

Введение в молекулярную и клеточную нейробиологию

Краткий курс

Проф. Эдуард Коркотян

Пермский государственный университет, Россия

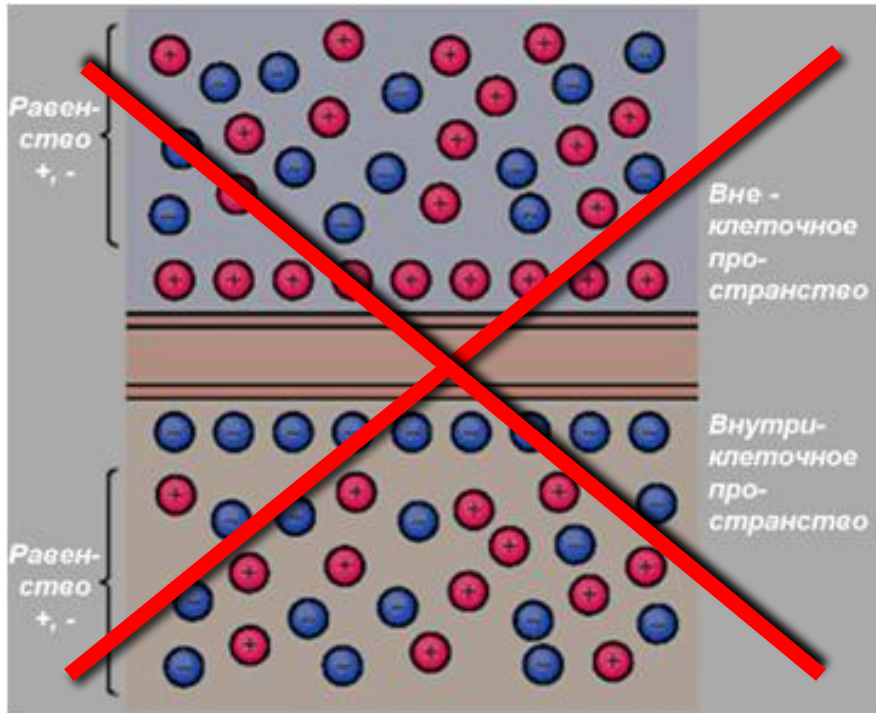
Институт им. Вейцмана, Реховот, Израиль

Лекция 6 Потенциал нейрона

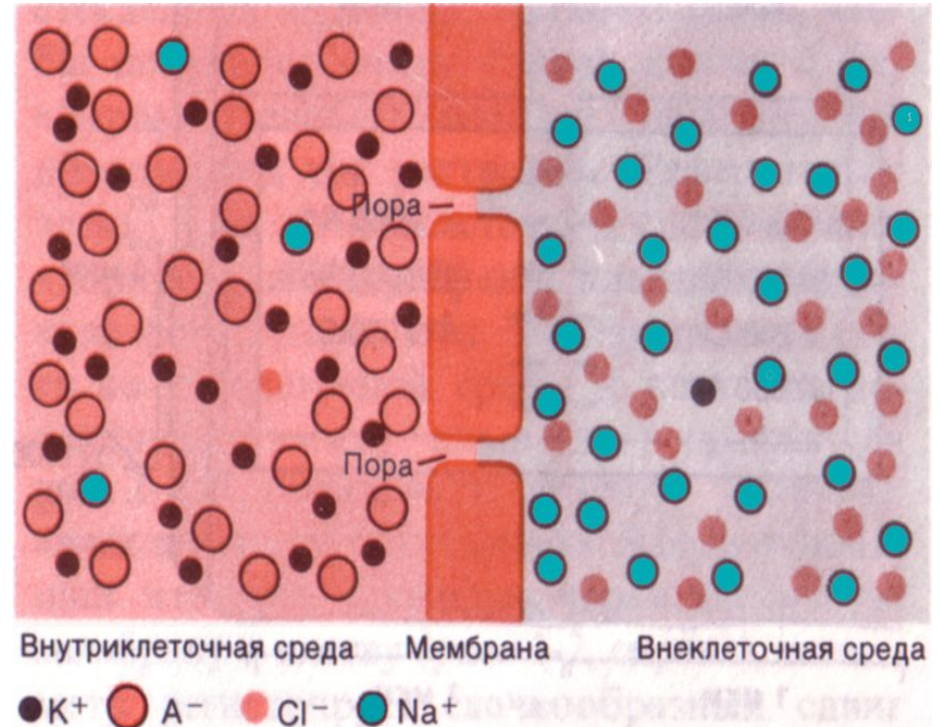


1

В чем причина возникновения потенциала покоя?



