологические мембраны выполняют и другие функции:

энергетическую – синтез АТФ на внутренних мембранах митохондрий и фотосинтез в мембранах хлоропластов;

генерацию и проведение биопотенциалов;

рецепторную (механическая, акустическая, обонятельная, зрительная, химическая, терморцепция – мембранные процессы) и многие другие функции.

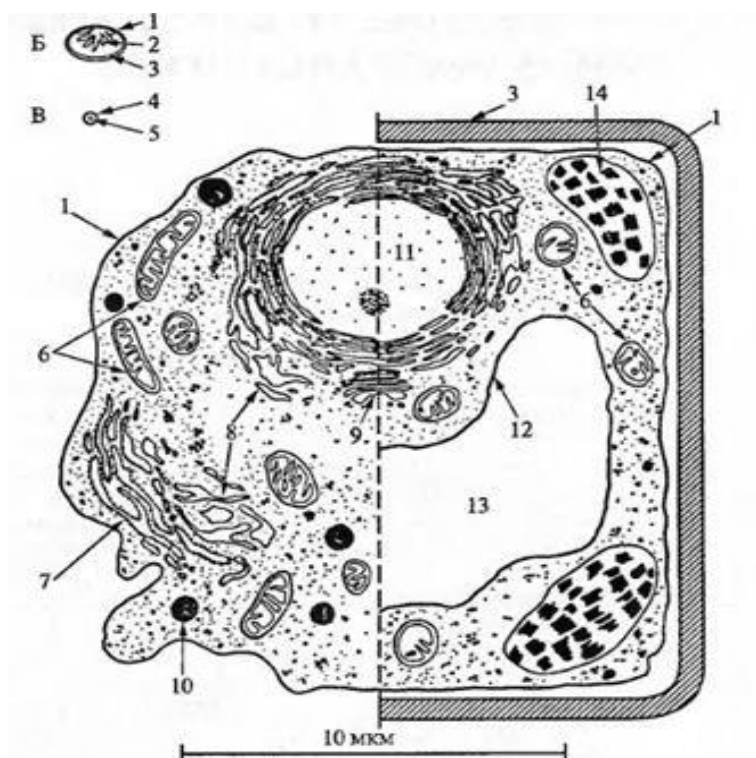


Рис. 1 – Схема строения клетки, реконструированная по данным электронной микроскопии (Самойлов О.В., 2010 г.)

Слева – клетка животных, справа – клетка растений; Б-бактерия,

В-вирус обладают липопротеиновой оболочкой;

1 – плазматическая мембрана; 2 – мембрана мезосомы; 3 – клеточная стенка;

4 – оболочка вируса; 5 – нуклеотид, 6 – митохондрии;

7 – шероховатая эндоплазматическая сеть; 9 – комплекс Гольджи; 10 – лизосома;

11 – ядро; 12 – тонопласт; 13 – вакуоль; 14 – хлоропласт.

Общая площадь всех биологических мембран в организме человека достигает десятков тысяч квадратных метров. Относительно большая совокупная площадь связана с огромной ролью мембран в жизненных процессах.

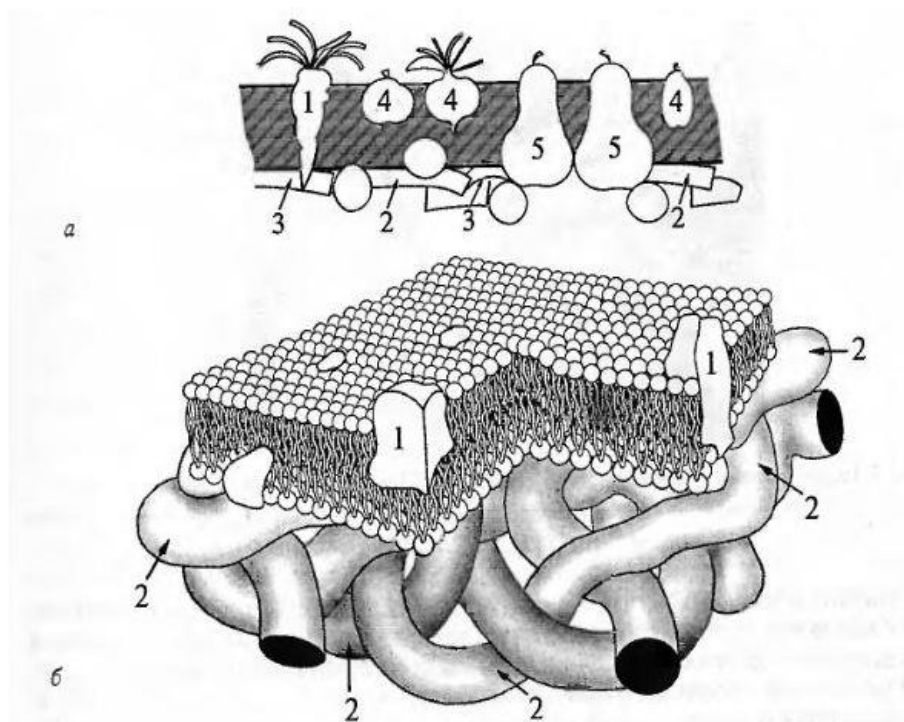


Рис. 2 – Схематическое изображение эритроцитарной мембраны:
 а – схема расположения важнейших полипептидов; б – схема расположения сети спектрина, обеспечивающей структурную жесткость мембраны;
 1 – гликофорин; 2 – спектрин (тектин А), образующий сеть под внутренней поверхностью мембраны; 3 – миозиноподобный белок (обеспечивает подвижность мембраны); 4 – гликопротеиды (некоторые из них являются АВ0-изоантигенами и ответственны за групповую принадлежность крови); 5 – компонент «а» (предположительно он образует канал для анионов) – туннельный белок.

2. Структура биологических мембран

Первая модель строения биологических мембран была предложена в 1902 г. Было замечено, что через мембраны лучше всего проникают вещества, хорошо растворимые в липидах, и на основании этого было сделано предположение, что биологические мембраны состоят из тонкого слоя фосфолипидов. На самом деле, на поверхности раздела полярной и неполярной среды (например, воды и воздуха) молекулы фосфолипидов образуют мономолекулярный (одномолекулярный) слой. Их полярные «головы» погружены в полярную среду, а неполярные «хвосты» ориентированы в сторону неполярной среды. Поэтому и можно было предположить, что биологические мембраны построены из монослоя липидов.

В 1925 г. Гортер и Грендел показали, что площадь монослоя липидов, экстрагированных из мембран эритроцитов, в два раза больше суммарной площади эритроцитов. Гортер и Грендел экстрагировали липиды из гемолизированных эритроцитов ацетоном, затем выпаривали раствор на поверхности воды и измеряли площадь образовавшейся мономолекулярной пленки липидов. На основании результатов этих исследований была

высказана идея, что липиды в мембране располагаются в виде бимолекулярного слоя.

Биологическую мембрану можно рассматривать как *электрический конденсатор*, в котором пластинами являются электролиты наружного и внутреннего растворов (внеклеточного и цитоплазмы) с погруженными в них головами липидных молекул. Проводники разделены диэлектрическим слоем, образованным неполярной частью липидных молекул - двойным слоем их хвостов. Липиды - диэлектрики с диэлектрической проницаемостью $\epsilon \approx 2$.

Емкость плоского конденсатора:

$$C = \epsilon \epsilon_0 S / d$$

где электрическая постоянная $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{12}$ Ф/м, d – расстояние между пластинами конденсатора, S – площадь пластины.

Удельная емкость (на единицу площади):

$$C_{yd} = \epsilon \epsilon_0 / d.$$

Отсюда можно найти расстояние между пластинами конденсатора, соответствующее в нашем случае толщине липидной части мембраны:

$$d = \epsilon \epsilon_0 / C_{yd} = 8,85 \times 10^{12} \times 2 / 0,5 \times 10^{-2} = 3,5 \text{ нм.}$$

Это как раз соответствует по порядку величины толщине неполярной части бимолекулярного слоя липидов, сложенных определенным образом. Однако мембрана – это не только липидный бислой, она состоит и из белковых молекул. При измерении поверхностного натяжения клеточных мембран обнаружено, что измеренные значения коэффициента поверхностного натяжения значительно ближе к коэффициенту поверхностного натяжения на границе раздела белок-вода (около 10^{-4} Н/м), нежели на границе раздела липид-вода (около 10^{-2} Н/м). Даниелли и Девсоном предложили в 1935 г. так называемую бутербродную модель строения биологических мембран, которая с некоторыми несущественными изменениями сохранилась в мембранологии в течение почти 40 лет. Согласно этой модели мембрана – трехслойная. Она образована двумя расположенными по краям слоями белковых молекул с липидным бислоем посередине; образуется нечто вроде бутерброда: липиды, наподобие масла, между двумя «ломтями» белка.

Однако по мере накопления экспериментальных данных пришлось, в конце концов, отказаться от бутербродной модели строения биологических мембран. Огромную роль в развитии представлений о строении биологических мембран сыграло все большее проникновение в биологию физических методов исследования.

Большую информацию о структуре мембран, о взаимном расположении атомов мембранных молекул дает рентгеноструктурный анализ, основанный на дифракции коротковолновых рентгеновских лучей на атомарных структурах. Исследования дифракции рентгеновских лучей на мембране подтвердили относительно упорядоченное расположение липидных

молекул в мембране – двойной молекулярный слой с более или менее параллельно расположенными жирнокислыми хвостами, дали возможность точно определить расстояние между полярной головой липидной молекулы и метильной группой в конце углеводородной цепи.

Наибольшие успехи в раскрытии особенностей строения биологических мембран были достигнуты в *электронно-микроскопических* исследованиях. Как известно, световой микроскоп не позволяет рассмотреть детали объекта, меньшие примерно половины длины световой волны (около 200 нм). В световом микроскопе можно разглядеть отдельные клетки, однако, он совершенно непригоден для изучения биологических мембран, толщина которых в 20 раз меньше предела разрешения светового микроскопа. Разрешающая способность микроскопа ограничена явлением дифракции. Поэтому, чем меньше длина волны по сравнению с деталями исследуемого объекта, тем меньше искажения. Предел разрешения пропорционален длине волны.

В электронном микроскопе вместо светового пучка на исследуемый объект направляется пучок электронов, разогнанных до больших скоростей. Известно, что электронам с высокими скоростями тоже присущи волновые свойства, в том числе явление дифракции. Однако при достаточно больших скоростях, согласно формуле де Бройля, длина волны мала и соответственно мал предел разрешения. Так, если электроны ускоряются электрическим полем с напряжением 10^5 В, их скорость достигает 10^6 м/с, длина волны уменьшается и предел разрешения составляет порядка 0,1 нм, что позволяет рассмотреть отдельные детали строения биологических мембран. В электронном микроскопе достигается увеличение в сотни тысяч раз, что дало возможность исследовать строение клетки, клеточных органелл и биологических мембран.

Недостатком электронной микроскопии является деформация живого объекта в процессе исследования. Перед началом электронномикроскопических исследований клетка проходит через многие стадии предварительной обработки: обезвоживание, закрепление, ультратонкий срез, обработка препаратов веществами, хорошо рассеивающими электроны (например, золотом, серебром, осмием, марганцем и т.п.). При этом изучаемый объект значительно изменяется. При помощи электронной микроскопии удалось получить изображение биологических мембран, на снимках видно трехслойное строение мембраны. Новая информация о строении мембраны была получена с помощью метода «замораживание-скол-травление». По этому методу клетку охлаждают до очень низкой температуры в жидком азоте. Охлаждение проводится с очень большой скоростью (около 1000 градусов в секунду). При этом вода, содержащаяся в препарате, переходит в твердое аморфное состояние. Затем клетки раскалываются специальным ножом и помещаются в вакуум. Замерзшая вода быстро возгоняется, освобождая поверхность скола (этот процесс и называют травлением). После

травления получают реплику (отпечаток со сколотой поверхности) и фотографируют в электронном микроскопе. Замороженные мембраны могут при раскалывании расщепляться в разных направлениях, в том числе и вдоль границы двух липидных монослоев, и поэтому можно видеть их внутреннее строение. Было обнаружено, что имеются белковые молекулы, погруженные в липидный бислой и даже прошивающие его насквозь. Это привело к существенному изменению представлений о строении мембраны.

Современное представление о структуре мембраны. Совокупность результатов, полученных физическими и химическими методами исследования, дала возможность предложить новую *жидкостно-мозаичную* модель строения биологических мембран (Сингер и Никольсон, 1972 г.). Согласно Сингеру и Никольсону, структурную основу биологической мембраны образует двойной слой фосфолипидов, инкрустированный белками.

Различают поверхностные (или периферические) и интегральные белки.

Липиды находятся при физиологических условиях в жидком агрегатном состоянии. Это позволяет сравнить мембрану с фосфолипидным морем, по которому плавают белковые «айсберги». Одним из подтверждений жидкостно-мозаичной модели является и тот факт, что, как установил химический анализ, в разных мембранах соотношение между содержанием белков и фосфолипидов сильно варьирует: в миелиновой мембране белков в 2,5 раза меньше, чем липидов, а в эритроцитах, напротив, белков в 2,5 раза больше, чем липидов. При этом, согласно современной модели, соотношение количества белков и липидов во всех мембранах должно быть примерно одинаково. Тот факт, что не вся поверхность биологической мембраны покрыта белками, показал и метод ядерного магнитного резонанса.

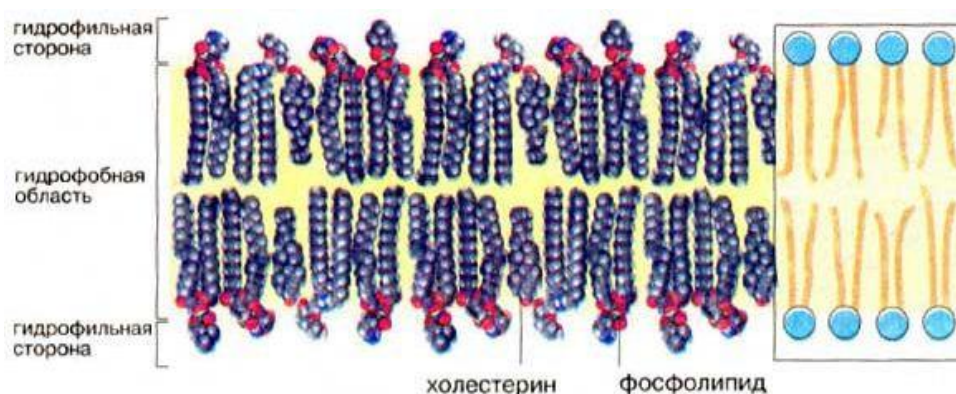


Рис. 3 – Мембранные липиды (Кольман Я, Рём К.-Г., 2000)

Кроме фосфолипидов и белков, в биологических мембранах содержатся и другие химические соединения. В мембранах животных клеток

много холестерина (в сравнимом количестве с фосфолипидами и белками). Есть в мембранах и другие вещества, например гликолипиды, гликопротеиды.

Жидкостно-мозаичная модель строения мембраны в настоящее время общепринята. Однако, как всякая модель, она дает довольно упрощенную картину строения мембраны. В частности, обнаружено, что белковые «айсберги» не всегда свободно плавают в липидном море, а могут быть «заякорены» на внутренние (цитоплазматические) структуры клетки. К таким структурам относятся микрофиламенты и микротрубочки. Микротрубочки – полые цилиндры диаметром около 300 нм из особого белка (тубулина) играют важную роль в функционировании клетки.

Выяснилось также, что не все липиды в мембране расположены по принципу бислой. Физические методы исследования показали, что липидная фаза мембран содержит также участки, где липидные молекулы не образуют двойной слой.

Изучением сложного химического состава мембран, мембранных белков и других веществ занимается биохимия. Основная область приложения биофизики – структурная основа мембраны, а именно двойной слой фосфолипидных молекул.

Молекула фосфолипида лецитина содержит полярную голову (производную фосфорной кислоты) и длинный неполярный хвост (остатки жирных кислот). В голове фосфолипидной молекулы лецитина имеются две заряженные группы, расположенные на некотором расстоянии друг от друга. Два разноименных заряда, равные по абсолютной величине, образуют электрический диполь.

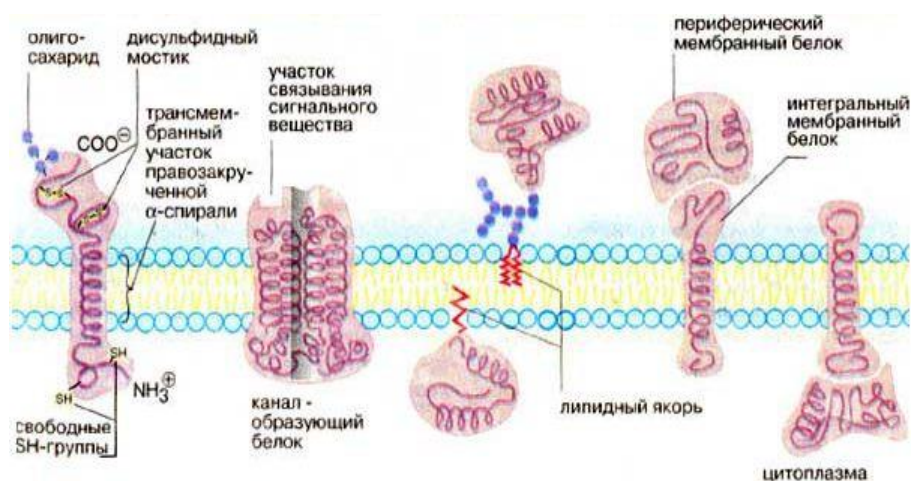


Рис. 4 – Мембранные белки (Кольман Я, Рём К.-Г., 2000)

В мембранах содержатся разные фосфолипиды. Например, в мембране эритроцитов их около 20 видов. Варьирует химическая формула полярной головы молекулы. У некоторых фосфолипидов головы кроме двух зарядов противоположного знака, создающих дипольный момент,

но оставляющих молекулу в целом нейтральной, несут один отрицательный некомпенсированный заряд, вследствие чего молекула оказывается заряженной отрицательно. Углеводородные хвосты фосфолипидной молекулы содержат приблизительно 20 атомов углерода, в хвосте может быть 1-4 двойных ненасыщенных связей два хвоста.

Полярные головы молекул фосфолипидов – *гидрофильны*, а их *неполярные хвосты* – *гидрофобны*. В смеси фосфолипидов с водой термодинамически выгодно, чтобы полярные головы были погружены в состоящую из полярных молекул воду, а их неполярные хвосты были бы расположены подальше от воды. Такое расположение амфифильных (имеющих и гидрофильную, и гидрофобную части) молекул соответствует наименьшему значению энергии Гиббса по сравнению с другими возможными расположениями молекул.

