

Системный подход в изучении генерации мембранного потенциала студентами биологических специальностей

М.В. Шилина

Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

В статье рассматривается компьютерная программа «Электрогенез в клетках», которая используется студентами биологического факультета УО «ВГУ им. П.М. Машерова» при изучении генерации мембранного потенциала на биологических мембранах в лабораторном практикуме по курсу «Биофизика». Данная программа позволяет оценивать влияние каждого параметра модели (концентрации ионов, проницаемость мембраны, работа Na^+ - K^+ -АТФазы) на генерацию потенциала. Интересно решение конструкции диалогового окна в компьютерной модели «Электрогенез в клетках»: меняя параметры модели, можно сравнивать и сопоставлять полученные потенциалы покоя и потенциалы действия. Программа позволяет моделировать процессы в моделях Ходжкина–Хаксли, Гольдмана и Томаса.

При рассмотрении моделей студенты имеют возможность изучить историческое решение данного вопроса, ограничения каждой модели, уровень влияния градиентов, концентраций, проницаемостей, транспортных структур на формирование мембранного потенциала. Компьютерная модель «Электрогенез в клетках» может дополняться или меняться по мере накопления новых научных данных.

Ключевые слова: моделирование, системный анализ, мембранный потенциал, модель Ходжкина–Хаксли.

System approach in biology students' studying the generation of membrane potential

M.V. Shilina

Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

The article describes computer simulation «Electrogenesis in cells» which is used by Biology students of Vitebsk State Masherov University when considering the generation of membrane potential in biological membranes in the laboratory course of Biophysics. This program makes it possible to evaluate the impact of each parameter of the model (ion concentration, membrane permeability, the work of the pump) on the generation of the potential. Dialogue window in the computer model «Electrogenesis in cells» is of special interest, while changing the parameters of the model one can compare the received potentials of stillness as well as potentials of action. The program makes it possible to simulate processes in the models of Hodgkin–Huxley, Goldman and Thomas.

While considering the models students have the opportunity to study the historical consideration of the issue, limitations of every model, gradient impact degree and transport structures on the formation of membrane potential. The computer model «Electrogenesis in cells» can be supplemented with or transformed when new data appear.

Key words: system analysis, modeling, membrane potential, Hodgkin–Huxley model.

В основе системного анализа лежит исследование материальных и идеальных объектов как систем, имеющих определенную структуру и содержащих определенное количество взаимосвязанных элементов. Методологическая специфика системного анализа определяется тем, что он ориентирует исследование на раскрытие целостности объекта и механизмов, обеспечивающих эту целостность, на выявление многообразных типов связей сложного объекта и сведение их в единую теоретическую картину. Явления саморегуляции, регенерации, генетического и физиологического гомеостаза являются системными образованиями, поэтому и изучаться они должны с позиций системного подхода. Данный подход направлен против редукционизма, который пытается любое сложное явление объяснить при помощи законов, управ-

ляющих поведением его составных частей, то есть сводит сложное к простому.

В современной науке системный подход выступает важнейшей методологической парадигмой. Для него характерно целостное рассмотрение объектов, определение характера взаимодействия составных частей или элементов и несводимость свойств целого к свойствам его частей.

Разнообразие живых систем во многом определяется многообразием структуры и функции клеточных мембран. Они не только формируют клетку и внутриклеточные структуры, отделяют клетку от внешней среды, защищают ее от проникновения патогенных и чужеродных соединений, но и играют роль селективного, тонко регулируемого барьера. Мембраны являются ключевым элементом в генерации электрических потенциалов, осуществлении межклеточных контактов, преобразовании и запаса-

нии в форме АТФ энергии света и окислительно-восстановительных реакций, а также в регуляции процессов секреции, повреждения и старения клетки. Изучение процессов на молекулярном и клеточном уровнях позволяет приблизить структурно-функциональную модель к оригиналу. Конечная цель исследований – создание адекватной теории, описывающей сложную биологическую систему на основе знаний физических принципов, лежащих в основе функционирования составляющих ее элементов. Процессы и явления, механизмы их взаимодействия и регуляции составляют важный раздел современной биофизики клетки.

Цель данной статьи – рассмотреть методологические подходы в изучении генерации мембранного потенциала на биологических мембранах с использованием компьютерной программы «Электрогенез в клетках», созданной специально для моделирования этих процессов [3].

Материал и методы. Программа «Электрогенез в клетках» создана для лабораторного практикума по курсу «Биофизика» в УО «ВГУ им. П.М. Машерова» и используется студентами биологического факультета для детального изучения генерации мембранного потенциала. С помощью данной программы можно оценивать влияние каждого параметра рассматриваемой модели (концентрация ионов, проницаемость мембраны, работа Na^+ - K^+ -АТФазы) на генерацию потенциала).