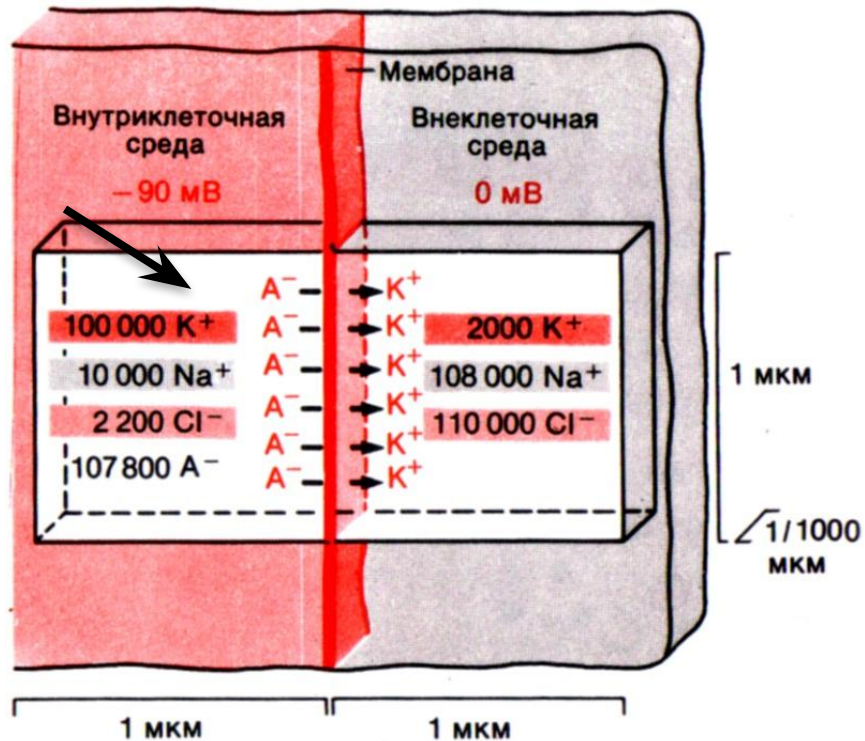
Мембранный потенциал возникает из-за разделения положительных и отрицательных зарядов поперек клеточной мембраны.



Внутри- и внеклеточное распределение ионов. Диаметры кружков пропорциональны диаметрам гидратированных ионов. Ширина пор в мембране такова, что через них могут проходить только ионы K⁺.

2 Распределение ионов по обе стороны мембраны

$$C = \frac{q}{V}$$



Какую связь с емкостью вы видите?

	Внутриклеточная	Внеклеточная	
Na ⁺	12	Na ⁺	145
K ⁺	155	K ⁺	4
Cl ⁻	4	Cl ⁻	120
HCO ₃ ⁻	8	HCO ₃ ⁻	27
A ⁻	155	Другие анионы	7
М. потенциал -90 мВ		Другие катионы	5

Внутри- и внеклеточная концентрация ионов для мышечной клетки теплокровного животного, ммоль/л

+ 167; - 167

+154; - 154

Заряд на маленьком участке мембраны площадью 1 мкм х 0.001 мкм, где размещаются 6 ионов K⁺ и 6 анионов (A⁻), сопоставлен с числом ионов в объемах 1х1х0.001 мкм по обе стороны мембраны. Стрелками показана диффузия K⁺ из клетки через мембрану, чья емкость принята равной 1 мкФ/см².

Вопрос: почему внутри больше ионов калия, чем снаружи?

Объясняется ли потенциал в -90 мВ распределением ионов калия?