Очень существенным является то обстоятельство, что молекулы фосфолипидов имеют два хвоста. Такая молекула в пространстве имеет форму, близкую к цилиндру. Из молекул фосфолипидов в водной среде происходит самосборка бислойной мембраны. Присутствие молекул с одним хвостом (лизолецитин), имеющих в пространстве форму, близкую к конусу, разрушает клеточные мембраны. Фосфолипидные молекулы, лишенные одного из хвостов, образуют поры в бислойной мембране, т.е. нарушается барьерная функция мембран.

3. Динамика мембран. Подвижность фосфолипидных молекул в мембранах

Режим функционирования мембраны сильно зависит от: микровязкости липидного бислоя и подвижности фосфолипидных молекул в мембране, фазового состояния мембранных липидов. Отклонения биофизических характеристик липидного бислоя от нормы связано с разного рода патологиями. Важную роль в физиологии клетки играют фазовые переходы в биологических мембранах.

Липидная фаза биологических мембран при физиологических условиях (температуре, давлении, химическом составе окружающей среды) находится в жидком агрегатном состоянии. Это доказано методами флюоресцентного анализа (с использованием флюоресцентных зондов и меток), электроонного парамагнитного резонанса (ЭПР), с использованием «спиновых зондов и меток, и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

В нормальном состоянии мембрана не флюоресцирует. Чтобы провести исследования мембраны флюоресцентным методом, надо вводить в мембрану молекулы или молекулярные группы, способные к флюоресценции. В качестве флюоресцентных зондов используются: ДМХ – диметиламинохалкон; МБА – 3-метоксибензантрон; АНС – 1-анилин-нафталин-сульфонат и др.

Флюоресцентный анализ дает возможность исследовать подвижность фосфолипидных молекул в мембране, оценить вязкость липидной фазы мембраны (так называемую микровязкость мембран). Микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флюоресценции, а также по степени поляризации P флюоресцентного излучения при освещении мембраны поляризованным светом. Связь степени поляризации P и микровязкости мембраны η выражается формулой Перрена и Яблонского:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right),$$

где P_0 – степень поляризации света на неподвижных молекулах, $R = 8,31$ Дж / (К × моль) – универсальная газовая постоянная, T [К] – температура, V – молярный объем флюоресцирующих молекул, τ – время жизни возбужденного состояния.

Наиболее полные сведения об агрегатном состоянии липидных бислоев дают методы радиоспектроскопии ЭПР и ЯМР.

Как и в случае ЭПР, спектры ЯМР тем шире, чем больше вязкость и меньше молекулярная подвижность исследуемого объекта. Флюоресцентные, ЭПР- и ЯМР-исследования показали, что подвижность фосфолипидных молекул в мембране сравнительно велика, а вязкость мала. В нормальных физиологических условиях липидная часть мембраны находится в жидком агрегатном состоянии. Вязкость липидной мембраны сравнима с вязкостью подсолнечного масла:

$$\eta \approx (30-100) \text{ мПа} \times \text{с}$$

(для сравнения: вязкость воды при 20 °С составляет 1 мПа × с). Изменение микровязкости липидного окружения мембранных белков-ферментов резко сказывается на их функционировании. Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что канцерогенез связан со снижением вязкости липидной фазы мембраны, а при старении вязкость, напротив, увеличивается. Разрабатываются диагностические методы, основанные на измерении микровязкости мембран с помощью спин-зондов.

Микровязкость мембраны у концов липидных хвостов меньше, чем около полярных голов, высокая подвижность липидных молекул обуславливает латеральную (боковую) диффузию. Латеральная диффузия – это хаотическое тепловое перемещение молекул липидов и белков в плоскости мембраны. При латеральной диффузии рядом расположенные молекулы липидов скачком меняются местами и вследствие таких последовательных перескоков из одного места в другое молекула перемещается вдоль поверхности мембраны. Среднее квадратичное перемещение S_B молекул при диффузии за время t можно оценить по формуле Эйнштейна:

$$S_{KB} = 2 \times (Dt)^{1/2}$$

Зная S_{KB} , можно найти значение коэффициента латеральной диффузии D .

Оказалось, что среднее квадратичное перемещение за секунду фосфолипидной молекулы по поверхности мембраны эритроцита составило около 5 мкм, что сравнимо с размерами клеток. Таким образом, за секунду молекула может оббежать всю поверхность небольшой клетки. Обнаруженное среднее квадратичное перемещение белковых молекул составило около 0,2 мкм за секунду.

Рассчитанные по формуле Эйнштейна коэффициенты латеральной диффузии для липидов $D_{\text{л}} \approx 6 \times 10^{-12} \text{ м}^2 / \text{с}$, для белков $D_{\text{б}} \approx 10^{-14} \text{ м}^2 / \text{с}$.

Частота перескоков (число перескоков в секунду) молекулы с одного места на другое вследствие латеральной диффузии может быть найдена по формуле:

$$\nu = 2 \times 3^{1/2} \times D/f$$

где f – площадь, занимаемая одной молекулой на мембране.

Для молекул фосфолипидов $D_{\text{лип}} = 6 \times 10^{-12} \text{ м}^2 / \text{с}$, $f \approx 7 \times 10^{-19} \text{ м}^2$. Для этих значений частота перескоков $\nu = 3 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$. Каждая молекула, таким образом, в среднем претерпевает десятки миллионов перестановок в плоскости мембраны за секунду, то есть характерное время одного перескока $\tau = 10^{-7} - 10^{-8} \text{ с}$.

Флип-флоп – это диффузия молекул мембранных фосфолипидов поперек мембраны.

Скорость перескоков молекул с одной поверхности мембраны на другую (флип-флоп) определена методом спиновых меток в опытах на модельных липидных мембранах – липосомах. Перескоки молекул с одной поверхности бислоя на другую совершаются значительно медленнее, чем перескоки при латеральной диффузии. Среднее время, через которое фосфолипидная молекула совершает флип-флоп ($T \sim 1 \text{ час}$), в десятки миллиардов раз больше среднего времени, характерного для перескока молекулы из одного места в соседнее в плоскости мембраны. Сочетание быстрой диффузии молекул вдоль мембраны и очень медленной диффузии поперек мембраны имеет большое значение для функционирования мембран, а именно для матричной функции мембраны. Благодаря затрудненному переходу поперек мембраны поддерживается упорядоченность в молекулярной структуре мембраны, ее анизотропия, асимметрия (относительно плоскости мембраны) расположения липидных и белковых молекул, определенная ориентация белков-ферментов поперек мембраны. Это имеет большое значение, например, для направленного переноса веществ через мембрану.

4. Фазовые переходы липидов в мембранах

Вещество при разных температуре, давлении, концентрациях химических компонентов может находиться в различных физических состояниях, например газообразном, жидком, твердом, плазменном. Кристаллическому твердому состоянию вещества могут соответствовать разные фазовые состояния (кристаллические модификации – графит и алмаз, например).

Твердое тело может быть как кристаллическим (имеется дальний порядок в расположении частиц на расстояниях, много превышающих межмолекулярные расстояния – кристаллическая решетка), так и аморфным, например, стекло (нет дальнего порядка в расположении атомов и молекул). Различие между твердым аморфным телом и жидкостью состоит не в наличии или отсутствии дальнего порядка, а в характере движения частиц. И молекулы жидкости, и молекулы твердого тела совершают колебательные (иногда вращательные) движения около положения равновесия. Через некоторое среднее время – «время оседлой жизни» – происходит перескок молекулы в другое положение равновесия. Различие заключается в том, что время оседлой жизни в жидкости много меньше, чем в твердом теле. Липидные бислойные мембраны при физиологических условиях – жидкие, время оседлой жизни фосфолипидных молекул в мембране мало: $\approx 10^{-7} - 10^{-8}$ с. Но молекулы в мембране размещены не беспорядочно, в их расположении наблюдается дальний порядок. Фосфолипидные молекулы находятся в двойном слое, а их гидрофобные хвосты приблизительно параллельны друг другу. Есть порядок и в ориентации полярных гидрофильных голов.

Физическое состояние, при котором есть дальний порядок во взаимной ориентации и расположении молекул, но агрегатное состояние жидкое, называется **жидкокристаллическим** состоянием.



Рис. 5 – Расположение молекул в аморфном (а) и жидкокристаллическом состояниях (б, в, г)

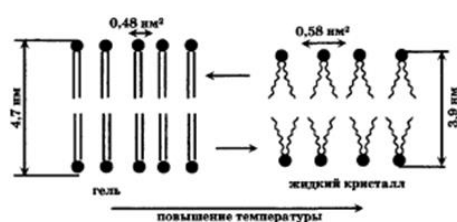
Жидкие кристаллы могут образовываться не во всех веществах, а в веществах из «длинных молекул» (поперечные размеры которых меньше продольных). Могут быть различные жидкокристаллические структуры: нематическая (нитевидная), когда длинные молекулы ориентированы параллельно друг другу; смектическая (мылообразная) – молекулы параллельны друг другу и располагаются слоями; холестерическая – молекулы располагаются параллельно друг другу в одной плоскости, но в разных плоскостях ориентации молекул разные (повернуты на некоторый угол в одной плоскости относительно другой).

Бислойная липидная фаза биологических мембран соответствует смектическому жидкокристаллическому состоянию.

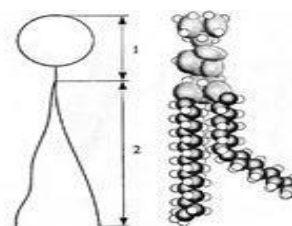
Жидкокристаллические структуры очень чувствительны к изменению температуры, давления, химического состава, электрическому полю. Это

определяет динамичность липидных бислоевых мембран – изменение их структуры при различных, даже небольших изменениях внешних условий или химического состава. При изменении условий вещество может перейти в другое фазовое состояние (например, из газообразного в жидкое, из жидкого в твердое, из одной кристаллической модификации в другую).

Физическими методами исследования показано, что липидная часть биологических мембран при определенных температурах испытывает фазовый переход первого рода. В фосфолипидной мембране при понижении температуры происходит переход из жидкокристаллического в гель-состояние, которое условно иногда называют твердокристаллическим. В гель-состоянии молекулы расположены еще более упорядочено, чем в жидкокристаллическом. Все гидрофобные углеводородные хвосты фосфолипидных молекул в гель-фазе полностью вытянуты строго параллельно друг другу (имеют полностью транс-конформацию). В жидком кристалле за счет теплового движения возможны транс-гош-переходы, хвосты молекул изгибаются, их параллельность друг другу в отдельных местах нарушается, особенно сильно в середине мембраны.



а



б

Рис. 6. а) изменение структуры мембраны при переходе из жидкокристаллического в гель-состояние и обратно при изменении температуры;
б) строение липида, (1 – голова, 2 – хвост)

Толщина мембраны в гель-фазе больше, чем в жидком кристалле. Однако при переходе из твердого в жидкокристаллическое состояние объем несколько увеличивается, потому что значительно увеличивается площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу (от $0,48 \text{ нм}^2$ до $0,58 \text{ нм}^2$). Так как в твердокристаллическом состоянии больше порядок, чем в жидком кристалле, ему соответствует меньшая энтропия.

Для нормального функционирования мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается адаптационное изменение химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода. Температура фазового перехода понижается при увеличении числа ненасыщенных связей в жирно-кислотных хвостах. В хвосте молекулы может быть до четырех ненасыщенных связей.

В зависимости от химического состава липидных мембран температура фазового перехода гель – жидкий кристалл может меняться от -20°C (для мембран из ненасыщенных липидов) до $+60^{\circ}\text{C}$ (для насыщенных липидов). Увеличение числа ненасыщенных липидов в мембране при понижении температуры обитания наблюдается у микроорганизмов, растительных и животных клеток. Пример приспособления клеточных мембран к температурным условиям – изменение температуры фазового перехода (за счет изменения химического состава мембранных липидов) ноги полярного оленя. Температура вдоль ноги полярного оленя от копыта до туловища может зимой меняться от -20°C до $+30^{\circ}\text{C}$. Клеточные мембраны у дистальной части ноги оленя содержат больше ненасыщенных фосфолипидов.

По-видимому, первичный механизм криоповреждений (повреждений при охлаждениях) биологических мембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биологические мембраны содержат большое количество холестерина, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающие фазовый переход. У некоторых микроорганизмов биологические мембраны находятся при температурах, лишь на немного превышающих температуру фазовых переходов липидов. Мембрана содержит десятки разных липидов, которым соответствуют разные температуры фазового перехода, в том числе близкие к физиологическим. При понижении температуры в мембране происходят фазовые превращения в липидном бислое.

В работах В.Ф. Антонова доказано, что при фазовых переходах из геля в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое образуются сквозные каналы, радиусом 1-3 нм, по которым через мембрану могут переноситься ионы и низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода резко увеличивается ионная проводимость мембраны. Увеличение ионной проводимости мембран может спасти клетку от криоповреждений за счет увеличения выхода из клетки воды и солей – привести к нарушению ее барьерной функции, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки. Повышение ионной проводимости мембран при фазовом переходе, возможно, позволяет поддерживать метаболический обмен некоторых микроорганизмов. Большой интерес представляет этот эффект для объяснения термо- и хеморецепции. Известно, что перенос ионов через мембрану лежит в основе формирования биопотенциалов, изменение ионной проводимости обуславливает нервный импульс. Не исключено, что нервный импульс, свидетельствующий о понижении или повышении температуры, образуется за счет изменения ионной проницаемости липидного бислоя при фазовом переходе мембранных липидов.

По-видимому, и некоторые виды хеморецепции могут быть связаны с фазовым переходом мембранных липидов, поскольку фазовый переход может быть вызван не только изменением температуры, но и изменением химического состава окружающей среды. Например, доказано, что при данной температуре фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-состояние может быть вызван увеличением концентрации Ca^{2+} в физиологическом диапазоне от 1 до 10 ммоль/л в водном растворе, окружающем мембрану.

Лекция 2

ФИЗИКА ПРОЦЕССОВ ТРАНСПОРТА ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Рассматриваемые вопросы:

1. Химический и электрохимический потенциал.
2. Пассивный перенос веществ через мембрану.
3. Активный транспорт веществ. Опыт Уссинга.
4. Электрогенные ионные насосы.
5. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран.

1. Химический и электрохимический потенциал

Живые системы на всех уровнях организации – открытые системы. Поэтому транспорт веществ через биологические мембраны – необходимое условие жизни. С переносом веществ через мембраны связаны процессы метаболизма клетки, биоэнергетические процессы, образование биопотенциалов, генерация нервного импульса и др. Нарушение транспорта веществ через биомембраны приводит к различным патологиям. Лечение часто связано с проникновением лекарств через клеточные мембраны. Эффективность лекарственного препарата в значительной степени зависит от проницаемости для него мембраны. Большое значение для описания транспорта веществ имеет понятие электрохимического потенциала.

Химическим потенциалом данного вещества μ_k называется величина, численно равная энергии Гиббса, приходящаяся на один моль этого вещества. Математически химический потенциал определяется как частная производная от энергии Гиббса, G по количеству k -го вещества, при постоянстве температуры T , давления P и количеств всех других веществ $m_l (l \neq k)$.

$$\mu_k = (\partial G / \partial m_k)_{P, T, m}$$

Для разбавленного раствора концентрации вещества C :

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C$$

где μ_0 – стандартный химический потенциал, численно равный химическому потенциалу данного вещества при его концентрации 1 моль/л в растворе.

Электрохимический потенциал μ – величина, численно равная энергии Гиббса G на один моль данного вещества, помещенного в электрическом поле.

Для разбавленных растворов

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C + ZF\phi \quad (1)$$

где $F = 96500$ Кл/моль – число Фарадея, Z – заряд иона электролита (в элементарных единицах заряда), ϕ – потенциал электрического поля, T [K] – температура.

Транспорт веществ через биологические мембраны можно разделить на два основных типа: пассивный и активный.

2. Пассивный перенос веществ через мембрану

Пассивный транспорт – это перенос вещества из мест с большим значением электрохимического потенциала к местам с его меньшим значением.

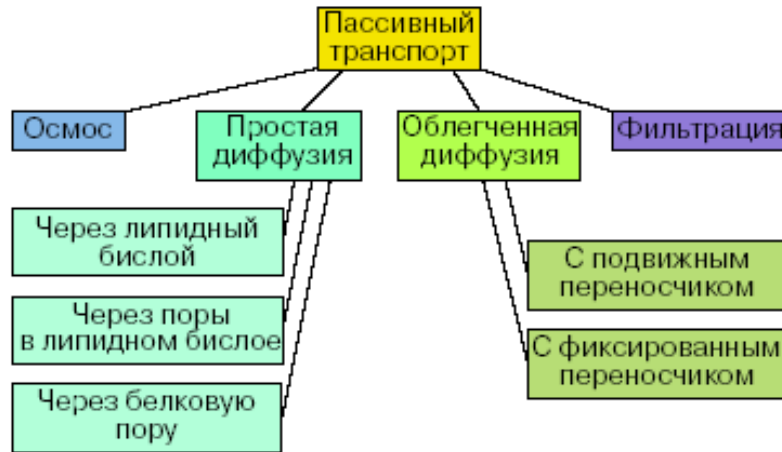


Рис. 1 – Пассивный транспорт

Пассивный транспорт идет с уменьшением энергии Гиббса, и поэтому этот процесс может идти самопроизвольно без затраты энергии.

Плотность потока вещества j_m при пассивном транспорте подчиняется *уравнению Теорелла*:

$$j_m = -UC \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right) = -UC \text{grad} \mu \quad (2)$$

где U – подвижность частиц, C – концентрация. Знак минус показывает, что перенос происходит в сторону убывания μ .

Плотность потока вещества j_m – это величина, численно равная количеству вещества, перенесенного за единицу времени через единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению переноса:

Подставив в (2) выражение для электрохимического потенциала (1), получим для разбавленных растворов *при $\mu_0 = \text{const}$ уравнение Нернста–Планка*:

$$j_m = -URT \frac{dC}{dx} - UCZF \frac{d\phi}{dx} = -URT \text{grad} C - UCZF \text{grad} \phi \quad (3)$$

Итак, могут быть две причины переноса вещества при пассивном транспорте: градиент концентрации dC/dx и градиент электрического потенциала $d\phi/dx$. Знаки минусов показывают, что градиент концентрации вызывает перенос вещества от мест с большей концентрацией к местам с его меньшей концентрацией; а градиент электрического потенциала вызывает перенос положительных зарядов от мест с большим к местам с меньшим потенциалом.