Генерация и распространение электрических потенциалов – важнейшее физическое явление в живых клетках и тканях, которое лежит в основе возбудимости клеток, регуляции внутриклеточных процессов, работы нервной системы, регуляции мышечного сокращения. Нарушение электрических характеристик отдельных клеток, нервных волокон и целых тканей может приводить к серьезным заболеваниям.

Изучение механизма возникновения клеточных потенциалов стало возможным, прежде всего, благодаря применению методов клеточной электрофизиологии, в развитии которых важную роль сыграли, во-первых, разработка техники микроэлектродных отведений, во-вторых, создание специальных усилителей биопотенциалов, в-третьих, выбор удачных объектов исследования, начиная с аксона кальмара и кончая разнообразными модельными мембранами [1]. Использование результатов электрофизиологических опытов в сочетании с физическим и математическим моделированием транспортных процессов лежит в основе современных теорий электрогенеза в клетках.

Результаты и их обсуждение. Первая рассматриваемая модель описывается уравнением Нернста–Планка и может быть применена к изучению диффузионного потенциала, формирующегося в системе электролитов типа «1:1», диссоциирующего на катион и анион. Тогда диффузионный потенциал является разностью потенциалов, возникающей в системе, находящейся в стационарном состоянии, между растворами электролитов с концентрациями C_1 и C_2 . При отсутствии электрического тока должно выполняться следующее соотношение для потоков катионов и анионов в единицу времени:

$$J_+ = J_- ,$$

где J_+ , J_- – плотности потоков катионов и анионов.

Условие электронейтральности должно выполняться для каждого элементарного объема:

$$C_+(x) = C_-(x) = C(x).$$

Применяя уравнение Нернста–Планка получим, используя только $z_+ = 1$, $z_- = -1$:

$$J_+ - J_- = 0 = - \left(D_+ \frac{dC}{dx} + D_+ C \frac{F}{RT} \frac{d\varphi}{dx} \right) + \left(D_- \frac{dC}{dx} - D_- C \frac{F}{RT} \frac{d\varphi}{dx} \right).$$

После преобразований получим:

$$\frac{d\varphi}{dx} = \frac{D_+ - D_-}{D_+ + D_-} \frac{RT}{F} \frac{1}{C} \frac{dC}{dx},$$

где D – коэффициент диффузии.

Проинтегрировав в пределах $x=0$ до $x=l$:

$$\int_0^l \frac{d\varphi}{dx} dx = -a \int_0^l \frac{1}{C(x)} \frac{dC}{dx} dx = -a \int_0^l \frac{d(\ln C)}{dx} dx,$$

$$\text{или } \varphi(l) - \varphi(0) = -a \ln \frac{C(l)}{C(0)},$$

получим уравнение диффузионного потенциала (потенциала Нернста):

$$\varphi = \frac{D_+ - D_-}{D_+ + D_-} \frac{RT}{F} \ln \frac{C_2}{C_1}.$$

Для моделирования вводим в таблицу параметры концентраций ионов $[\text{Na}^+]$, $[\text{K}^+]$, $[\text{Cl}^-]$ для цитозоля и интерстициальной жидкости изучаемого объекта (аксон кальмара, нервное волокно, мышца лягушки, кардиомиоцит и т.д.).

Вторая модель описывается уравнением Гольдмана.

Внутри живой клетки электрический потенциал φ_e отличается от потенциала снаружи φ_n ,

$$\varphi_m = \varphi_e - \varphi_n - \text{мембранный потенциал.}$$

Модель учитывает односторонние потоки через мембрану и различную проницаемость мембраны для конкретных ионов.

Для равновесного состояния мембранный потенциал описывается уравнением Нернста

$$\varphi_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^H}{C_K^B} \approx 59,1(\text{мВ}) \lg \frac{C_K^H}{C_K^B} \equiv \varphi_K.$$

Если в мембране открыты каналы только для одного типа ионов (K^+), тогда потенциал покоя клетки описывается данным уравнением.

Однако мембраны проницаемы также для ионов Na^+ и Cl^- . Для каждого типа ионов в клетке в результате действия клеточных насосов и пассивной проницаемости устанавливается свое определенное различие в концентрациях внутри и снаружи клетки, а также устанавливается свой равновесный мембранный потенциал.

Экспериментально установлено для потока J одного вещества через проницаемую мембрану

$$J = P \Delta C,$$

где P – коэффициент проницаемости мембраны для данного вещества.