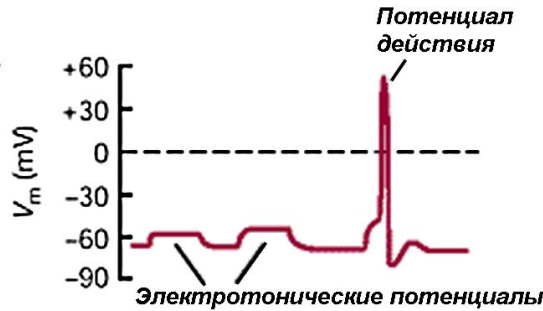
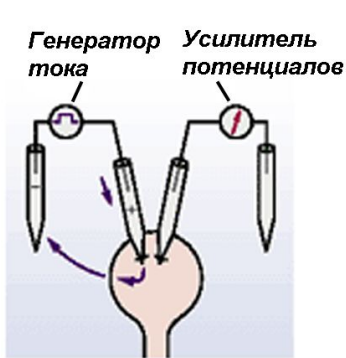
Где тут причина и где следствие, ведь калий – катион и не может обеспечить отрицательность сам по себе....

3

Как зарегистрировать потенциал покоя?



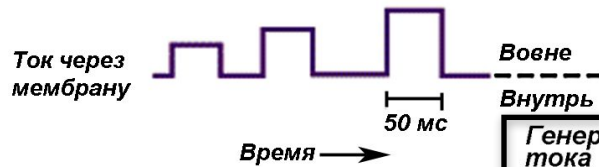
Потенциал покоя и потенциал действия



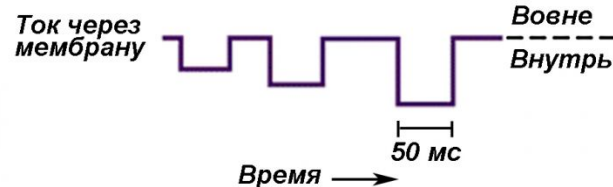
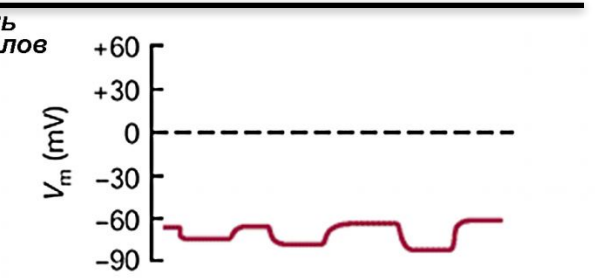
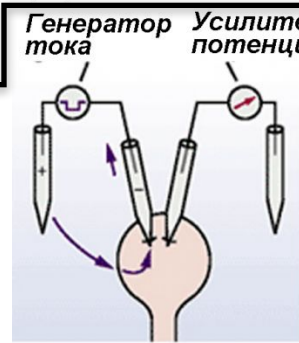
Деполяризация



Что это за ток?



Гиперполяризация



Что это за ток?

Формула Нернста



Почему для двухзарядного иона нужно в два раза меньше E?

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}, \quad \text{Nernst Equation}$$

где R газовая постоянная, T температура (в Кельвинах), z валентность или число зарядов иона, F постоянная Фарадея, а $[X]_o$ и $[X]_i$ – внешняя и внутренняя концентрации ионов. (Точнее, химическая активность ионов предпочтительнее концентрации при расчетах)

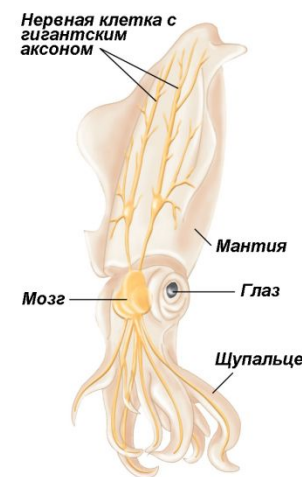
Поскольку RT/F равен 25 mV при 25°C (комнатная температура), а константа для перехода от обычных логарифмов к десятичным сост. 2.3, уравнение Нернста может быть записано как:

$$E_x = \frac{58 \text{ mV}}{z} \log \frac{[X]_o}{[X]_i} \quad \text{Для } K^+ z = +1. \text{ Взяв его внутреннюю и внешнюю концентрации в аксоне кальмара, получим:}$$