В отдельных случаях вследствие сопряжения этих двух причин может происходить пассивный перенос вещества от мест с меньшей концентрацией к местам с большей концентрацией, если второй член уравнения (3) по модулю больше первого, и может происходить перенос вещества от

мест с меньшим потенциалом к местам с большим потенциалом, если первый член уравнения (3) по модулю больше второго. В случае неэлектролитов ($Z = 0$) или отсутствия электрического поля ($d\phi/dx = 0$) уравнение Теорелла переходит в уравнение:

$$j_m = -URT \text{grad} C \quad (4)$$

Согласно соотношению Эйнштейна коэффициент диффузии $D = URT$. В результате получаем уравнение, описывающее простую диффузию – **закон Фика**:

$$j_m = -D \text{grad} C \quad (5)$$

Диффузия – самопроизвольное перемещение вещества из мест с большей концентрацией в места с меньшей концентрацией вещества вследствие хаотического теплового движения молекул.

Диффузия вещества через липидный бислой (рис. 1) вызывается градиентом концентрации в мембране. Плотность потока вещества по закону Фика

$$j_m = -D \text{grad} C = -D(C_2^m - C_1^m)/l = D(C_1^m - C_2^m)/l \quad (6)$$

Так как измерить концентрации C_1^m и C_2^m трудно, на практике пользуются формулой, связывающей плотность потока вещества через мембрану с концентрациями этого вещества не внутри мембраны, а снаружи в растворах около поверхностей мембраны, C_1 и C_2 .

$$j_m = P(C_1 - C_2) \quad (7)$$

Коэффициент проницаемости мембраны P зависит от свойств мембраны и переносимых веществ. Если считать концентрации вещества у поверхности в мембране прямо пропорциональными концентрациям у поверхности вне мембраны, то

$$C_1^m = KC_1 \quad (8)$$

$$C_2^m = KC_2 \quad (9)$$

Величина K носит название **коэффициента распределения**, который показывает соотношение концентрации вещества вне мембраны и внутри нее. Подставив (8,9) в (3), получим:

$$j_m = DK(C_1 - C_2)/l \quad (10)$$

Из уравнений (7) и (10) видно, что коэффициент проницаемости:

$$P = DK/l \quad (11)$$

Коэффициент проницаемости тем больше, чем больше коэффициент диффузии (чем меньше вязкость мембраны), чем тоньше мембрана (чем меньше l) и чем лучше вещество растворяется в мембране (чем больше K). Хорошо растворимы в фосфолипидной фазе мембраны неполярные вещества, например органические жирные кислоты, эфиры. Эти вещества хорошо проникают через липидную фазу мембраны. Плохо проходят через липидный бислой полярные, водорастворимые вещества: соли, основания, сахара, аминокислоты, спирты.

Проникновение через липидные бислойные мембраны мелких полярных молекул связывают с образованием между жирнокислотными хвостами фосфолипидных молекул при их тепловом движении небольших

свободных полостей – *кинков* (от англ., kink - петля), образованных гош-транс-гош-конфигурацией липидных молекул. Вследствие теплового движения хвостов кинки могут перемещаться поперек мембраны и переносить попавшие в них мелкие молекулы, в первую очередь молекулы воды.

Через липидные и белковые поры сквозь мембрану проникают молекулы нерастворимых в липидах веществ и водорастворимые гидратированные ионы (окруженные молекулами воды). Для жиронерастворимых веществ и ионов мембрана выступает как молекулярное сито: чем больше размер молекулы, тем меньше проницаемость мембраны для этого вещества.

Избирательность переноса обеспечивается набором в мембране пор определенного радиуса, соответствующих размеру проникающей частицы. Это распределение зависит от мембранного потенциала. Так, избирательные для ионов калия поры в мембране эритроцитов имеют сравнительно низкий коэффициент проницаемости, равный 4 пм/с при мембранном потенциале 80 мВ, который уменьшается в четыре раза с понижением потенциала до 40 мВ. Проницаемость мембраны аксона кальмара для ионов калия при уровне потенциала возбуждения определяется калиевыми каналами, радиус которых численно оценивается как сумма кристаллического радиуса иона калия и толщины одной гидратной оболочки ($0,133 \text{ нм} + 0,272 \text{ нм} = 0,405 \text{ нм}$). Селективность ионных каналов не абсолютна, каналы доступны и для других ионов, но с меньшими значениями P . Максимальная величина P соответствует ионам калия. Ионы с большими кристаллическими радиусами (рубидий, цезий) имеют меньшие P , т.к. их размеры с одной гидратной оболочкой превышают размер канала. Л. Муллинз предполагает, что в растворе вне поры каждый ион имеет гидратную оболочку, состоящую из трех сферических слоев молекул воды. При вхождении в пору гидратированный ион "раздевается", теряя воду послойно. Пору будет проницаема для иона, если ее диаметр точно соответствует диаметру любой из этих сферических оболочек. Как правило, в пору ион остается с одной гидратной оболочкой. Расчет, приведенный выше, показывает, что радиус калиевой поры составит в этом случае 0,405 нм. Гидратированные ионы натрия и лития, размеры которых не кратны размерам поры, будут испытывать затруднение при прохождении через нее. Отмечено своеобразное «квантование» гидратированных ионов по их размерам при прохождении через поры.

В биологических мембранах был обнаружен еще один вид диффузии – **облегченная диффузия**. Облегченная диффузия происходит при участии молекул переносчиков. Например, *валиномицин* – переносчик ионов калия. Молекула валиномицина имеет форму манжетки, устланной внутри полярными группами, а снаружи – неполярными. Т.е валиномицин, во-первых, способен образовывать комплекс с ионами калия, попадающими внутрь молекулы-манжетки, и, во-вторых, валиномицин растворим в липидной фазе мембраны, так как снаружи его молекула неполярна. Молекулы валиномицина, оказавшиеся у поверхности мембраны, могут захватывать из

окружающего раствора ионы калия. Диффундируя в мембране, молекулы переносят калий через мембрану, и некоторые из них отдают ионы в раствор по другую сторону мембраны.

Перенос калия валиномицином может происходить через мембрану и в одну, и в другую сторону. Поэтому, если концентрации калия по обе стороны мембраны одинаковы, поток калия в одну сторону будет такой же, что и в другую, и в результате переноса калия через мембрану не будет. Но если с одной стороны концентрация калия больше, чем с другой ($[K^+]_1 > [K^+]_2$), то здесь ионы будут чаще захватываться молекулами переносчика, чем с другой стороны, и поток калия в сторону уменьшения $[K^+]$ будет больше, чем в противоположную.

Облегченная диффузия происходит от мест с большей концентрацией переносимого вещества к местам с меньшей концентрацией. Облегченной диффузией объясняется также перенос через биологические мембраны аминокислот, сахаров и других биологически важных веществ.

Отличия облегченной диффузии от простой:

1) перенос вещества с участием переносчика происходит значительно быстрее;

2) облегченная диффузия обладает свойством насыщения: при увеличении концентрации с одной стороны мембраны плотность потока вещества возрастает лишь до некоторого предела, когда все молекулы переносчика уже заняты;

3) при облегченной диффузии наблюдается конкуренция переносимых веществ в тех случаях, когда переносчиком переносятся разные вещества; при этом одни вещества переносятся лучше, чем другие, и добавление одних веществ затрудняет транспорт других; так, из сахаров глюкоза переносится лучше, чем фруктоза, фруктоза лучше, чем ксилоза, а ксилоза лучше, чем арабиноза, и т.д.;

4) есть вещества, блокирующие облегченную диффузию -они образуют прочный комплекс с молекулами переносчика, например, флоридзин подавляет транспорт сахаров через биологическую мембрану.

Если транспорт какого-либо вещества через биологическую мембрану обладает этими особенностями, можно сделать предположение, что имеет место облегченная диффузия.

Разновидностью облегченной диффузии является транспорт с помощью неподвижных молекул-переносчиков, фиксированных определенным образом поперек мембраны. При этом молекула переносимого вещества передается от одной молекулы переносчика к другой, как по эстафете.

Фильтрацией называется движение раствора через поры в мембране под действием градиента давления. Скорость переноса при фильтрации подчиняется **закону Пуазейля**:

$$DV/dt = (P_1 - P_2)/W \quad (12)$$

где DV/dt – объемная скорость переноса раствора, W – гидравлическое сопротивление, $W=(8\eta l)/\pi r^4$, l – длина поры, r – радиус поры, η – коэффициент вязкости раствора.

Явление фильтрации играет важную роль в процессах переноса воды через стенки кровеносных сосудов.

Осмоз – преимущественное движение молекул воды через полупроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемые для воды) из мест с меньшей концентрацией растворенного вещества в места с большей концентрацией. Осмос играет большую роль во многих биологических явлениях. Явление осмоса обуславливает гемолиз эритроцитов в гипотонических растворах.

3. Активный транспорт веществ. Опыт Уссинга

Активный транспорт – это перенос вещества из мест с меньшим значением электрохимического потенциала в места с его большим значением.

Активный транспорт в мембране сопровождается ростом энергии Гиббса, он не может идти самопроизвольно, а только в сопряжении с процессом гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), то есть за счет затраты энергии, запасенной в макроэргических связях АТФ.

Активный транспорт веществ через биологические мембраны имеет огромное значение. За счет активного транспорта в организме создаются градиенты концентраций, градиенты электрических потенциалов, градиенты давления и т.д., поддерживающие жизненные процессы, т.е. с точки зрения термодинамики активный перенос удерживает организм в неравновесном состоянии, поддерживает жизнь.

Существование активного транспорта веществ через биологические мембраны впервые было доказано в опытах Уссинга (1949 г.) на примере переноса ионов натрия через кожу лягушки.

Из уравнения Теорелла, описывающего пассивный транспорт, следует **уравнение Уссинга–Теорелла** для отношения этих потоков в случае пассивного транспорта:

$$J_{m,вн}/j_{m,нар} = (C_{нар}/C_{вн}) \cdot e^{ZF\phi/RT}$$

На коже лягушки, разделяющей раствор Рингера, возникает разность потенциалов ($\phi_{вн}-\phi_{нар}$) -внутренняя сторона кожи имеет положительный потенциал по отношению к наружной. В установке Уссинга имелся блок компенсации напряжения, с помощью которого устанавливалась разность потенциалов на коже лягушки, равная нулю, что контролировалось вольтметром. Поддерживалась одинаковая концентрация ионов с наружной и внутренней стороны $C_{нар} = C_{вн}$.

При этих условиях, если бы перенос натрия через кожу лягушки определялся только пассивным транспортом, то согласно уравнению Уссинга-Теорелла потоки $j_{m,вн}$ и $j_{m,нар}$ были равны друг другу: $j_{m,вн}=j_{m,нар}$.

Суммарный поток через мембрану был бы равен нулю.

С помощью амперметра обнаружено, что в условиях опыта (отсутствие градиентов электрического потенциала и концентрации) через кожу лягушки течет электрический ток I , следовательно, происходит односторонний перенос заряженных частиц. Установлено, что ток через кожу течет от внешней среды к внутренней.

Экспериментальные данные неопровержимо свидетельствовали о том, что перенос ионов натрия через кожу лягушки не подчиняется уравнению пассивного транспорта. Следовательно, имеет место активный перенос.

4. Электрогенные ионные насосы

Согласно современным представлениям, в биологических мембранах имеются **ионные насосы**, работающие за счет свободной энергии гидролиза АТФ, – специальные системы интегральных белков (транспортные АТФазы).

В настоящее время известны три типа электрогенных ионных насосов, осуществляющих активный перенос ионов через мембрану.

Перенос ионов транспортными АТФазами происходит вследствие сопряжения процессов переноса с химическими реакциями, за счет энергии метаболизма клеток.

При работе K^+-Na^+ -АТФазы за счет энергии, освобождающейся при гидролизе каждой молекулы АТФ, в клетку переносится два иона калия и одновременно из клетки выкачиваются три иона натрия. Таким образом, создается повышенная по сравнению с межклеточной средой концентрация в клетке ионов калия и пониженная натрия, что имеет огромное физиологическое значение.

В Ca^{2+} -АТФазе за счет энергии гидролиза АТФ переносятся два иона кальция, а в H^+ -помпе – два протона.

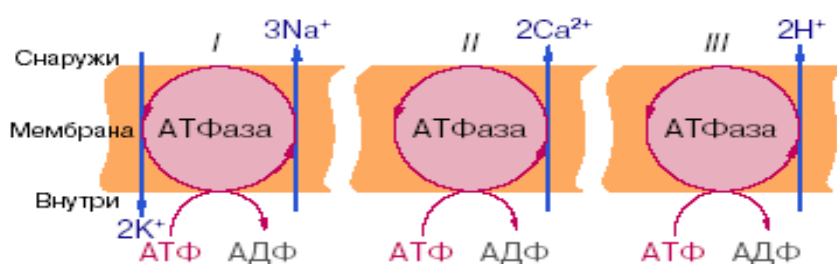


Рис. 2 – Виды ионных насосов: I - K^+-Na^+ - АТФаза в цитоплазматических мембранах (K^+-Na^+ -насос); II - Ca^{2+} -АТФаза (Ca^{2+} -насос); III- H^+ -АТФаза в энергосопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов (H^+ -насос, или протонная помпа)

Признаки «бионасоса»:

- 1) движение против градиента электрохимического потенциала;
- 2) поток вещества сопряжён с гидролизом АТФ (или другого источника энергии);

- 3) асимметрия транспортной машины;
- 4) насос *invitro* способен гидролизовать АТФ только в присутствии тех ионов, которые он переносит *invivo*;
- 5) при встраивании насоса в искусственную среду он способен сохранять селективность.

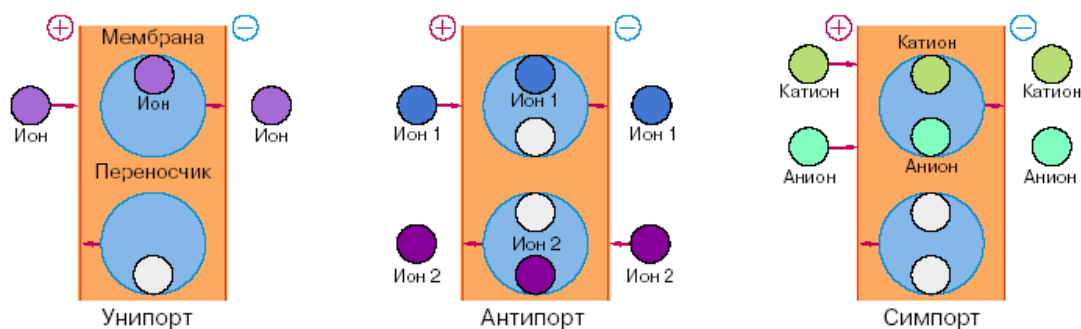
Молекулярный механизм работы ионных АТФаз до конца не изучен. Тем не менее, прослеживаются основные этапы этого сложного ферментативного процесса. В случае K^+ - Na^+ -АТФазы насчитывается семь этапов переноса ионов, сопряженных с гидролизом АТФ.

На схеме видно, что ключевыми этапами работы фермента являются:

- 1) образование комплекса фермента с АТФ на внутренней поверхности мембраны (эта реакция активируется ионами магния);
- 2) связывание комплексом трех ионов натрия;
- 3) фосфорилирование фермента с образованием аденозиндифосфата;
- 4) переворот (флип-флоп) фермента внутри мембраны;
- 5) реакция ионного обмена натрия на калий, происходящая на внешней поверхности мембраны;
- 6) обратный переворот ферментного комплекса с переносом ионов калия внутрь клетки;
- 7) возвращение фермента в исходное состояние с освобождением ионов калия и неорганического фосфата (Р).

Таким образом, за полный цикл происходят выброс из клетки трех ионов натрия, обогащение цитоплазмы двумя ионами калия и гидролиз одной молекулы АТФ.

Вторичный (сопряжённый) активный транспорт



Унипорт
(пассивный)
(K^+ – валиномицин)

Антипорт
 Na^+ и H^+ (бактерии)
(нигерицин K^+ и H^+)
 $2Na^+$ и Ca^{2+}

Симпорт
($2Na^+$ и АК, ГЛ)

Рис. 3 – Схема облегченной диффузии или сопряженного транспорта.

Вторичный (или сопряжённый) активный транспорт ионов наблюдается в том случае, если в результате первичного транспорта была создана разность концентраций или потенциалов на мембране, которая затем приводит к перемещению рассматриваемых ионов. Транспорт веществ в этом случае является вторичным, опосредованным мембранным потенциалом и/или градиентом концентрации ионов при наличии в мембране специфических переносчиков. Такой механизм переноса получил название вторичного активного транспорта. Наиболее детально этот механизм рассмотрен Питером Митчелом (1966 г.) в хемиосмотической теории окислительного фосфорилирования. В плазматических и субклеточных мембранах живых клеток возможно одновременное функционирование первичного и вторичного активного транспорта.

Примером может служить внутренняя мембрана митохондрий. Ингибирование АТФазы в ней не лишает частицу способности накапливать вещества за счет вторичного активного транспорта. Такой способ накопления особенно важен для тех метаболитов, насосы для которых отсутствуют (сахара, аминокислоты).

В настоящее время достаточно глубоко исследованы три схемы вторичного активного транспорта. Рассмотрим транспорт одновалентных ионов с участием молекул-переносчиков. При этом подразумевается, что переносчик в нагруженном или ненагруженном состоянии одинаково хорошо пересекает мембрану. Источником энергии служит мембранный потенциал и/или градиент концентрации одного из ионов. Схемы показаны на рис.14. Однонаправленный перенос иона в комплексе со специфическим переносчиком получил название *унипорта*. При этом через мембрану переносится заряд либо комплексом, если молекула переносчика электронейтральна, либо пустым переносчиком, если перенос обеспечивается заряженным переносчиком. Результатом переноса будет накопление ионов за счет снижения мембранного потенциала. Такой эффект наблюдается при накоплении ионов калия в присутствии валиномицина в энергизированных митохондриях.

Встречный перенос ионов с участием одностойной молекулы-переносчика получил название *антипорта*. Предполагается при этом, что молекула-переносчик образует прочный комплекс с каждым из переносимых ионов. Перенос осуществляется в два этапа: сначала один ион пересекает мембрану слева направо, затем второй ион - в обратном направлении. Мембранный потенциал при этом не меняется. Что же является движущей силой этого процесса? Очевидно, разность концентраций одного из переносимых ионов. Если исходно разность концентрации второго иона отсутствовала, то результатом переноса станет накопление второго иона за счет уменьшения разности концентраций первого. Классическим примером антипорта служит перенос через клеточную мембрану ионов калия и водорода с участием молекулы антибиотика нигерицина.

Совместный однонаправленный перенос ионов с участием двухместного переносчика называется **симпортом**. Предполагается, что в мембране могут находиться две электронейтральные частицы: переносчик в комплексе с катионом и анионом и пустой переносчик. Поскольку мембранный потенциал в такой схеме переноса не изменяется, то причиной переноса может быть разность концентраций одного из ионов. Считается, что по схеме симпорта осуществляется накопление клетками аминокислот. Калий-натриевый насос создает начальный градиент концентрации ионов натрия, которые затем по схеме симпорта способствуют накоплению аминокислот. Из схемы симпорта следует, что этот процесс должен сопровождаться значительным смещением осмотического равновесия, поскольку в одном цикле через мембрану переносятся две частицы в одном направлении.