В состоянии покоя через мембрану токи не текут, поэтому плотность тока I равна нулю:

$$I = F \sum_i z_i J_i = 0,$$

применяя это условие к мембране, проницаемой для ионов K^+ , Na^+ , Cl^- , получим

$$J_K + J_{Na} - J_{Cl} = 0.$$

После ряда преобразований получаем, что

$$\varphi_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K C_K^H + P_{Na} C_{Na}^H + P_{Cl} C_{Cl}^B}{P_K C_K^B + P_{Na} C_{Na}^B + P_{Cl} C_{Cl}^H}.$$

Разделим каждую из проницаемостей на проницаемость для ионов калия P_K .

$$r = \frac{P_{Na}}{P_K} \text{ и } s = \frac{P_{Cl}}{P_K},$$

тогда

$$\varphi_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^H + r C_{Na}^H + s C_{Cl}^B}{C_K^B + r C_{Na}^B + s C_{Cl}^H}.$$

В состоянии покоя $r=0,04$; $s=0,45$. Подставляя в модель значения концентраций для соответствующих ионов и проницаемость мембраны в состоянии покоя и возбуждения, получим соответствующие значения φ_M .

В опыте для аксона определено, что $\varphi_M = -60$ мВ, что совпадает с величиной трансмембранного потенциала, рассчитанного по формуле Гольдмана.

Для моделирования в таблицу (рис.) дополнительно вводим значения проницаемостей P мембраны для различных ионов. Учитываем при этом, что в состоянии покоя и возбуждения проницаемость мембраны различна.

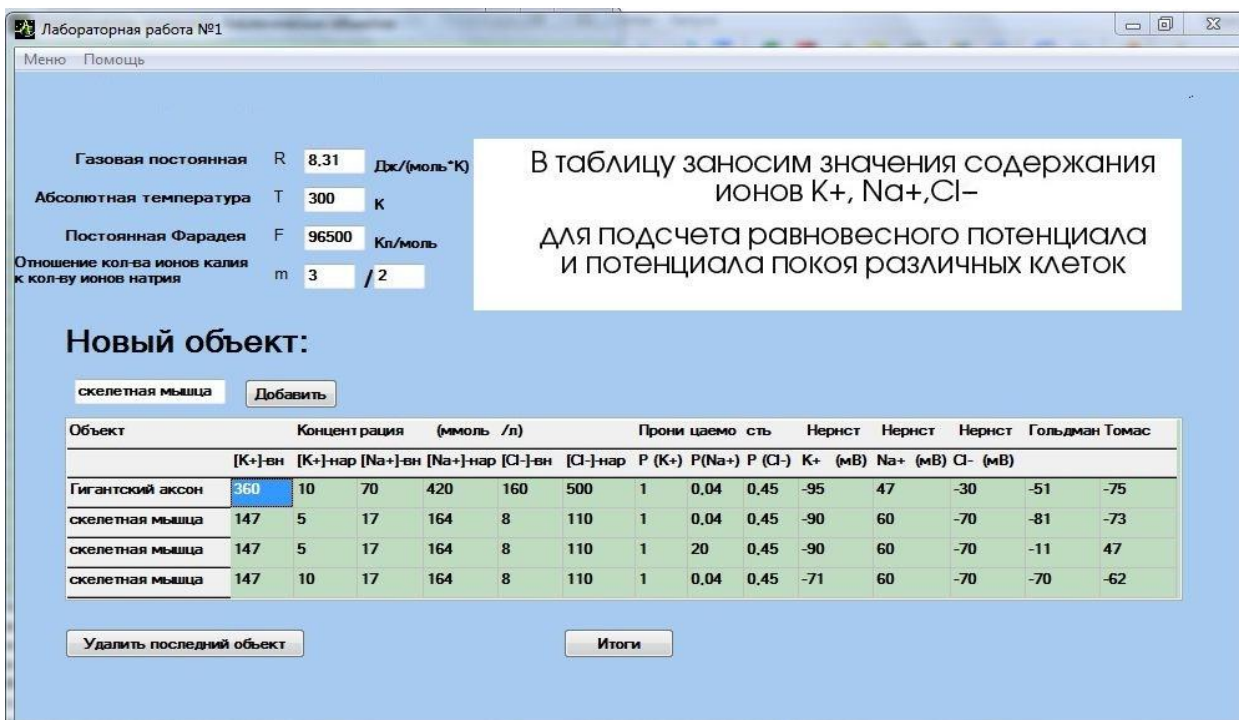


Рис. Диалоговое окно программы «Электrogenез в клетках» [3].

Третья модель учитывает работу $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФазы и описывается уравнением Томаса

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

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

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 Гольдману, и дает совпадение с экспериментальными значениями для мелких клеток.

Нарушение биоэнергетических процессов в клетке и работы $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -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: и P_K , и P_{Na} , и P_{Cl} . Вследствие уменьшения различия проницаемостей абсолютное значение мембранного потенциала $|\varphi_M|$ снижается.