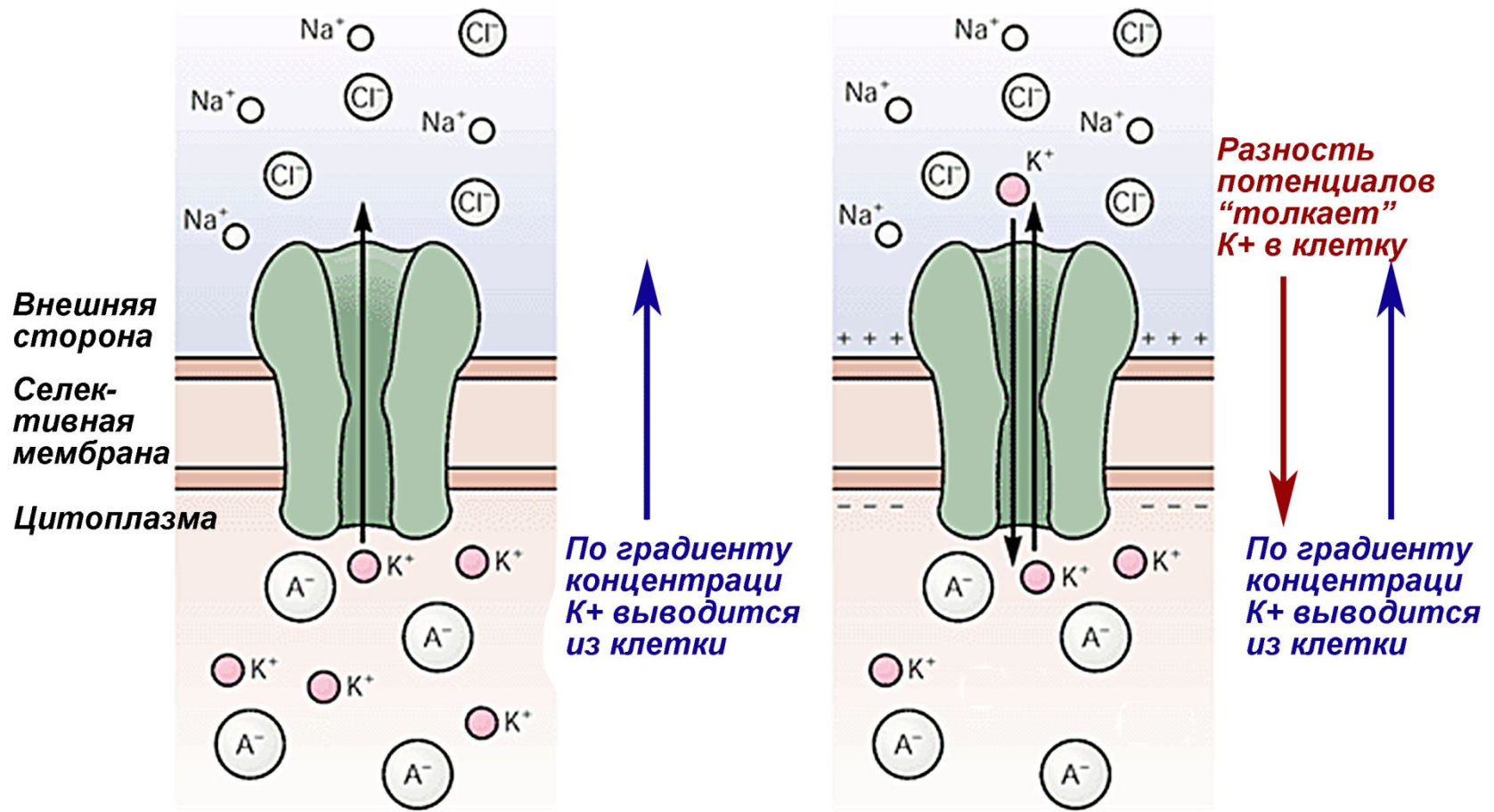
$$E_K = \frac{58 \text{ mV}}{1} \log \frac{[20]}{[400]} = -75 \text{ mV.}$$

Распределение основных ионов по сторонам покоящейся мембраны гигантского аксона кальмара

Вид иона	Концентрация в цитоплазме	Концентрация в межклеточной среде	Равновесный потенциал (эквilibриум)
K^+	400	20	-75
Na^+	50	440	+55
Cl^-	52	560	-60
A^-	385	-	-



Движение K^+ сквозь мембрану зависит как от градиента концентрации (слева) так и от разности электрических потенциалов (справа)



Почему натриевые каналы не мешают потенциалу покоя?