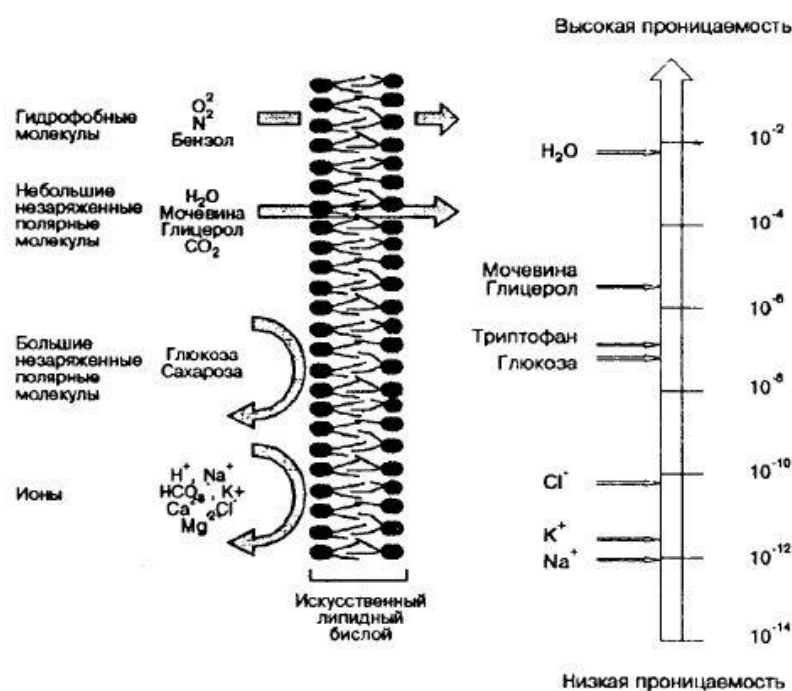


Рис. 4 – Схема и график проницаемости биомембраны для различных веществ и соединений.

5. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны. Непрерывность его определяет барьерные и механические свойства клетки. В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может нарушаться с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Вполне естественно ожидать при этом. Изменяются при этом все функции клеточной мембраны, включая проницаемость и стабильность.

Фосфолипиды, составляющие основу клеточных мембран, относятся к жидким кристаллам. Как в любом реальном кристалле, в пленке из фосфолипидов могут быть дефекты, в месте которых и развиваются основные события

структурных перестроек. Виды дефектов многообразны, но и наиболее естественным для бислоя является дефект типа сквозной гидрофильной поры.

В липидной бимолекулярной пленке клеточной мембраны поры появляются, если исключить чисто механические повреждения, в результате тепловых флуктуации поверхности бислоя, электрического пробоя, замораживания пленки, действия поверхностно-активных веществ, осмотического давления, перекисного окисления липидов и др. Один из наиболее типичных и хорошо изученных примеров дестабилизации биологических мембран - гемолиз эритроцитов. Это явление включает на начальном этапе набухание клеток в гипотонической среде в результате действия сил осмотического давления. Во время набухания клетки мембрана растягивается, что обуславливает рост мембранного натяжения.

При определенном пороговом уровне натяжения появляются гидрофильные липидные поры. Размеры пор достаточны для выхода молекул гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Выход веществ сопровождается в свою очередь снижением разности осмотического давления, при этом натяжение мембраны уменьшается и поры заживают. Белки цитоскелета позволяют эритроциту сохранить форму, при этом образуется так называемая тень эритроцита. Тень сохраняет осмотическую активность и таким образом процесс дестабилизации приобретает циклический характер. Полного механического разрушения клетки подобного мыльному пузырю в этом случае не происходит. В отсутствие цитоскелета или его недостаточного развития механическая прочность клетки целиком определяется судьбой липидных пор. Если пора имеет размер меньше критического, то она заживает. В противном случае неограниченный рост поры приводит к разрушению мембраны.

Модель критической поры. Рассмотрим модель липидной поры (рис. 4). Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового цилиндра. Более того, предположим, что боковая поверхность цилиндра изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$. Радиус поры равен r . Как видно, липидный бислой в целом является плоским, а пора имеет два радиуса кривизны $h/2$ и r . Искривление поверхности на границе раздела липид-вода сопровождается появлением добавочного давления, называемого лапласовым и равного

$$P = 2\sigma^1/r$$

где σ^1 – межфазное натяжение внутри поры, r – радиус кривизны.

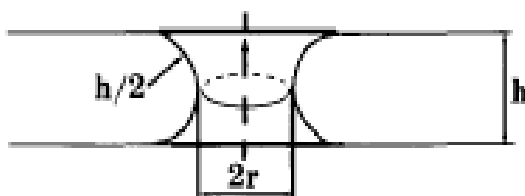


Рис. 5 – Строение гидрофильной липидной поры: h – толщина липидного бислоя; $h/2$ – радиус кривизны стенки; r – радиус поры.

В рассматриваемой модели таких радиусов два ($h/2$ и r) и, следовательно, два давления. Одно из них $P(h/2)$ способствует расширению, а другое $P(r)$ - сжатию поры. Дальнейшая судьба поры зависит от соотношения этих двух давлений. Если $P(h/2) > P(r)$, пора будет расширяться, а если $P(h/2)$ меньше $P(r)$, то пора будет затекать.

Рассмотрим энергетику поры. Как установлено выше, на границе поры действуют две противоположные силы, одна из которых – краевое линейное натяжение периметра поры - способствует росту поры, а вторая сила – поверхностное натяжение бислоя - вызывает сжатие поры. Краевая энергия поры пропорциональна первой степени радиуса и увеличивает суммарную энергию, энергия поверхностного натяжения пропорциональна квадрату радиуса и снижает суммарную энергию. В результате суммарная энергия $E(r)$ равна

$$E(r) = 2\pi r^2 \sigma$$

где первый член определяется энергией кромки поры с линейным натяжением γ , а второй – энергией поверхностного натяжения σ .

С учетом неустойчивости равновесия можно утверждать, что появление пор с $r > r^*$ ($r^* = \gamma/\sigma$) пора будет затекать и стабильность мембраны сохранится. Таков критерий стабильности липидной бислоидной мембраны.

Электрический пробой мембраны. Биологические мембраны находятся под действием электрического поля большой напряженности, создаваемого диффузией ионов через мембрану и электрогенными ионными насосами. Разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой достигает порядка 0,1 В, толщина мембраны не превышает 10 нм, значит напряженность поля равна 10^7 В/м. Мембрана является более совершенным электрическим изолятором, чем многие жидкие изоляторы, применяемые в технике. Мембранный потенциал в живой клетке может достигать 0,2 В (пресноводные водоросли, бактерии, энергизированные митохондрии). В возбудимых нервных и мышечных клетках происходит кратковременная реполяризация мембраны с ростом амплитуды потенциала. Однако пробой клеточной мембраны собственным мембранным потенциалом маловероятен. В то же время рост мембранного потенциала в результате воздействия внешним электрическим полем может достигать величины, превышающей пороговую для электрического пробоя. При этом появляются структурные дефекты типа сквозных липидных пор. Разработанная методика электрического пробоя клеточных мембран получила название **электропорации** и широко применяется в биотехнологии.

В физике под **электрическим пробоем** понимают резкое увеличение силы электрического тока в первоначально слабопроводящей среде. В живой клетке такой средой служит бимолекулярный слой липида. Для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии величина мембранного потенциала не может быть меньше 0,23 В. Стабильность бислоидных мембран определяется вероятностью появления пор критического радиуса.

Очевидно, что любой фактор, снижающий высоту энергетического барьера, будет увеличивать эту вероятность. К таким факторам следует отнести снижение краевой энергии поры u , рост поверхностного натяжения и рост мембранного потенциала. Электрический пробой сопровождается появлением широкого спектра липидных пор различного радиуса, включая радиусы ионоселективных белковых каналов. В настоящее время метод воздействия внешним электрическим полем является одним из основных в современной биотехнологии. Известно его применение с целью увеличения пористости мембран, введения ДНК, освобождение клеток от крупных молекул, слияния клеток.

Температурный фазовый переход мембранных липидов. Замораживание липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается появлением липидных пор. Очевидно, что, как и в случае с электрическим пробоем, судьбу мембраны будет определять соотношение радиусов образовавшихся пор и критических пор для данного состояния бислоя.

Критический радиус поры в гель-состоянии значительно меньше по сравнению с жидкокристаллическим состоянием и по абсолютной величине не превышает 2 нм. Сохранение длительной устойчивости липидного бислоя в гель-состоянии свидетельствует о том, что существующие поры и поры, возникающие при фазовом переходе, имеют размеры меньше 2 нм. Замораживание мембранных липидов в ходе фазового перехода, эквивалентно электрическому пробоем мембраны внешним электрическим полем напряжением 0,5 В. Любое воздействие механической, физической или химической природы, затрагивающее поверхностное натяжение липидного бислоя, является фактором риска в стабилизации порсодержащих мембран. Развитие такого подхода позволяет получить количественный ответ на важный для биологии о вероятности разрушения или залечивания мембран при типичных стрессовых состояниях живой клетки.

Критический радиус пор в мембранах, находящихся в жидкокристаллическом состоянии при отсутствии внешних воздействий, достигает 9 нм. Эта величина настолько значительна, что вероятность механического разрыва клеточных мембран в физиологических условиях очень мала. Разрыв мембраны, находящейся в таком состоянии, возможен лишь тогда, когда пора приобретает размеры, соизмеримые с толщиной мембраны. Опыт показывает, что полное разрушение липидного бислоя возможно лишь при грубых механических манипуляциях или необратимом электрическом пробое липидов (жкс), гель-состоянии (гель), при электрическом пробое (эп), при сочетании гель-состояния с электрическим пробоем (гель+эп).

Размеры критических пор для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии (9 нм) значительно превышают размеры реальных пор. Мембраны в различных стрессовых состояниях обладают значительным запасом прочности, действие электрического пробоя и замораживания

бислоя, аддитивно. Такой результат можно ожидать, следовательно, и при других сочетаниях физических и химических воздействий. Стрессовое воздействие независимо от его физико-химической природы, может быть количественно оценено и его результат предсказан в рамках рассматриваемой модели. Модель формирования пор при фазовом переходе. Независимая оценка размера пор может быть получена путем исследования предложенной В.Ф. Антоновым и сотрудниками модели формирования пор. При фазовом переходе из жидкокристаллического состояния в гель по данным рентгеноструктурного анализа, происходит изменение толщины бислоя и площади на молекулу липида. Учитывая кооперативность фазового перехода, можно предположить, что молекулы в доменах, перешедших в гель-фазу, и остающихся в жидкокристаллическом состоянии, будут находиться в разных условиях. Относительно равновесного состояния молекулы в домене гель-фазы будут растянуты, а в жидкокристаллическом состоянии – сжаты. Появится упругое напряжение, которое приведет к нарушению структуры бислоя.

Липидные поры и проницаемость мембран. С точки зрения проницаемости липидные поры принципиально отличаются от белковых каналов своим происхождением и исключительной динамичностью. В то время как белковые каналы имеют строго определенные размеры, сохраняющиеся в течение всей жизни клетки, размеры липидных пор в процессе затекания варьируют в широких пределах. Однако эта изменчивость; имеет предел. Если радиус поры меньше критического, то пора в процессе затекания должна пройти все промежуточные радиусы и достигнуть минимального размера. Вопрос о возможности полного затекания липидных пор остается открытым. Предполагается, что полному затягиванию поры препятствуют мощные силы гидратации, проявляющиеся при сближении стенок гидрофильных пор. Липидные поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, что коррелирует с их сравнительно большими исходными размерами. Ясно, однако, что в процессе затекания липидные поры могут достигать сколь угодно малых размеров, в том числе сравнимых с размерами белковых ионных каналов, что может приводить к перераспределению ионных токов в мембране, например, при возбуждении. Известно, далее, что после выключения стрессового воздействия бислойная липидная мембрана может вернуться в состояние с низкой проводимостью, что подразумевает достижение порами размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов. Таким образом, гидрофильные липидные поры универсальны в том отношении, что могут быть использованы клеткой для транспорта высокомолекулярных веществ, ионов и молекул воды.

Исследования проницаемости липидных пор развиваются в настоящее время в двух направлениях: в первом исследуются максимально большие поры, во втором, наоборот, - липидные поры минимального ради-

уса. В первом случае речь идет об электротрансфекции – способе введения в живые клетки или липосомы молекул ДНК с целью переноса и внутриклеточного введения чужеродного генетического материала. Оказалось, что внешнее электрическое поле высокой напряженности способствует проникновению гигантской молекулы ДНК внутрь мембранной частицы. Максимальный размер критической поры соответствует жидкокристаллическому состоянию бислоя липидов в отсутствие внешнего электрического поля и равен 9 нм. Наложение внешнего электрического поля напряженностью 100 кВ/м понижает критический радиус поры до 1 нм за время 0,2 с. Поскольку при этом мембраны сохраняются, то размер липидных пор в них не превышает этого нижнего предела. Парадокс состоит в том, что эффективный диаметр статистического клубка ДНК, которая должна лопасть внутрь частицы, достигает 2000 нм. Поэтому молекула ДНК должна проникать через мембрану в виде расплетенной одиночной нити. Известно, что конец нити имеет диаметр 2 нм и таким образом только-только может войти в пору. Однако свободная диффузия нити ДНК в пору при этом вряд ли возможна.

Второе направление исследования проницаемости мембран с участием липидных пор связано с трансмембранным переносом молекул и ионов воды. Известное в биологии явление высокой водной проницаемости клеточных мембран полностью воспроизводится на искусственных липидных бислоях, что подразумевает участие в этом процессе гидрофильных липидных пор.

Основной вывод состоит в том, что стабильность липидного бислоя и клеточной мембраны, лишенной белкового каркаса, определяется липидными порами. Эти поры образуются в местах дефектов жидкокристаллической структуры липидного бислоя. Липидные поры возникают в результате тепловых флуктуации поверхности бислоя, а также могут рождаться при мембранном стрессе, сопровождающем фазовый переход мембранных липидов, при электрическом пробое и осмотическом лизисе. Судьба мембраны в этих случаях будет зависеть вероятностным образом от того, будет ли липидная пора превышать некоторый критический размер или нет. В первом случае мембрана порвется, во втором случае ее структура сохранится. При сохранении стабильности мембран поры заживают, пробегая при этом все промежуточные значения радиусов. Минимальные радиусы липидных пор могут стать сравнимыми с размерами избирательных белковых каналов, регулирующих в норме ионную проницаемость клеточных мембран. На последних этапах затекания липидные поры могут превращаться в водные поры, доступные только для молекул и ионов воды.

Лекция 3

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Рассматриваемые вопросы:

1. Мембранный потенциал.
2. Распространение нервного импульса вдоль возбудимого волокна.
3. Свойства ионных каналов клеточных мембран.
4. Типы управляемых каналов и насосы.

1. Мембранный потенциал

Одна из важнейших функций биологической мембраны - генерация и передача биопотенциалов. Это явление лежит в основе возбудимости клеток, регуляции внутриклеточных процессов, работы нервной системы, регуляции мышечного сокращения, рецессии. В медицине на исследование электрических полей, созданных биопотенциалами органов и тканей, основаны диагностические методы: электрокардиография, электроэнцефалография, электромиография и другие. Практикуется и лечебное воздействие на ткани и органы внешними электрическими импульсами при электростимуляции.

В процессе жизнедеятельности в клетках и тканях могут возникать разности электрических потенциалов: $\Delta\varphi$

- 1) окислительно-восстановительные потенциалы – вследствие переноса электронов от одних молекул к другим;
- 2) мембранные – вследствие градиента концентрации ионов и переноса ионов через мембрану.

Биопотенциалы, регистрируемые в организме, – это в основном мембранные потенциалы.

Мембранным потенциалом называется разность потенциалов между внутренней (цитоплазматической) и наружной поверхностями мембраны:

$$\varphi_m = \varphi_{нар} - \varphi_{вн} \quad (1)$$

Прогресс в исследовании биопотенциалов обусловлен:

- 1) разработкой микроэлектродного метода внутриклеточного измерения потенциалов;
- 2) созданием специальных усилителей биопотенциалов (УПТ);
- 3) выбором удачных объектов исследования крупных клеток и среди них гигантского аксона кальмара. Диаметр аксона кальмара достигает 0,5 мм, что в 100–1000 больше, чем диаметр аксонов позвоночных животных, в том числе человека. Гигантские размеры аксона имеют большое физиологическое значение – обеспечивают быструю передачу нервного импульса по нервному волокну.

Для биофизики гигантский аксон кальмара послужил великолепным модельным объектом для изучения биопотенциалов. В гигантский аксон

кальмара можно ввести микроэлектрод, не нанеся аксону значительных повреждений.

Стеклянный микроэлектрод представляет собой стеклянную микропипетку с оттянутым очень тонким кончиком (рис. 1).

Металлический электрод такой толщины пластичен и не может проколоть клеточную мембрану, кроме того, он поляризуется. Вторым электродом – электродом сравнения – располагается в растворе у наружной поверхности клетки. Регистрирующее устройство Р, содержащее усилитель постоянного тока, измеряет мембранный потенциал:

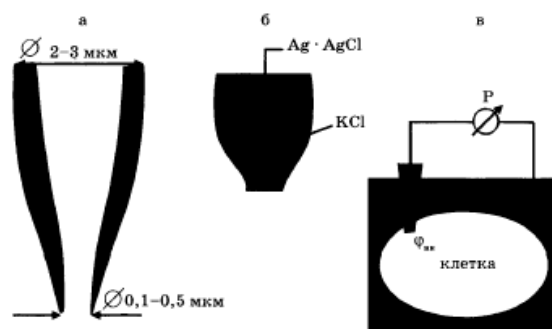


Рис. 1 – Микроэлектродный метод измерения биопотенциалов:
а – стеклянная микропипетка; б – стеклянный микроэлектрод;
в – схема регистрации мембранного потенциала.

Микроэлектродный метод дал возможность измерить биопотенциалы не только на гигантском аксоне кальмара, но и на клетках нормальных размеров: нервных волокнах других животных, клетках скелетных мышц, клетках миокарда и других.

Мембранные потенциалы подразделяются на потенциалы покоя и потенциалы действия.

Потенциал покоя – стационарная разность электрических потенциалов, регистрируемая между внутренней и наружной поверхностями мембраны в невозбужденном состоянии.