Четвертая модель учитывает последние научные достижения в области изучения генерации мембранного потенциала, т.е. электрические свойства клеток достаточно точно определяются моделью, в которой перенос заряда осуществляется через калиевые, натриевые и кальциевые каналы, а также $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -насосом и $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -обменником. Вклад всех остальных систем транспорта ионов через мембрану незначителен (при нормальных физиологических условиях токи утечки и токи других ионов не существенны или скомпенсированы) [2]. Дифференциальное уравнение для напряжения и законы сохранения для внутриклеточных концентраций ионов записываются следующим образом:

$$\frac{d\varphi}{dt} = -\frac{1}{C} (i_K + i_{Na} + i_{Ca} + i_{NaCa} + i_{NaK});$$

выражения для токов i_K, i_{Na}, i_{Ca} :

$$\begin{aligned} i_K &= -FV_K \frac{d \left[\text{K} \right]_B}{dt} + 2i_{NaK}, \\ i_{Na} &= -FV_K \frac{d \left[\text{Na} \right]_B}{dt} - 3i_{NaK} - 3i_{NaCa}, \\ i_{Ca} &= -2FV_K \frac{d \left[\text{Ca} \right]_B}{dt} + 2i_{NaCa}. \end{aligned}$$

После соответствующих преобразований получим уравнение для мембранного потенциала:

$$\varphi_M = \frac{FV_K}{C} \left\{ \left[\text{K} \right]_B - \left[\text{K} \right]_H + \left[\text{Na} \right]_B - \left[\text{Na} \right]_H + 2 \left[\text{Ca} \right]_B - \left[\text{Ca} \right]_H \right\},$$

где C – емкость клетки, F – постоянная Фарадея, V_K – постоянная величина.

Потенциал равен нулю, если не существует градиента концентраций (градиента заряда) ионов на мембране. Трансмембранное напряжение на мембране клетки вызвано избытком заряда внутри клетки и прямо пропорционально его величине. Данное уравнение справедливо, если внутриклеточная концентрация анионов равна внеклеточной. Так как катионы всегда сбалансированы в растворе анионами, то внутриклеточные/внеклеточные концентрации анионов должны быть близкими внутриклеточным/внеклеточным концентрациям катионов.

Во внеклеточной жидкости электронейтральность сохраняется благодаря балансу между высокой концентрацией ионов натрия и суммой высокой концентрации ионов хлора и небольшого количества непроницающих анионов (бикарбонат, фосфат, сульфат и т.д.). В цитоплазме высокая концентрация ионов калия, невысокая хлора уравновешивают отрицательно заряженные белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и фосфаты.

В ходе выполнения работы студенты отвечают на ряд вопросов, например:

1. Внутри аксона кальмара увеличили концентрацию ионов K^+ ($C_H \text{K}^+$). Как при этом изменится мембранный потенциал? При какой $C_H \text{K}^+$ значение мембранного потенциала станет пороговым?

2. Гигантский аксон кальмара поместили в дистиллированную воду. Что произошло с мембранным потенциалом?

3. Что произойдет с возбудимостью и реверсией знака кардиомиоцита, если изменить градиенты концентраций Na^+ ? K^+ ? изменить работу Na^+ - K^+ -АТФазы?

Моделируя процессы в биологических системах, студенты имеют возможность выявить общую тенденцию процессов моделирования и получить важный вывод: конечный результат не может быть получен любыми путями, необходимо учитывать как биологическую целесообразность вводимых в модель параметров, так и неизученные связи между ними.

Заключение. Используя компьютерное моделирование как метод системного анализа, студенты-биологи формируют системное мышление, приобретают навыки исследовательской работы и знакомятся с современными методами исследования.

При рассмотрении данных моделей появляется возможность изучить историческое решение данного вопроса, ограничения каждой модели, уровень влияния градиентов, концентраций,

проницаемостей, транспортных структур на формирование мембранного потенциала. Однако математические модели не могут претендовать на уникальность — это лишь один из способов описания действительности, которым пользуется эмпирическое научное исследование. Модель лишь подобна, но не идентична реальной системе. Такова общая проблема познания: известное всегда меньше неизвестного, любая информация — лишь часть истины. Компьютерная модель «Электрогенез в клетках» может дополняться или меняться по мере накопления новых научных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биофизика: учебник / под ред. Ю.А. Владимирова. — М.: Медицина, 1983. — 283 с.
2. Черенкевич, С.Н. Транспорт веществ через биологические мембраны: учеб. пособие для студентов биол., физ., хим. фак. БГУ / С.Н. Черенкевич, А.И. Хмельницкий. — Минск: БГУ, 2007. — 144 с.
3. Шилина, М.В. Лабораторный практикум «Биофизика» / М.В. Шилина // «ВГУ им. П.М. Машерова» [Электронный ресурс]. — Витебск, 2010.

Поступила в редакцию 21.03.2011. Принята в печать 29.04.2011
Адрес для корреспонденции: e-mail: shi07@mail.ru — Шилина М.В.