Движение иона=(эл. движ. силы+хем. движ. силы) x мембранное проведение

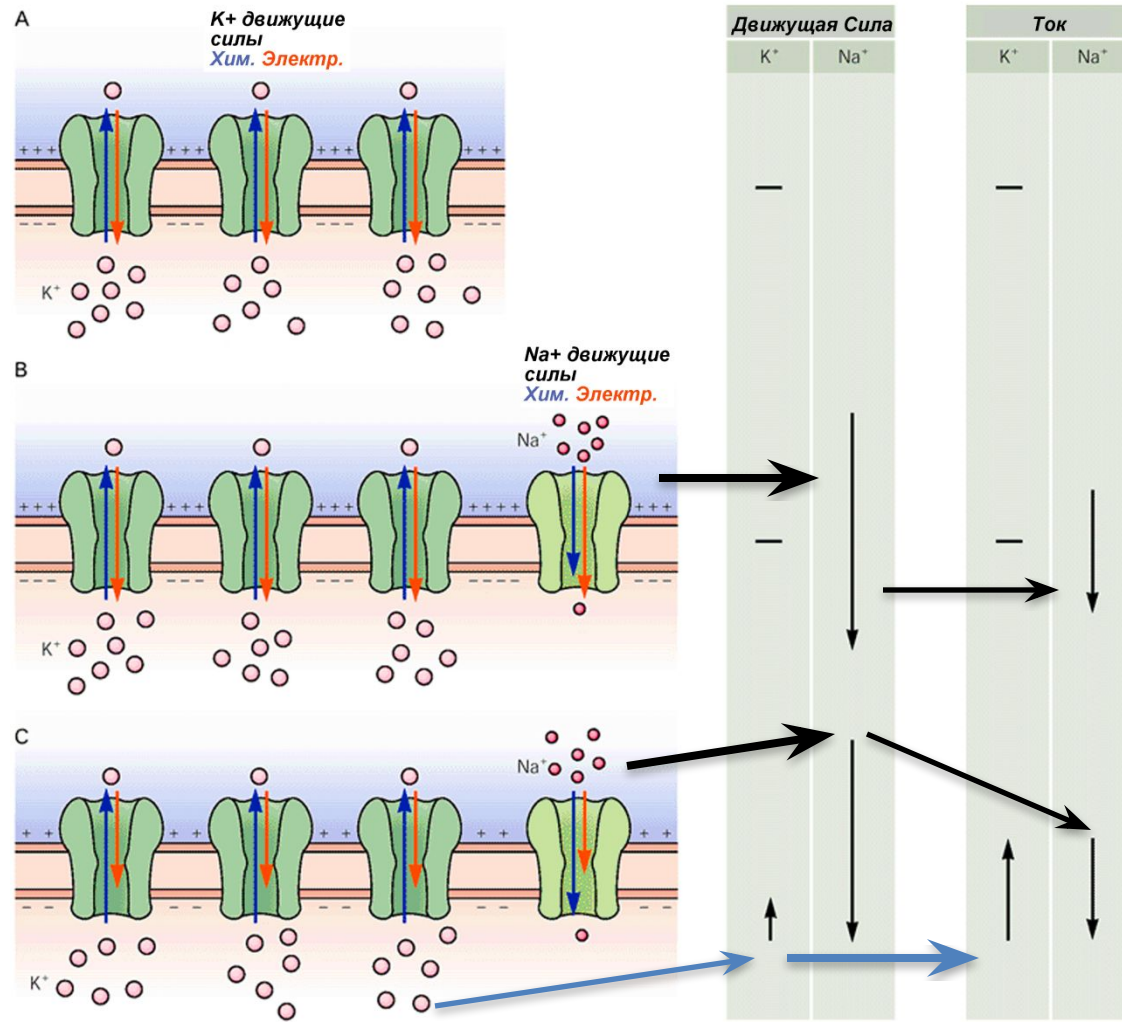
Потенциал покоя клетки определяется сравнительной пропорцией различных типов открытых ионных каналов и величинами их равновесных (нернстовых) потенциалов

А - покаяющаяся клетка, на мембране которой имеются только K^+ каналы, а сами ионы K^+ находятся в равновесии т.е.
 $V_m = E_{K^+}$

В - добавление малого числа Na^+ каналов позволяет Na^+ диффундировать в клетку, что сдвигает ее потенциал вверх (деполярирует).