Потенциал покоя определяется разной концентрацией ионов по разные стороны мембраны и диффузией ионов через мембрану. Если концентрация какого-либо иона внутри клетки $C_{\text{вн}}$ отлична от концентрации этого иона снаружи $C_{\text{нар}}$ и мембрана проницаема для этого иона, возникает поток заряженных частиц через мембрану, вследствие чего нарушается электрическая нейтральность системы, образуется разность потенциалов внутри и снаружи клетки $\varphi_{\text{м}} = \varphi_{\text{нар}} - \varphi_{\text{вн}}$ которая будет препятствовать дальнейшему перемещению ионов через мембрану. При установлении равновесия выравниваются значения электрохимических потенциалов по разные стороны мембраны: $\mu_{\text{вн}} = \mu_{\text{нар}}$.

Так как $\mu = \mu_0 + RT \ln C + ZF \phi$, то

$$RT \ln C_{\text{вн}} + ZF \phi_{\text{вн}} = RT \ln C_{\text{нар}} + ZF \phi_{\text{нар}}$$

Отсюда легко получить **формулу Нернста** для равновесного мембранного потенциала

$$\phi_m = \phi_{\text{нар}} - \phi_{\text{вн}} = -RT/ZF \ln(C_{\text{вн}}/C_{\text{нар}})$$

Если мембранный потенциал обусловлен переносом ионов K^+ , для которого $[K^+]_{\text{вн}} > [K^+]_{\text{нар}}$ и $Z = +1$, равновесный мембранный потенциал

$$\phi_{m,K}^p = -\frac{RT}{F} \ln \frac{K_{\text{вн}}^+}{K_{\text{нар}}^+} \leq 0.$$

Для ионов Na^+ : $[Na^+]_{\text{вн}} < [Na^+]_{\text{нар}}$, $Z = +1$,

$$\phi_{m,Na}^p = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_{\text{вн}}}{[Na^+]_{\text{нар}}} > 0,$$

Если в формуле Нернста перейти от натурального логарифма к десятичному, то для положительного одновалентного иона ($Z = +1$)

$$\phi_m^p = -\frac{RT}{F} \cdot 2,3 \cdot \lg \frac{C_{\text{вн}}}{C_{\text{нар}}},$$

Примем температуру $T = 300 \text{ K}$, тогда

$$\frac{RT}{F} \cdot 2,3 = \frac{8,3 \text{ Дж} / (\text{моль} \cdot \text{K}) \cdot 300 \text{ K}}{96500 \text{ Кл} / \text{моль}} \cdot 2,3 = 0,06 \text{ В}.$$

$$\phi_m^p \approx -0,06 \lg \frac{C_{\text{вн}}}{C_{\text{нар}}} (\text{В}).$$

Примем в формуле Нернста $C_{\text{вн}}/C_{\text{нар}} \approx 100$, что по порядку величины соответствуют экспериментальным данным для калия:

$\lg \frac{C_{\text{вн}}}{C_{\text{нар}}} = \lg 100 \approx 2$, и мембранный потенциал

$$|\phi_m^p| = 0,06 \cdot 2 \text{ В} = 0,12 \text{ В} = 120 \text{ мВ},$$

что несколько больше модуля экспериментально измеренных значений потенциала покоя, и, пользуясь формулами электростатики, оценим, какое количество ионов должно перейти из цитоплазмы в неклеточную среду, чтобы создать такую разность потенциалов. Радиус клетки $r = 10 \text{ мкм} = 10^{-5} \text{ м}$. Удельная емкость мембраны (емкость на единицу площади) $C_{\text{уд}} = 10^{-2} \text{ Ф/м}^2$. Площадь мембраны $4\pi r^2 \approx 4\pi \cdot 10^{-10} \text{ м}^2 \approx 10^{-9} \text{ м}^2$. Тогда емкость мембраны

$$C = C_{\text{уд}} \cdot S \approx 10^{-2} \frac{\text{Ф}}{\text{м}^2} \cdot 10^{-9} \text{ м}^2.$$

Абсолютная величина заряда каждого знака на поверхности мембраны, если ее представить себе как конденсатор,

$$|q| = C \Delta \phi \approx 10^{-11} \text{ Ф} \cdot 10^{-1} \text{ В} = 10^{-12} \text{ Кл},$$

что соответствует

$$\frac{q}{F} \approx \frac{10^{-12} \text{ Кл}}{10^5 \text{ Кл} / \text{ моль}} = 10^{-17} \text{ моль} \cdot \text{ ионов}.$$

Объем клетки

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \approx \frac{4}{3} \pi \cdot 10^{-15} \text{ м}^3 \approx 5 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3.$$

Изменение концентрации ионов в клетке вследствие выхода из клетки 10^{-17} моль ионов составит

$$\Delta C \approx \frac{10^{-17} \text{ моль}}{5 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3} \approx 2 \cdot 10^{-3} \text{ моль} / \text{ м}^3 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ ммоль} / \text{ л}.$$

Небольшое изменение концентрации по сравнению с изменением концентрации ионов калия внутри клетки, составляет всего $10^{-4}\%$ от концентрации калия внутри клетки. Таким образом, чтобы создать равновесный нернстовский мембранный потенциал, через мембрану должно пройти пренебрежимо малое количество ионов по сравнению с общим их количеством в клетке.

Таким образом, потенциал покоя на самом деле ближе к потенциалу, рассчитанному по формуле Нернста для K^+ . Вместе с тем, обращает на себя внимание значительное расхождение экспериментальных и теоретических значений. Причины расхождения в том, что не учтена проницаемость мембраны для других ионов. Одновременная диффузия через мембрану ионов K^+ , Na^+ и Cl^- учитывается уравнением Гольдмана.

Уравнение Гольдмана можно вывести из уравнения Нернста-Планка.

$$j_m = -URT \frac{dC}{dx} - UCZF \frac{d\phi}{dx}.$$

Преобразуем это уравнение:

$$j_m = -URT \left(\frac{dC}{dx} + \frac{CZF}{RT} \cdot \frac{d\phi}{dx} \right).$$

$URT=D$ согласно соотношению Эйнштейна. Примем так называемое приближение постоянного поля Гольдмана. Будем считать напряженность электрического поля в мембране постоянной и равной среднему значению градиента потенциала:

$$\frac{d\phi}{dx} \approx \frac{\Delta\phi}{\Delta x} = \frac{\phi_{\text{вн}} - \phi_{\text{нар}}}{l} = \frac{\phi_m}{l},$$

где l – толщина мембраны.

Получим для плотности ионного потока через мембрану:

$$j_m = -D \left(\frac{dC}{dx} + \frac{CZF}{RT} \cdot \frac{\phi_m}{l} \right).$$

Обозначим $\frac{ZF\phi_m}{RT} = \psi$. Запишем $j_m = -D \left(\frac{dC}{dx} + \frac{C\psi}{l} \right).$

Разделим переменные:

$$\frac{j_m}{D} = -\frac{dC}{dx} - \frac{C\psi}{l}; \quad \left(\frac{j_m}{D} + \frac{C\psi}{l} \right) = -\frac{dC}{dx}; \quad dx = -\frac{dC}{\frac{j_m}{D} + \frac{C\psi}{l}}.$$

Проинтегрируем левую часть дифференциального уравнения в пределах от 0 до 1, а правую от $C_{\text{нар}}=KC_{\text{нар}}$ до $C_{\text{вн}}=KC_{\text{вн}}$ (где K – коэффициент распределения)

$$\int_0^1 dx = - \int_{KC_{\text{нар}}}^{KC_{\text{вн}}} \frac{dc}{\frac{j_m}{D} + \frac{C\psi}{l}}.$$

Получим:

$$-l = \frac{l}{\psi} \ln \frac{\frac{j_m}{D} + \frac{KC_{\text{вн}}\phi}{l}}{\frac{j_m}{D} + \frac{KC_{\text{нар}}\phi}{l}}.$$

После потенцирования

$$e^{-\psi} = \frac{\frac{j_m}{D} + \frac{KC_{\text{вн}}\phi}{l}}{\frac{j_m}{D} + \frac{KC_{\text{нар}}\phi}{l}}.$$

Выразим отсюда:

$$j_m = \psi \frac{DK}{l} \cdot \frac{(C_{\text{вн}} - C_{\text{нар}}e^{-\psi})}{e^{-\psi} - 1}.$$

Учитывая, что $\frac{DK}{l} = P$, получим:

$$j_m = \psi P \cdot \frac{(C_{\text{вн}} - C_{\text{нар}}e^{-\psi})}{e^{-\psi} - 1}.$$

В стационарном случае, когда разность потенциалов – мембранный потенциал – тормозит дальнейший перенос ионов через мембрану, суммарный поток различных ионов становится равным нулю:

$$j_{K^+} + j_{Na^+} - j_{Cl^-} = 0$$

Перед j стоит знак минус, учитывающий отрицательный заряд иона хлора. Однако, так как в создании мембранного потенциала участвуют различные ионы, равновесие при этом не наступает, потоки различных ионов не равны нулю по отдельности. Если учесть только потоки j_{K^+} и j_{Na^+} , то $j_{K^+} + j_{Na^+} = 0$, или $j_K = -j_{Na^+}$ и, подставив, получим:

$$\frac{[K^+]_{\text{вн}} - [K^+]_{\text{нар}} e^{-\psi}}{e^{-\psi} - 1} = P_{Na} \frac{[Na^+]_{\text{вн}} - [Na^+]_{\text{нар}} e^{-\psi}}{e^{-\psi} - 1}$$

и

$$e^{-\psi} = \frac{P_K [K^+]_{\text{вн}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{вн}}}{P_K [K^+]_{\text{нар}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{нар}}}.$$

Отсюда:

$$-\psi = \ln \frac{P_K [K^+]_{\text{вн}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{вн}}}{P_K [K^+]_{\text{нар}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{нар}}}$$

Поскольку,

$$\psi = \frac{ZF\phi_M}{RT} = \frac{F\phi_M}{RT}, (Z=1),$$

то

$$\phi_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{BH} + P_{Na} [Na^+]_{BH}}{P_K [K^+]_{HAP} + P_{Na} [Na^+]_{HAP}}.$$

Если учесть еще и поток ионов Cl^- , то, повторив предыдущие рассуждения, можно получить уравнение для мембранного потенциала, созданного потоками через мембрану трех видов ионов, **уравнение Гольдмана**:

$$\phi_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{BH} + P_{Na} [Na^+]_{BH} + P_{Cl} [Cl^-]_{HAP}}{P_K [K^+]_{HAP} + P_{Na} [Na^+]_{HAP} + P_{Cl} [Cl^-]_{BH}}.$$

В числителе выражения, стоящего под знаком логарифма, представлены концентрации $[K^+]_{BH}$, $[Na^+]_{BH}$, но $[Cl^-]_{HAP}$, а в знаменателе – $[K^+]_{HAP}$, $[Na^+]_{HAP}$, но $[Cl^-]_{BH}$, так как ионы хлора отрицательно заряжены.

В состоянии покоя проницаемость мембраны для ионов K^+ значительно больше, чем для Na^+ , и больше, чем для Cl^- :

$$P_K \gg P_{Na}, P_K \gg P_{Cl}.$$

Для аксона кальмара, например,

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45.$$

Перепишав уравнение Гольдмана в виде:

$$\phi_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{BH} + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_{BH} + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_{HAP}}{[K^+]_{HAP} + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_{HAP} + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_{BH}},$$

в случае, когда проницаемость мембраны для ионов натрия и хлора значительно меньше проницаемости для калия:

$$P_{Na} \ll P_K, P_{Cl} \ll P_K,$$

Таким образом, уравнение Нернста – частный случай уравнения Гольдмана.

Мембранный потенциал, рассчитанный по уравнению Гольдмана, оказался по абсолютной величине меньше мембранного потенциала, рассчитанного по формуле Нернста» ближе к экспериментальным его значениям в крупных клетках. И формула Нернста, и уравнение Гольдмана не учитывают активного транспорта ионов через мембрану, наличия в мембранах электрогенных (вызывающих разделение зарядов, а следовательно, и возникновение разности потенциалов) ионных насосов, играющих важную роль в поддержании ионного равновесия в мелких клетках. В цитоплазматической мембране работают K^+ - Na^+ -АТФазы, перекачивающие калий внутрь клетки, а натрий из клетки. С учетом работы электрогенных ионных насосов для мембранного потенциала было получено **уравнение Томаса**:

$$\phi_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{mP_K [K^+]_{BH} + P_{Na} [Na^+]_{BH}}{mP_K [K^+]_{HAP} + P_{Na} [Na^+]_{HAP}},$$

где m – отношение количества ионов натрия к количеству ионов калия, перекачиваемых ионными насосами через мембрану. Чаще всего K^+-Na^+ -АТФаза работает в режиме, когда $m = 3/2$, m всегда больше 1. (Нет ионных насосов, перекачивающих Cl , поэтому в уравнении Томаса отсутствуют члены $P_{Cl} [Cl]$.)

Коэффициент $m > 1$ усиливает вклад градиента концентрации калия в создание мембранного потенциала, поэтому мембранный потенциал, рассчитанный по Томасу, больше по абсолютной величине, чем мембранный потенциал, рассчитанный по Гольману, и дает совпадение с экспериментальными значениями для мелких клеток.

Нарушение биоэнергетических процессов в клетке и работы K^+-Na^+ -АТФазы приводит к уменьшению $|\varphi_m|$, в этом случае мембранный потенциал лучше описывается уравнением Гольдмана.

Повреждение клеточной мембраны приводит к повышению проницаемости клеточных мембран для всех ионов: к повышению и P_K , и P_{Na} , и P_{Cl} . Вследствие уменьшения различия проницаемостей абсолютное значение мембранного потенциала $|\varphi_m|$ снижается.

Для сильно поврежденных клеток $|\varphi_m|$ еще меньше, но сохраняется отрицательный мембранный потенциал $|\varphi_m|$ за счет содержащихся в клетке полианионов – отрицательно заряженных белков, нуклеиновых кислот и других крупных молекул, не могущих проникнуть через мембрану (доннановский потенциал).

Потенциал действия. Посредством электрических нервных импульсов (потенциалов действия) в живом организме передается информация от рецепторов к нейронам мозга и от нейронов мозга к мышцам. Живой организм является полностью электрифицированной системой. Без электричества нет жизни.

Потенциал действия был открыт раньше потенциала покоя. Животное электричество известно давно. Разряды электрического угря (происходящие при напряжении до 600 В, с током около 60 А и длительностью порядка миллисекунды) использовались медициной еще в Древнем Риме для лечения подагры, головной боли, эпилепсии. Электрический нервный импульс открыл Луиджи Гальвани, профессор анатомии в г. Болонья. Результаты его электрофизиологических опытов изложены в книге «Трактат о силах электричества при мышечном движении» (1791 г.). Гальвани открыл, что мышечные сокращения конечностей препарированной лягушки могут вызываться электрическим импульсом и что сама живая система является источником электрического импульса. Великое открытие Гальвани сыграло выдающуюся роль в развитии физики, электротехники, электрохимии, физиологии, биофизики и медицины. Однако, огромная популярность идей Гальвани привела к их профанациям, следы которых остались до нашего времени (гальванизация трупов, гальванизм прикосновений взглядов и т.д.), что вызывало недоверие к экспериментам Гальвани уче-

ных-физиков. Младший современник Гальвани профессор физики Алессандро Вольта был яростным противником идеи животного электричества (за исключением особых случаев электрических рыб: электрического угря и электрического ската). В своих экспериментах он исключил биологический объект и показал, что электрический ток может быть получен при контакте набора металлов, разделенных электролитом (вольтов столб). Так был открыт химический источник тока (названный, однако, позже, в честь его научного противника гальваническим элементом).

В XIX веке утвердилось примитивное представление о распространении электрических токов по нервам, как по проводам. Однако Гельмгольцем (вторая половина XIX века) было показано, что скорость распространения нервного импульса составляет лишь 1-100 м/с, это значительно меньше, чем скорость распространения электрического импульса по проводам до $3 \cdot 10^8$ м/с. Поэтому к концу XIX века гипотеза электрической природы нервного импульса была отвергнута большинством физиологов. Было выдвинуто предположение о распространении по нервным волокнам химической реакции. На самом деле, как было показано позже, медленное распространение электрического нервного импульса связано с медленной перезарядкой конденсаторов, которые представляют собой клеточные мембраны, через большие сопротивления. Постоянная времени перезарядки мембраны $\tau = RC$ велика, так как велики емкость мембраны (C) и сопротивление R нервного волокна.

То, что нервный импульс представляет собой импульс электрического тока, было доказано лишь к середине 20-го века, в основном в работах английского физиолога А. Ходжкина и его сотрудников. В 1963 году Ходжкину, Хаксли и Икису была присуждена Нобелевская премия по медицине «за оперирование нервных клеток».

Потенциалом действия (ПД) называется электрический импульс, обусловленный изменением ионной проницаемости мембраны и связанный с распространением по нервам и мышцам волны возбуждения.

Опыты по исследованию потенциала действия проведены (в основном Ходжкиным и его сотрудниками) на гигантских аксона кальмара методом микроэлектродов с использованием высокоомных измерителей напряжения, а также методом меченых атомов. На рис показаны схема опытов и результаты исследований.

В опытах по исследованию потенциала действия использовали два микроэлектрода, введенных в аксон. На первый микроэлектрод подается импульс с амплитудой V от генератора Г прямоугольных импульсов, меняющий мембранный потенциал. Мембранный потенциал измеряется при помощи второго микроэлектрода высокоомным регистратором напряжения Р.

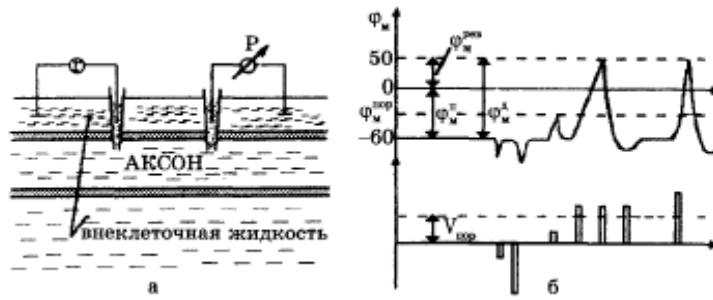


Рис. 2 – Исследование потенциала действия:

а – схема опыта (Г – генератор импульсов, Р – регистратор напряжения); б – потенциал действия ($\phi_m^п$ – потенциал покоя, $\phi_m^{рев}$ – потенциал реверсии, $\phi_m^д$ – амплитуда потенциала действия, $\phi_m^{пор}$ – пороговый потенциал)

Возбуждающий импульс вызывает лишь на короткое время смещение мембранного потенциала, который быстро пропадает и восстанавливается потенциал покоя. В том случае, когда возбуждающий импульс смещается еще дальше в отрицательную сторону, он сопровождается гиперполяризацией мембраны. Также не формируется потенциал действия, когда возбуждающий импульс положительный (деполяризующий), но его амплитуда меньше порогового значения $V_{пор}$. Однако, если амплитуда положительного, деполяризующего импульса окажется больше значения $V^{пор}$, ϕ_m становится больше $\phi_m^{пор}$ и в мембране развивается процесс, в результате которого происходит резкое повышение мембранного потенциала и мембранный потенциал ϕ_m даже меняет свой знак - становится положительным ($\phi_{вн} > \phi_{нар}$).

Достигнув некоторого положительного значения $\phi^{рев}$ – потенциала реверсии, мембранный потенциал возвращается к значению потенциала покоя $\phi_m^п$, совершив нечто вроде затухающего колебания. В нервных волокнах и скелетных мышцах длительность потенциала действия около 1 мс (а в сердечной мышце около 300 мс. После снятия возбуждения еще в течение 1–3 мс в мембране наблюдаются некоторые остаточные явления, во время которых мембрана рефрактерна (невозбудима).

Новый деполяризующий потенциал $V > V^{пор}$ может вызвать образование нового потенциала действия только после полного возвращения мембраны в состояние покоя. Причем амплитуда потенциала действия

$$\phi_m^д = |\phi_m^п| + \phi_m^{рев}$$

не зависит от амплитуды деполяризующего потенциала (если только $V > V^{пор}$). Если в покое мембрана поляризована (потенциал цитоплазмы отрицателен по отношению к внеклеточной среде), то при возбуждении происходит деполяризация мембраны (потенциал внутри клетки положителен) и после снятия возбуждения происходит реполяризация мембраны.

Характерные свойства потенциала действия:

1) наличие порогового значения деполяризующего потенциала;

2) закон «все или ничего», то есть, если деполяризующий потенциал больше порогового, развивается потенциал действия, амплитуда которого не зависит от амплитуды возбуждающего импульса и нет потенциала действия, если амплитуда деполяризующего потенциала меньше пороговой;

3) есть период рефрактерности, невозбудимости мембраны во время развития потенциала действия и остаточных явлений после снятия возбуждения;

4) в момент возбуждения резко уменьшается сопротивление мембраны (у аксона кальмара от $0,1 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ в покое до $0,0025 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ при возбуждении).

Если обратиться к данным для значений равновесных нернстовских потенциалов, созданных различными ионами, естественно предположить, что положительный потенциал реверсии имеет натриевую природу, поскольку именно диффузия натрия создает положительную разность потенциалов между внутренней и наружной поверхностями мембраны.

Можно менять амплитуду импульса потенциала действия, изменяя концентрацию натрия в наружной среде. При уменьшении наружной концентрации натрия амплитуда потенциала действия уменьшается, так как меняется потенциал реверсии. Если из окружающей клетку среды полностью удалить натрий, потенциал действия вообще не возникает.

Опыты, проведенные с радиоактивным изотопом натрия, позволили установить, что при возбуждении проницаемость для натрия резко возрастает. Если в состоянии покоя соотношение коэффициентов проницаемости мембраны аксона кальмара для разных ионов:

$$P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,45$$

то в состоянии возбуждения:

$$P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:20:0,45$$

то есть, по сравнению с невозбужденным состоянием, при возбуждении коэффициент проницаемости для натрия возрастает в 500 раз.

Расчеты мембранного потенциала реверсии по уравнению Гольдмана, если в него подставить значения проницаемостей мембраны для возбужденного состояния, совпадают с экспериментальными данными.

Возбуждение мембраны описывается уравнениями Ходжкина-Хаксли. Одно из уравнений Ходжкина-Хаксли имеет вид:

$$I_M = C_M \frac{d\phi_M}{dt} + \sum I_i,$$

где I_M – ток через мембрану, C_M – емкость мембраны, $\sum I_i$ – сумма ионных токов через мембрану.

Электрический ток через мембрану складывается из ионных токов: ионов калия – I_{K+} , натрия – I_{Na+} и других ионов, в том числе Cl , так называемого тока утечки I_K , а также емкостного тока. Емкостной ток обусловлен перезарядкой конденсатора, который представляет собой мембрана, перетеканием зарядов с одной ее поверхности на другую. Его величина опреде-

ляется количеством заряда, перетекающего с одной обкладки на другую за единицу времени dq/dt , а поскольку заряд конденсатора $q = C_m \Delta \phi = C_m \phi_m$, то емкостной ток $C_m \frac{d\phi_m}{dt}$. Полный мембранный ток

$$I_M = C_M \frac{d\phi_M}{dt} + I_K + I_{Na} + I_{VT}.$$

Согласно теории Ходжкина-Хаксли, возбуждение элемента мембраны связано с изменениями проводимости мембраны для ионов Na^+ и K^+ : g_K и g_{Na} . Проводимости мембраны сложным образом зависят от мембранного потенциала и времени. Будем считать ток, направленный из клетки наружу в окружающий раствор положительным, а внутрь клетки из окружающего раствора – отрицательным.

Обнаружено, что, если поднять мембранный потенциал (ϕ_m выше порогового, сначала течет ток внутрь клетки, а затем из клетки наружу). В экспериментах, проведенных Ходжкиным, Хаксли, Бейкером, Шоу, было доказано, что фаза I мембранного тока связана с потоком ионов натрия из окружающей среды (где концентрация натрия больше) в клетку (где она меньше), а фаза II объясняется вытеканием ионов калия из клетки наружу.

В своих опытах Ходжкин и Хаксли изменяли ионный состав окружающего раствора. Было обнаружено, что, если снаружи убирали натрий, первая фаза мембранного тока (ток внутрь клетки) пропадала. Следовательно, на самом деле, первая фаза развития потенциала действия связана с увеличением проницаемости мембраны для ионов натрия. Поток положительных частиц в клетку приводит к деполяризации мембраны - внутренняя ее поверхность заряжается положительно по отношению к наружной.

Во второй фазе резко увеличивается проницаемость мембраны для калия и из клетки наружу выходят положительно заряженные ионы калия, в то время как натриевый ток уменьшается. Ионный механизм развития потенциала действия был окончательно доказан в решающем эксперименте Ходжкина, Бейкера и Шоу, в котором аксоплазму препарированного аксона заменили на наружный раствор, а ионный состав наружного раствора сделали таким же, как у нормальной аксоплазмы. При такой замене ионных составов изменила знак разность потенциалов на мембране. Теперь в покое внутренняя ее поверхность была заряжена положительно по отношению к наружной. А потенциал действия оказался отрицательным.

Выдвинута гипотеза, что селективное (избирательное) изменение ионной проницаемости возбужденной мембраны: сначала для Na^+ , а потом для K^+ – объясняется тем, что в мембране имеются специальные ионные каналы. Существуют отдельно натриевые и калиевые каналы, которые открываются и закрываются во время прохождения через данный участок мембраны нервного импульса. В первой фазе – открываются натриевые каналы, во второй фазе – калиевые. Соответственно, сначала закрываются натриевые каналы, а затем калиевые. Открывание и закрывание ионных каналов вызывается изменением мембранного потенциала.

Одно из доказательств наличия в мембране ионных каналов - существование веществ, блокирующих ионные потоки через мембрану. Так, содержащийся в рыбе фугу тетродотоксин блокирует поступление внутрь клетки натрия и, таким образом, нарушает передачу нервного импульса, что может привести к летальному исходу. Доказано, что тетродотоксин не влияет на проницаемость клетки для калия, значит, ионы натрия и калия на самом деле проходят через разные каналы. Из-за своего специфического строения молекулы тетродотоксина, по-видимому, застревают в натриевых каналах. Подсчитав число застрявших в мембране молекул тетродотоксина, удалось определить количество натриевых каналов. В разных нервных волокнах позвоночных оно было разным – от 3 до 75 каналов на один квадратный микрометр площади мембраны (для сравнения количество молекул фосфолипидов $\approx 2 \cdot 10^6$ 1/мкм²).

Был обнаружен и специфический ингибитор калиевых каналов – *тетраэтиламмоний*. Если обработать мембрану тетродотоксином, блокирующим натриевые каналы, в опытах с фиксацией мембранного потенциала пропадает первая фаза, а тетраэтиламмоний прекращающий перенос через мембрану калия, вызывает исчезновение второй фазы.

Таким образом, установлено, что формирование потенциала действия вызывается ионными потоками через мембрану: сначала ионов натрия внутрь клетки, а затем – ионов калия из клетки в наружный раствор, что связано с изменением проводимости мембраны для ионов калия и натрия.

2. Распространение нервного импульса вдоль возбудимого волокна

Если в каком-нибудь участке возбудимой мембраны сформировался потенциал действия, мембрана деполяризована, возбуждение распространяется на другие участки мембраны. Рассмотрим распространение возбуждения на примере передачи нервного импульса по аксону (рис. 3).



Рис. 3 – Локальные токи при распространении нервного импульса по нервному волокну.

И в аксоплазме, и в окружающем растворе возникают локальные токи: между участками поверхности мембраны с большим потенциалом (положительно заряженными) и участками с меньшим потенциалом (отрицательно заряженными).

Локальные токи образуются и внутри аксона, и на наружной его поверхности. Локальные электрические токи приводят к повышению потенциала внутренней поверхности невозбужденного участка мембраны $\varphi_{\text{вн}}$ и к понижению $\varphi_{\text{нар}}$ наружного потенциала невозбужденного участка мембраны, оказавшегося по соседству с возбужденной зоной. Таким образом, отрицательный потенциал покоя $\varphi^{\text{п}}$ уменьшается по абсолютной величине, то есть повышается. В областях, близких к возбужденному участку, $\varphi_{\text{м}}$ повышается выше порогового значения. Под действием изменения мембранного потенциала открываются натриевые каналы и дальнейшее повышение происходит уже за счет потока ионов натрия через мембрану.

Происходит деполяризация мембраны, развивается потенциал действия. Затем возбуждение передается дальше на покоящиеся участки мембраны.

Может возникнуть вопрос, почему возбуждение распространяется по аксону не в обе стороны от зоны, до которой дошло возбуждение, ведь локальные токи текут в обе стороны от возбужденного участка. Дело в том, что возбуждение может распространяться только в область мембраны, находящуюся в состоянии покоя, то есть в одну сторону от возбужденного участка аксона. В другую сторону нервный импульс не может распространяться, так как области, через которые прошло возбуждение, некоторое время остаются невозбудимыми – рефрактерными.

Повышение мембранного потенциала – величина деполяризующего потенциала V , передаваемого от возбужденных участков вдоль мембраны, зависит от расстояния x (как это следует из электродинамики) по формуле:

$$V(x) = V_0 e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

V_0 – повышение мембранного потенциала в зоне возбуждения, x – расстояние от возбужденного участка; λ , – константа длины нервного волокна, равная расстоянию, на котором деполяризующий потенциал уменьшается в e раз.

Константа длины нервного волокна

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m \delta a}{2r_i}},$$

где r_m – удельное электрическое сопротивление оболочки волокна, δ – толщина оболочки, a – радиус нервного волокна, r_i – удельное электрическое сопротивление цитоплазмы. Чем больше константа длины мембраны, тем больше скорость распространения нервного импульса. Величина λ тем больше, чем больше радиус аксона и удельное сопротивление мембраны и чем меньше удельное сопротивление цитоплазмы.

Большую скорость распространения нервного импульса по аксону кальмара обеспечивает их гигантский по сравнению с аксонами позвоночных диаметр. У позвоночных большая скорость передачи возбуждения в нервных волокнах достигается другими способами. Аксоны позвоночных снабжены миелиновой оболочкой, которая увеличивает сопротивление мембраны и ее толщину.

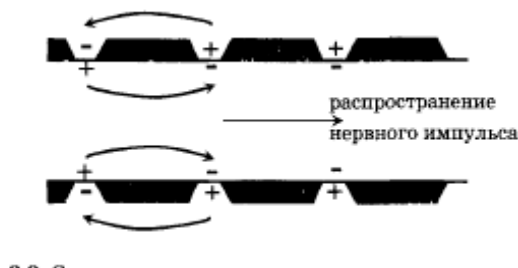


Рис. 4 – Сальтаторное распространение потенциала действия по миелинизированному волокну.

Возбуждение по миелинизированному волокну распространяется сальтаторно (скачкообразно) от одного перехвата Ранвье (участка, свободного от миелиновой оболочки) до другого. Нервные импульсы проводятся по аксонам в какой-то степени аналогично тому, как передаются электрические сигналы по кабельно-релейной линии. Электрический импульс передается без затухания за счет его усиления на промежуточных релейных станциях, роль которых в аксонах выполняют участки возбудимой мембраны, в которых генерируются потенциалы действия.

3. Свойства ионных каналов 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 K в формулах очень мала, а следовательно, был бы мал и поток ионов, если бы ион переходил непосредственно через липидную фазу мембраны. Таким образом, непосредственный перенос ионов через липидный бислой только за счет диффузии маловероятен.

Можно предположить, 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 мембраны клеток, постсинаптической мембраны 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 мембранного 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 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 не основного 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.

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 радиоактивно меченного блокатора натриевых каналов – тетродотоксина. Известно, что одна молекула ТТХ связывается только с одним каналом. Тогда измерение радиоактивности образца с известной площадью позволило показать, что на 1 мкм^2 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, обусловлены суммарным ответом (изменением проводимости) $500 \cdot 3 \cdot 10^7 - 10^{10}$ ионных каналов. Для такого ответа характерно плавное во времени изменение проводимости. Ответ одиночного ионного канала меняется во времени принципиально иным образом: дискретно и для Na^+ -каналов, и для K^+ -, и для Ca^{2+} -каналов.

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 откроется именно в этот момент времени. Можно лишь сделать утверждение о вероятности открывания канала в определенном интервале времени.

Рассмотрим токи через одиночные Ca^{2+} -каналы.

*Канал за время одного такого деполяризующего сдвига открывался лишь один раз на время $t_{\text{и}}$, которое будем называть **временем открытого состояния канала**.*

Среднее значение $t_{\text{и}}$ для Ca^{2+} -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 $\phi_{\text{м}}$ 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 Ca^{2+} -тока.

Несмотря на то, что ток через каждый ионный канал меняется скачком, зависимость суммарного трансмембранного тока во времени плавная. 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 I суммарного тока в случае одинаковых каналов определяется средним током i в каждом канале:

$$I = Ni$$

Относительная флуктуация тока в одиночном канале велика:

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

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

Токи одиночных K^{+} -каналов имеют амплитуду до 2 пА, а среднее время открытого состояния $t_{\text{а}} \approx 5$ 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 инактиви-

вируются, пока ϕ_m выше порогового значения. Отдельные каналы во время деполяризации могут открываться по несколько раз.

Токи одиночных Ca^{2+} -каналов кардиомиоцитов имеют более сложный характер по сравнению с Na^+ - и K^+ -токами 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 деполяризий кальциевый канал остается закрытым.

4. Зависимость параметров канала от мембранного потенциала Ионные каналы нервных волокон чувствительны к мембранному потенциалу, например натриевый и калиевый каналы аксона кальмара. Это проявляется в том, что после начала деполяризации мембраны соответствующие токи начинают изменяться. Ион-селективный канал имеет сенсор – некоторый элемент своей конструкции, чувствительный к действию электрического поля. При изменении мембранного 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 мембраны увеличивается вероятность перехода натриевого канала в проводящее состояние. Скачок напряжения на мембране, 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 мембранах, получаются вследствие суммации многих скачкообразных токов, протекающих через отдельные каналы. Их суммирование, как показано выше, резко уменьшает флуктуации и дает достаточно гладкие зависимости трансмембранного тока от времени.

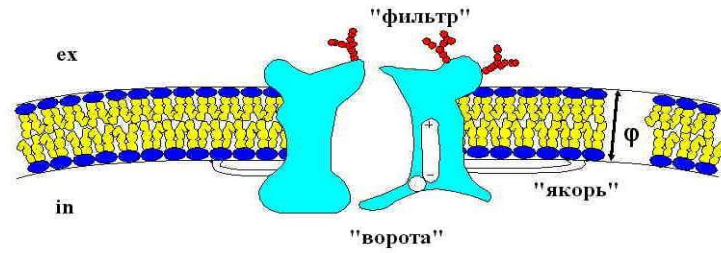
Ионные каналы могут быть чувствительны и к другим физическим воздействиям: механическим деформациям, связыванию химических веществ и т.д. В этом случае они являются структурной основой, соответственно, механорецепторов, хеморецепторов и т.д.

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

4. Типы управляемых каналов и насосы

1)

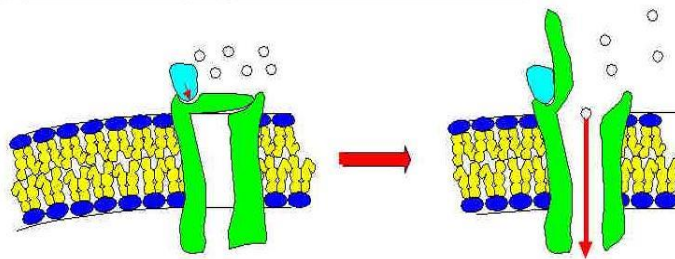
Потенциалуправляемый канал



«Ворота» канала системой «рычагов» соединены с диполем, который может поворачиваться, открывая или закрывая ворота. «якорные части» фиксируют положение белка в мембране (в незакреплённом состоянии белок способен совершать латеральное движение по мембране).

2)

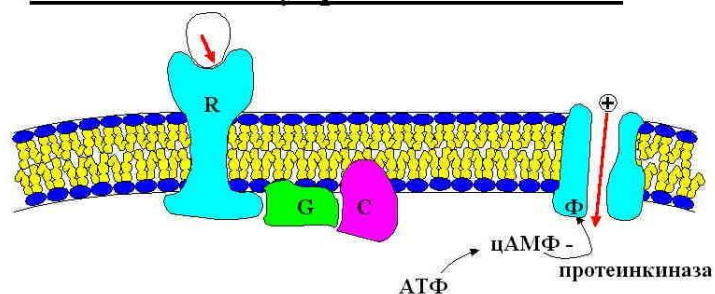
Прямо-хемоуправляемый канал



На белок садится некий интермедиат, меняя его конформацию, вследствие чего канал открывается. После отделения интермедиата от белка, канал закрывается.

3)

Косвенно-хемоуправляемый канал



Состоят из нескольких белковых фракций. На R-белок садится некое вещество (например гормон), вызывая конформационные изменения этого белка. R-белок «механически» взаимодействует с G-белком, который, в свою очередь, взаимодействует с C-белком. C-белок осуществляет реакцию $ATP \rightarrow cAMP + 2F$ и активизирует протеинкиназу, присоединяя Φ к белку-каналу, после чего канал открывается.

Na^+, K^+ -насос или Na^+, K^+ -АТФаза. Натриево-калиевые насосы, имеющиеся в плазматических мембранах всех животных клеток, работают по принципу антипорта, активно выкачивая катионы Na^+ из клетки, а K^+ в клетку против градиентов их концентраций (а в случае Na^+ и против электрического градиента).

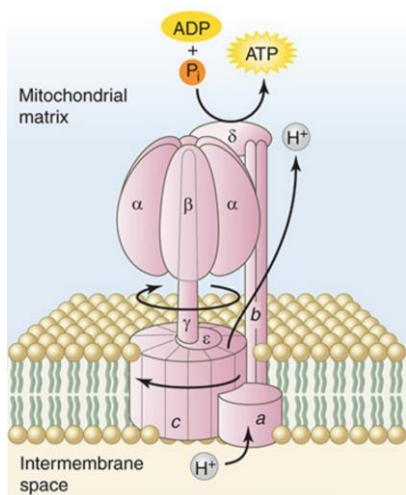
Градиенты концентраций ионов Na^+ и K^+ , поддерживаемые Na^+, K^+ -насосом, ответственны в клетке не только за ее мембранный потенциал (цитоплазма клетки заряжена отрицательно по отношению к внеклеточному пространству), но и за регуляцию клеточного объема (явление осмоса), а также за активный транспорт сахаров и аминокислот по механизму симпорта.

Механизм работы Na^+, K^+ -насоса. Экспериментально установлено и доказано, что источником энергии для работы Na^+, K^+ -насоса служит гидролиз АТФ. Na^+, K^+ -насос представляет собой фермент – Na^+, K^+ -АТФ-азу. Этот фермент состоит из 2-х субъединиц: трансмембранной, обладающей каталитической активностью (100000 Д), и ассоциированного с ней гликопротеина (45000 Д). Каталитическая субъединица имеет участки связывания на наружной поверхности цитоплазмы для ионов Na^+ и АТФ, а на внутренней – для ионов K^+ и ингибитора фермента – убаина. Функция гликопротеина остается пока невыясненной. Установлено, что работа Na^+, K^+ -насоса происходит следующим образом:

- Концевая фосфатная группа АТФ в присутствии ионов Na^+ переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле фермента Na^+, K^+ -АТФ-азы. Na^+ -зависимое фосфорилирование, вероятно, изменяет конформацию АТФ-азы, что каким-то образом приводит к выведению катионов Na^+ из клетки.

- Связавшаяся с ферментом фосфатная группа затем гидролизуется в присутствии ионов K^+ (именно этот процесс ингибируется убаином).

- K^+ -зависимое дефосфорилирование, вероятно, обуславливает транспорт K^+ внутрь клетки и возвращение АТФ-азы в первоначальное состояние.



Таким образом, биологическая функция Na^+, K^+ -насоса состоит в гидролитическом расщеплении АТФ и использовании высвобождающейся при этом свободной энергии для перекачивания ионов K^+ из окружающей среды внутрь клетки, а ионов Na^+ – из клетки во внеклеточное пространство. В различных клеточных мембранах важную роль играют АТФ-азы, транспортирующие другие катионы (H^+ , Ca^{2+}).

H^+ -АТФ-синтетазы. В плазматических мембранах аэробных бактерий и во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток присутствуют ферменты АТФ-синтетазы, которые катализируют синтез АТФ из АДФ и фосфата. Этот процесс осуществляется благодаря наличию на этих мембранах градиента концентраций протонов.

Лекция 4

СИНАПС. СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА

Рассматриваемые вопросы:

1. Нервно-мышечный синапс. Потенциал концевой пластинки и потенциал действия.
2. Типы медиаторов (трансммиттеров) и механизмы их действия.

1. Нервно-мышечный синапс. Потенциал концевой пластинки и потенциал действия

Синапс – специализированный контакт между нервными клетками (или нервными и другими возбудимыми клетками), обеспечивающий передачу возбуждения с сохранением его информационной значимости. С помощью синапсов нервные клетки объединяются в нервные сети, которые осуществляют обработку информации. Взаимосвязь между нервной системой и периферическими органами и тканями также осуществляется при помощи синапсов.

Синаптическая передача возможна при реализации ряда последовательных процессов: синтез медиатора, его накопление и хранение в синаптических пузырьках вблизи пресинаптической мембраны, высвобождение нейромедиатора из нервной терминали, кратковременное взаимодействие нейромедиатора с рецептором, встроенным в постсинаптическую мембрану; разрушение нейромедиатора или захват его нервной терминалью.

1. Молекулы нейромедиатора поступают в мембранные синаптические пузырьки, располагающиеся в пресинаптической терминали и концентрирующиеся в активных зонах пресинаптической мембраны.

2. Приходящий по аксону потенциал действия (ПД) деполяризует пресинаптическую мембрану.

3. Вследствие деполяризации открываются потенциалозависимые Ca^{2+} - каналы, и Ca^{2+} поступает в терминаль.

4. При увеличении внутриклеточного Ca^{2+} запускается слияние синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной и выброс нейромедиатора в синаптическую щель (экзоцитоз).

5. Кванты нейромедиатора, поступившие в синаптическую щель, диффундируют в ней. Часть молекул нейромедиатора связывается со специфическими для них рецепторами лигандзависимых каналов расположенных на постсинаптической мембране.

6. Связавшие нейромедиаторрецепторы активируют канал, что приводит к изменению поляризации постсинаптической мембраны либо прямо (поступление ионов Na^+ , Ca^{2+} через каналы), либо опосредованно - активация ионных каналов через систему G– белка (метаботропные рецепторы).

7. Инактивация нейромедиаторов происходит либо путем их ферментативной деградации, либо молекулы нейромедиатора захватываются клетками.

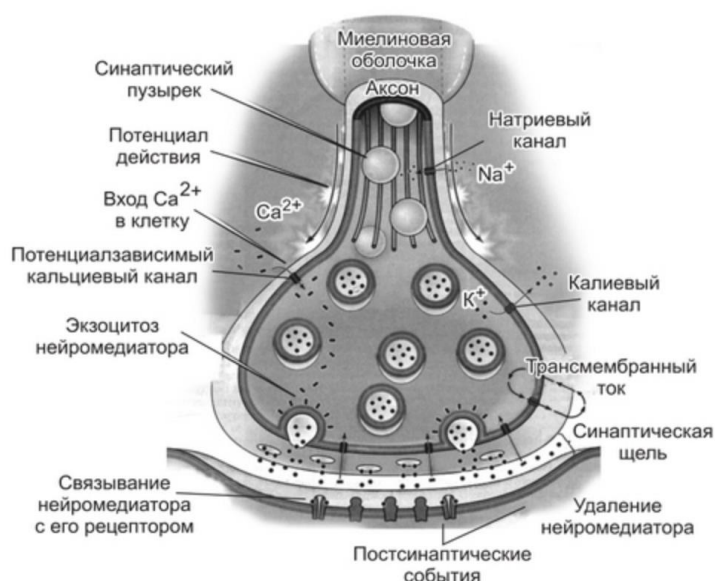


Рис. 1 – Строение химического синапса.

2. Типы медиаторов (трансммиттеров) и механизмы их действия

Ацетилхолин. Является медиатором для всех двигательных нейронов, многих интернейронов ЦНС, а также нейронов парасимпатической нервной системы.

Существует 2 типа рецепторов ацетилхолина: АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к никотину: никотиновый АЦХрецептор и, соответственно, никотиновый АЦХ (нАЦХ) синапс, и АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к мускарину – мускариновый АЦХ-рецептор и, соответственно, мускариновый (мАЦХ) АЦХ синапс. АЦХ синапс с никотиновым рецептором являются ионотропными, а АЦХ синапсы с мускариновым рецептором являются метаботропными.

Глутамат в синапсах выполняет функцию трансмиттера и ко-трансмиттерами (может присутствовать одновременно с другими трансмиттерами, например с глицином). Глутамат в мозге является важнейшим трансмиттером для возбуждающих синапсов. Синапсы, использующие в качестве трансмиттера глутамат, находятся приблизительно на 50% нейронов центральной нервной системы. Такие синапсы образуют важнейшие возбуждающие входы систем мозга к коре большого мозга. Они принимают участие в процессах обучения. Глутамат прямо открывает неспецифический ионный канал для катионов.

Глицин служит трансмиттером тормозных синапсов и действует как нейромодулятор. Глицин предназначен для выполнения специфических ингибиторных задач. Большинство клеток Реншоу, через которые

тормозятся α -мотонейроны спинного мозга, выбрасывают глицин. Глициновые рецепторы открывают каналы для ионов Cl^- , что способствует возникновению так называемых тормозных постсинаптических потенциалов (тормозных потенциалов синаптической пластинки - ТПСП). Синаптическое действие заканчивается с помощью механизма обратного захвата глицина.

В центральной нервной системе глицин играет также и роль нейромодулятора, например, в гиппокампе NMDA-рецепторы, описанные в предыдущем разделе, испытывают модулирующее влияние со стороны глицина.

γ -Аминомасляную кислоту выбрасывают в качестве трансммиттера многие тормозные интернейроны, имеющиеся практически во всех отделах центральной нервной системы, и аксоны клеток Пуркинье мозжечка. ГАМК оказывает тормозное действие на постсинаптические структуры. Существует по меньшей мере два различных постсинаптических механизма, которые запускаются благодаря различным рецепторам (ГАМК_A и ГАМК_C с одной стороны; ГАМК_B с другой стороны).

Серотонин (5-hydroxytryptamin) – биогенный амин, широко распространенный в ЦНС. В мозге его особенно много в области тектума. Оттуда наблюдается много проекций в лимбическую систему, к таламусу и гипоталамусу, в передний мозг, в мозжечок и в спинной мозг. По этим путям, очевидно, осуществляется контроль многих нейрональных функций. На постсинаптической мембране были обнаружены различные серотониновые рецепторы, которые большей частью, благодаря вторичным мессенджерам, открывают каналы для ионов K^+ и Ca^{2+} . Действие трансммиттера заканчивается включением механизма обратного захвата пресинаптической областью.

Гистамин – моноамин, выступающий в качестве трансммиттера. Особенно важную роль он играет как модулятор в мозге грудных детей. Гистаминергические нейроны у взрослых находятся в заднем гипоталамусе и связаны со многими участками мозга, где они оказывают влияние на состояние бодрствования, мышечную активность, прием пищи, сексуальные отношения и обменные процессы в мозге. Из-за участия этих нейронов в регуляции процессов сна и бодрствования многие антигистаминные препараты вызывают состояние сонливости.

Дофамин – биогенный амин, наиболее представленный в базальных ганглиях, где нейроны черной субстанции образуют дофаминергический путь к стриатуму, выполняя функцию контроля моторики. Дофаминергические пути, которые исходят от *area ventalisegmentalis* и проецируются к *nucleus accumbens*, играют большую роль в патогенезе эпилепсии.

Существуют различные дофаминовые рецепторы, действующие через вторичные мессенджеры. Их постсинаптическое действие может

быть тормозным или возбуждающим. Дофамин очень быстро захватывается обратно из синаптической щели в пресинаптическое окончание. Там он претерпевает превращения благодаря моноаминоксидазе. Вне нейрона, он подвергается воздействию катехол-О-метилтрансферазы.

Норадреналин катехоламин, выполняющий функцию трансммиттера в ЦНС и синтезирующийся прежде всего нейронами *locuscoeruleus*. Это ядро состоит не более чем из 1000 клеток, аксоны которых так многократно разветвляются, что можно найти адренергические окончания во многих областях ЦНС. Они оказывают модулирующее влияние, например, на процессы созревания, обучения, переработку информации в мозгу, регуляцию сна и на эндогенное торможение боли. В периферической нервной системе норадреналин служит важным трансммиттером симпатических постганглионарных окончаний, например, на сердце и на гладких мышцах сосудов. В некоторых центральных синапсах как трансммиттер рассматривают адреналин.

Для катехоламинов существует четыре главных типа рецепторов: α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Они отличаются по реакции на различные агонисты или антагонисты, а также по постсинаптическим эффектам. Рецепторы α_1 управляют Ca^{2+} -каналами при помощи вторичного мессенджера IP_3 и при активации повышают внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} . Активация рецепторов ведет к уменьшению концентрации вторичного мессенджера цАМФ, вызывая различные эффекты.

Активация рецепторов β , например, на клетках Пуркинье мозжечка, повышает при помощи вторичного мессенджера цАМФ проводимость мембраны для ионов K^+ и, таким образом, образует ТПСР. Обратный захват и разрушение похожи на таковые для дофамина

Олигопептиды, которые действуют как трансммиттеры или нейромодуляторы – это преимущественно короткие полипептиды, состоящие из 2-30 аминокислотных остатков. Они функционируют как трансммиттеры или ко-трансммиттеры либо модулируют синаптические процессы. Так **энкефалин**, **эндорфин** и **динорфин** служат трансммиттерами в тех синапсах, в которых опиоидные вещества также оказывают действие. Опиоиды (например, морфин) являются сильными анальгетиками. Вышеназванные опиоидные пептиды тормозят распространение боли в спинном мозге. Кроме того, они играют большую роль в лимбической, автономной и моторной системах.

Другие нейропептиды: **вещество Р**, **ангиотензин II**, **соматостатин**, **вазоактивный интестинальный полипептид (VIP)**, **нейропептид Y** и многие другие. Большинство названных веществ были открыты в качестве гормонов прежде, чем была определена их роль в синаптическом переносе.

Лекция 5

ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ В МЫШЦАХ

Рассматриваемые вопросы:

1. Электромеханическое сопряжение в поперечнополосатой мышце.
2. Электромеханическое сопряжение в кардиомиоцитах.

1. Электромеханическое сопряжение в поперечнополосатой мышце

В состоянии покоя в мышечном волокне концентрация свободного, ионизированного Ca^{2+} в цитоплазме вокруг толстых и тонких филаментов очень низка, около 10^{-7} моль/л. При такой концентрации ионы Ca^{2+} занимают очень небольшое количество участков связывания на молекулах тропонина (тропонина С), поэтому тропомиозин блокирует связывание с актином поперечных мостиков. После потенциала действия концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме быстро возрастает, и они связываются с тропонином, устраняя блокирующий эффект тропомиозина и инициируя цикл поперечных мостиков. Источником поступления Ca^{2+} в цитоплазму служит **саркоплазматический ретикулум** мышечного волокна.

Саркоплазматический ретикулум мышц гомологичен эндоплазматическому ретикулуму других клеток. Он располагается вокруг каждой миофибриллы наподобие «рваного рукава», сегментами которого окружены А- и I-полосы. Концевые части каждого сегмента расширяются в виде так называемых **латеральных мешков** (терминальных цистерн), соединенных друг с другом серией более тонких трубок. В латеральных мешках депонируется Ca^{2+} , высвобождающийся после возбуждения плазматической мембраны.

Отдельную систему составляют **поперечные трубочки (Т-трубочки)**, которые пересекают мышечное волокно на границе полос А-I, проходят между латеральными мешками двух смежных саркомеров и выходят на поверхность волокна, составляя единое целое с плазматической мембраной. Просвет Т-трубочки заполнен внеклеточной жидкостью, окружающей мышечное волокно. Мембрана Т-трубочек, так же как плазматическая мембрана, способна к проведению потенциала действия. Возникнув в плазматической мембране, потенциал действия быстро распространяется по поверхности волокна и по мембране Т-трубочек вглубь клетки. Достигнув области Т-трубочек, прилегающей к латеральным мешкам, потенциал действия активирует потенциалзависимые «воротные» белки мембраны Т-трубочек, физически или химически сопряженные с кальциевыми каналами мембраны латеральных мешков. Таким образом, деполяризация мембраны Т-трубочек, обусловленная потенциалом действия, приводит к открыванию кальциевых каналов мембраны латеральных мешков, содержащих Ca^{2+} в высокой концентрации, и ионы Ca^{2+} выходят в цитоплазму. Повышение цитоплазматического уровня Ca^{2+} обычно бывает достаточным для активации всех поперечных мостиков мышечного волокна.

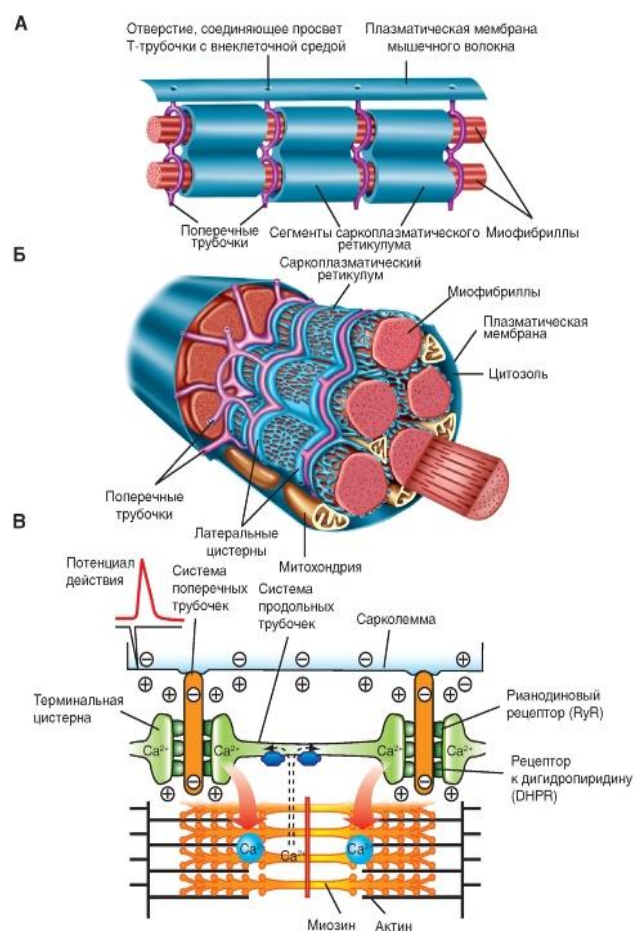
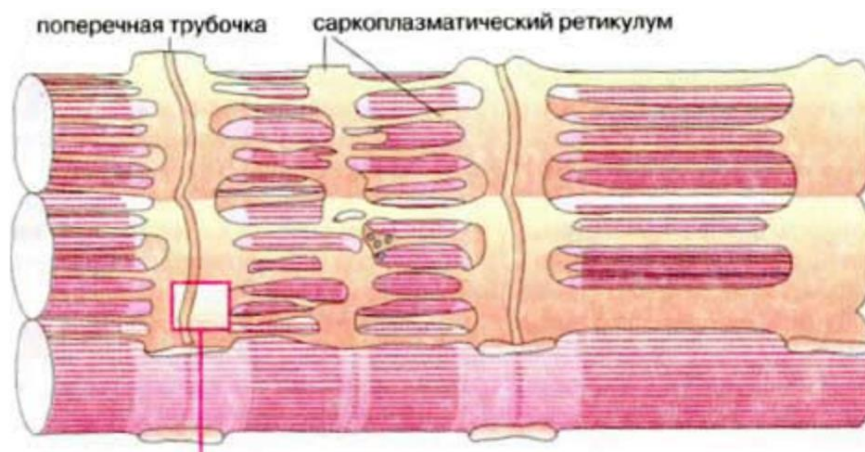


Рис. 1 – Саркоплазматический ретикулум и его роль в механизме сокращения мышцы.
 А – схема организации саркоплазматического ретикулума, поперечных трубочек и миофибрилл. Б – схема анатомической структуры поперечных трубочек и саркоплазматического ретикулума в индивидуальном волокне скелетной мышцы.
 В – роль саркоплазматического ретикулума в механизме сокращения скелетной мышцы.

Процесс сокращения продолжается, пока ионы Ca^{2+} связаны с тропонином, т.е. до тех пор, пока их концентрация в цитоплазме не вернется к низкому исходному значению. Мембрана саркоплазматического ретикулума содержит Са-АТФазу – интегральный белок, осуществляющий активный транспорт Ca^{2+} из цитоплазмы обратно в полость саркоплазматического ретикулума. Как только что говорилось, Ca^{2+} высвобождается из ретикулума в результате распространения потенциала действия по Т-трубочкам; для возвращения Ca^{2+} в ретикулум нужно гораздо больше времени, чем для его выхода. Именно поэтому, повышенная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме сохраняется в течение некоторого времени, и сокращение мышечного волокна продолжается после завершения потенциала действия.

Таким образом, сокращение обусловлено высвобождением ионов Ca^{2+} , хранящихся в саркоплазматическом ретикулуме. Когда Ca^{2+} поступает обратно в ретикулум, сокращение заканчивается и начинается расслабление.

Электромеханическое сопряжение. Это последовательность процессов, в результате которых потенциал действия плазматической мембраны мышечного волокна приводит к запуску сокращения мышцы или к так называемому циклу поперечных мостиков.

Плазматическая мембрана скелетных мышц электрически возбудима и способна генерировать распространяющийся потенциал действия посредством механизма, аналогичного тому, который действует в нервных клетках. Потенциал действия в волокне скелетной мышцы длится 1-2 мс и заканчивается раньше, чем появятся какие-либо признаки механической активности. Начавшаяся механическая активность может продолжаться более 100 мс. Электрическая активность плазматической мембраны не оказывает **прямого** влияния на сократительные белки, а вызывает повышение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , которые продолжают активировать сократительный аппарат и после прекращения электрического процесса.

Нервно-мышечное соединение (концевая пластинка).

Сигналом для запуска сокращения служит потенциал действия плазматической мембраны волокна скелетной мышцы. В скелетных мышцах потенциалы действия можно вызвать только одним способом - раздражением нервных волокон.

Волокна скелетных мышц иннервируются аксонами нервных клеток, называемых **мотонейронами** (или соматическими эфферентными нейронами). Тела этих клеток расположены в стволе мозга или в спинном мозге. Аксоны мотонейронов покрыты миелиновой оболочкой, а их диаметр больше, чем у других аксонов, поэтому они проводят потенциалы действия с высокой скоростью, обеспечивая поступление сигналов из ЦНС к волокнам скелетных мышц лишь с минимальной задержкой.

Войдя в мышцу, аксон мотонейрона разделяется на множество ветвей, каждая из которых образует одно соединение с мышечным волокном. Один мотонейрон иннервирует много мышечных волокон, но

каждым мышечным волокном управляет ветвь только от одного мотонейрона. Мотонейрон вместе с мышечными волокнами, которые он иннервирует, составляет **двигательную единицу**. Мышечные волокна одной двигательной единицы находятся в одной и той же мышце, но не в виде компактной группы, а рассеяны по мышце. Когда в мотонейроне возникает потенциал действия, все мышечные волокна его двигательной единицы получают стимул к сокращению.

При подходе аксона к поверхности мышечного волокна миелиновая оболочка заканчивается, и аксон образует терминальную часть (нервное окончание) в виде нескольких коротких отростков, располагающихся в желобках на поверхности мышечного волокна. Область плазматической мембраны мышечного волокна, лежащая непосредственно под нервным окончанием, обладает особыми свойствами и называется **двигательной концевой пластинкой**. Структура, состоящая из нервного окончания и двигательной концевой пластинки, известна как **нервно-мышечное соединение** (нервно-мышечный синапс).

Терминали аксонов мотонейрона (двигательные нервные окончания) содержат везикулы, заполненные АЦХ. Поступающий от мотонейрона потенциал действия деполяризует плазматическую мембрану нервного окончания, вследствие чего открываются потенциалуправляемые Ca^{2+} -каналы, и в нервное окончание входит Ca^{2+} из внеклеточной среды. Ионы Ca^{2+} связываются с белками, обеспечивающими слияние мембраны везикул с плазматической мембраной нервного окончания, и происходит освобождение АЦХ в синаптическую щель, разделяющую нервное окончание и двигательную концевую пластинку. Молекулы АЦХ диффундируют от нервного окончания к двигательной концевой пластинке, где они связываются с ацетилхолиновыми рецепторами никотинового типа, при этом открываются ионные каналы, проницаемые как для Na^+ , так и для K^+ . Из-за разницы трансмембранных электрохимических градиентов этих ионов, входящий в мышечное волокно поток Na^+ больше, чем выходящий поток K^+ , благодаря чему возникает местная деполяризация двигательной концевой пластинки – **потенциал концевой пластинки (ПКП)**. ПКП аналогичен ВПСП в межнейронных синапсах. Однако амплитуда одиночного ПКП существенно выше, чем амплитуда ВПСП, потому что в нервно-мышечном соединении высвобождаемый нейромедиатор попадает на более обширную поверхность, где он связывается с гораздо большим количеством рецепторов, и где, следовательно, открывается намного больше ионных каналов. По этой причине амплитуда одиночного ПКП обычно бывает более чем достаточной для того, чтобы в смежной с концевой пластинкой области плазматической мышечной мембраны возник местный электрический ток, инициирующий потенциал действия. Затем потенциал действия распространяется по поверхности мышечного волокна посредством такого же механизма, что и в мембране аксона. Большинство нервно-мышечных соединений расположено в

срединной части мышечного волокна, откуда возникший потенциал действия распространяется к обоим концам волокна. В скелетной мышце человека никогда не возникают тормозные потенциалы.

Все нервномышечные соединения – возбуждающие. Наряду с рецепторами АЦХ на двигательной концевой пластинке присутствует фермент **ацетихолинэстераза** (АЦХ-эстераза), которая расщепляет АЦХ. По мере того как концентрация свободного АЦХ снижается вследствие его расщепления АЦХ-эстеразой, уменьшается количество АЦХ, способного связываться с рецепторами. Когда не остается рецепторов, связанных с АЦХ, ионные каналы концевой пластинки становятся закрытыми. Деполяризация концевой пластинки завершается, мембранный потенциал возвращается к уровню покоя, и концевая пластинка вновь способна отвечать на АЦХ, высвобождаемый при поступлении к нервному окончанию следующего потенциала действия.

Электромеханическое сопряжение – это последовательность процессов, в результате которых потенциал действия плазматической мембраны мышечного волокна приводит к запуску цикла поперечных мостиков.

Последовательные явления от инициации потенциала мотонейрона до сокращения мышечного волокна

1. Потенциал действия, возникший в мотонейроне, распространяется по аксону.

2. Потенциал действия запускает высвобождение АЦХ из нервных окончаний в нервно-мышечные соединения.

3. АЦХ диффундирует от нервных окончаний к двигательной концевой пластинке мышечного волокна.

4. АЦХ связывается с рецепторами двигательной концевой пластинки, открывая ионные каналы для Na^+ и K^+

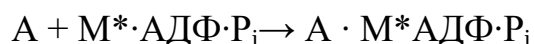
5. Входящий поток ионов Na^+ , который больше выхода ионов K^+ , деполяризует мембрану, вызывая потенциал концевой пластинки (ПКП)

6. Местные токи деполяризуют смежную область мышечной мембраны до порогового уровня, при котором генерируется потенциал действия, распространяющийся по поверхности мышечного волокна и по Т-трубочкам вглубь него.

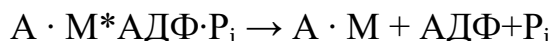
7. Потенциал действия, поступивший по мембране поперечных трубочек, запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума.

8. Ионы Ca^{2+} связываются с тропониномактиновыхфиломентов. В результате этого тропониозин смещается из своего блокирующего положения, открывая участки связывания актина с поперечными мостиками толстыхфиламентов.

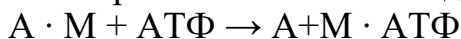
9. Получившие энергию миозиновые поперечные мостики связываются к актином:



10. Благодаря связыванию миозин освобождается из напряженной конформации: при этом каждый поперечный мостик совершает движение по дуге:



11. АТФ связывается с миозином, разрывая связь между актином и миозином, что позволяет поперечным мостикам отделиться от актина:



12. АТФ, связанная с миозином, расщепляется, снабжая энергией поперечные миозиновые мостики:



13. Поперечные мостики повторяют этапы с 9-го по 12-й, обеспечивая скольжение тонких филаментов вдоль толстых. Циклические движения поперечных мостиков повторяются до тех пор, пока Ca^{2+} остается связанным с тропонином.

14. Цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} снижается в процессе активного транспорта ионов посредством Ca^{2+} -АТФазы в саркоплазматический ретикулум.

15. При удалении Ca из тропонина, тропомиозин опять принимает блокирующее положение, циклические движения поперечных мостиков останавливаются, мышечное волокно расслабляется.

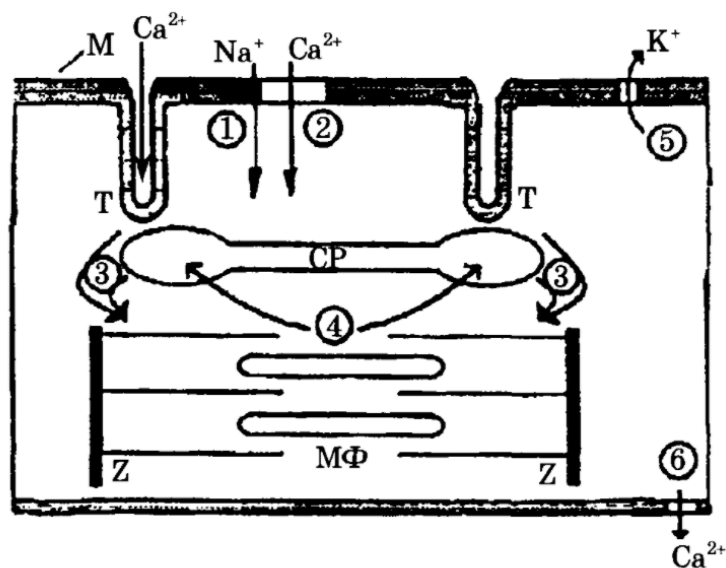


Рис. 2 – Электромеханическое сопряжение.

2. Электромеханическое сопряжение в кардиомиоцитах

Ранние исследования изолированного сердца позволили обнаружить, что для сокращения сердечной мышцы необходимы оптимальные концентрации Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Без Na^+ сердце невозбудимо, оно не станет биться, так как потенциал действия зависит от внеклеточных ионов натрия. Напротив, потенциал покоей мембраны не зависит от трансмембранного градиента ионов Na^+ . В нормальных условиях внеклеточная концентрация K^+ составляет около 4 мМ. Снижение концентрации внеклеточного K^+ не

оказывает большого влияния на возбуждение и сокращение сердечной мышцы. Однако увеличение концентрации внеклеточного K^+ до достаточно высоких уровней вызывает деполяризацию, потерю возбудимости клеток миокарда и остановку сердца в диастоле. Ca^{2+} также существенно важен для сердечных сокращений.

Удаление Ca^{2+} из внеклеточной жидкости приводит к уменьшению силы сердечных сокращений и последующей остановке сердца в диастоле. Напротив, увеличение концентрации внеклеточного Ca^{2+} усиливает сердечные сокращения, а очень высокие концентрации Ca^{2+} приводят к остановке сердца в систоле. Свободный внутриклеточный Ca^{2+} служит ионом, отвечающим за сократительную способность миокарда.

Возбуждение сердечной мышцы начинается, когда волна возбуждения быстро распространяется вдоль сарколеммы клеток миокарда от клетки к клетке через щелевые контакты. Возбуждение также распространяется внутрь клеток через поперечные трубки, которые инвагинированы в сердечные волокна на Z-полосах. Электростимуляция в области Z-полосы или аппликация ионизированного Ca^{2+} в области Z-полосы сердечных волокон, освобожденных от оболочки (с удаленными сарколеммами), вызывает локальное сокращение соседних миофибрилл. Во время плато потенциала действия повышается проницаемость сарколеммы для Ca^{2+} .

Ca^{2+} входит в клетку по его электрохимическому градиенту через кальциевые каналы сарколеммы и ее инвагинаций, т.е. через мембраны Т-системы. Считается, что открытие кальциевых каналов происходит в результате фосфорилирования протеинов каналов с помощью циклической аденозинмонофосфатзависимой протеинкиназы (цАМФ зависимой протеинкиназы). Первоначальным источником внеклеточного Ca^{2+} служит интерстициальная жидкость (10^{-3} М Ca^{2+}). Некоторое количество Ca^{2+} может также быть связано с сарколеммой и с **гликокаликсом**, мукополисахаридом, покрывающим сарколемму. Количество кальция, попадающего внутрь клетки из внеклеточного пространства, недостаточно для того, чтобы вызвать сокращение миофибрилл. Вошедший внутрь кальций запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (где есть запас внутриклеточного Ca^{2+}). Концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме возрастает от уровня покоя (*restinglevel*) примерно в 10^{-7} М до уровней от 10^{-6} до 10^{-5} М во время возбуждения. Затем Ca^{2+} связывается с белком тропонином С. Кальциевотропониновый комплекс взаимодействует с тропомиозином, чтобы снять блок с активных участков между актиновыми и миозиновыми филаментами. Это снятие блока позволяет образовываться циклическим поперечным связям между актином и миозином и, следовательно, позволяет миофибриллам сокращаться.

Механизмы, повышающие концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, увеличивают развиваемую силу сердечных сокращений (*activeforce*), а механизмы, которые снижают концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, уменьшают ее. Например,

катехоламины увеличивают поступление Ca^{2+} в клетку путем фосфорилирования каналов через цАМФ-зависимую протеинкиназу. К тому же катехоламины, подобно другим агонистам, увеличивают силу сердечных сокращений путем повышения чувствительности сократительного механизма к Ca^{2+} . Повышение концентрации внеклеточного Ca^{2+} или уменьшение градиента Na^+ через сарколемму также приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

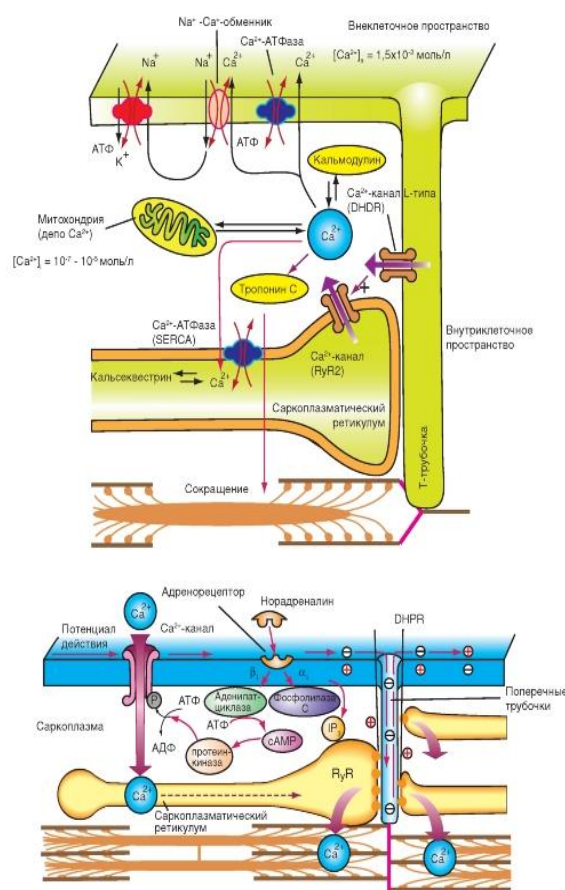


Рис. 3 – Электромеханическое сопряжение в сердце.

Градиент натрия может быть понижен путем увеличения внутриклеточной концентрации Na^+ или путем понижения внеклеточной концентрации Na^+ . Сердечные гликозиды повышают внутриклеточную концентрацию Na^+ путем «отравления» Na^+/K^+ -АТФазы, что приводит к аккумуляции Na^+ в клетках. Повышение концентрации Na^+ в цитозоле изменяет направление $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger) на противоположное, так что из клетки удаляется меньше Ca^{2+} . Пониженная концентрация внеклеточного Na^+ служит причиной того, что меньше Na^+ входит в клетку, и, таким образом, меньше Na^+ заменяется на Ca^{2+} .

Достигнутое механическое напряжение (*tension*) уменьшается за счет снижения концентрации внеклеточного Ca^{2+} , увеличения трансмембранного градиента Na^+ или применения блокаторов Ca^{2+} -каналов, которые препятствуют входу Ca^{2+} в клетки миокарда.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ремизов, А.Н. Медицинская и биологическая физика: учеб. для вузов / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко. – М., 2003. – С. 184–190.
2. Рубин, А.Б. Биофизика клеточных процессов / А.Б. Рубин. – М.: Университет, 2000.
3. Биофизика: учеб. для вузов / В.Ф. Антонов [и др.]. – М., 1999. – С. 8–31.
4. Биофизика: учеб. для вузов / Ю.А. Владимиров [и др.]. – М., 1983. – С. 95–121.
5. Артюхов, В.Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификации физико-химическими агентами: учеб. пособие / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина. – Воронеж, 1994. – С. 11–62; 102–114.
6. Барсуков, Л.И. Липосомы / Л.И. Барсуков // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 2–9.
7. Брагина, Н.А., Миронов А.Ф. Мембранология: учебно-методическое пособие / ИПЦ МИТХТ, 2002. С. 98.
8. Ремизов, А.Н. Медицинская и биологическая физика: учеб. для вузов / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко. – М., 2003. – С. 191–213.
9. Биофизика: учеб. для вузов / В.Ф. Антонов [и др.]. – М., 1999. – С. 32–48; 67–111.
10. Артюхов, В.Г. Биофизика: учеб. пособие / В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, В.П. Шмелев. – Воронеж, 1994. – С. 198–223.
11. Биофизика: учеб. для вузов / Ю.А. Владимиров [и др.]. – М., 1983. – С. 121–138; 141–143; 150–172.

Учебное издание

КЛЕТОЧНАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

Курс лекций

Составитель

ШИЛИНА Марина Владимировна

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

В.Л. Пугач

Подписано в печать 14.12.2021. Формат 60х84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,83. Тираж 30 экз. Заказ 195.

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».
210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.