С - потенциал покоя устанавливается на новом уровне, про котором вход Na компенсируется выходом K . Проводимость K^+ значительно выше чем Na^+ в силу многочисленности каналов. Поэтому слабые движущие силы для ионов K^+ создают ток, равный (но направленный в другую сторону) по сравнению с гораздо большей движущей силой малочисленных ионов Na^+ .

Таким образом создается устойчивое состояние, при котором ни один из ионов Na^+ или K^+ не находится в равновесии, но суммарный итоговый сдвиг заряда равен нулю.



Уравнение Гольдмана

Почему проницаемость для Na
меняется?

Для теплокровных – 0.07

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

где проницаемость (P) мембраны для данного иона, выраженная в единицах скорости (см/сек). Этот показатель сходен с постоянной диффузии, которая описывает скорость перемещения вещества в растворе. Зависимость мембранного потенциала от проницаемости мембраны для данных ионов и от их концентраций отражена в уравнении Гольдмана. В случае, когда проницаемостью мембраны для дополнительных ионов можно пренебречь, уравнение Гольдмана принимает вид уравнения Нернста.

Ходжкин и Кац, применили на практике уравнение Гольдмана для изучения мембранного потенциала гигантского аксона кальмара. Быстро изменяя внеклеточные концентрации ионов, прежде чем эти изменения коснутся аксоплазмы и так же быстро проводя измерения, они установили, что K^+ имеет наибольший эффект, Cl^- умеренный, а Na^+ лишь незначительный эффект на мембранный потенциал.

Таким образом, были установлены следующие соотношения проницаемости на основе данного уравнения:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1.0 : 0.04 : 0.45$$

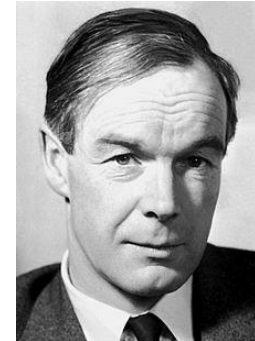
Однако на пике развития потенциала действия, когда большинство каналов, пропускающих Na^+ открыты, соотношение становится иным:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1.0 : 20 : 0.45$$

уравнение Гольдмана принимает значение, близкое к значению уравнения Нернста для Na^+ .



David E. Goldman
(1910 - 1998)

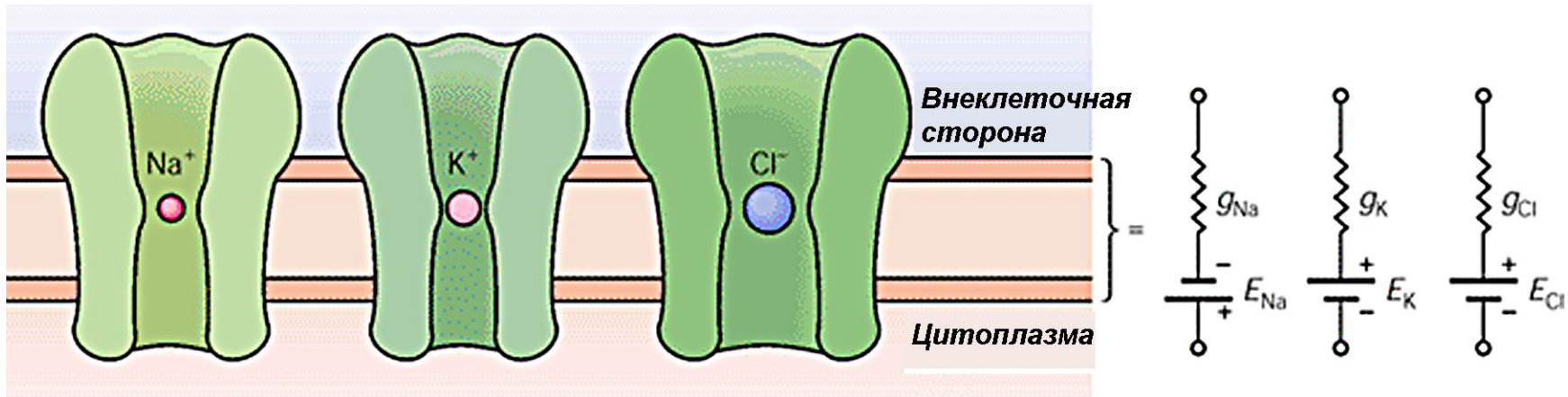


Sir Alan Hodgkin
(1914 - 1998)

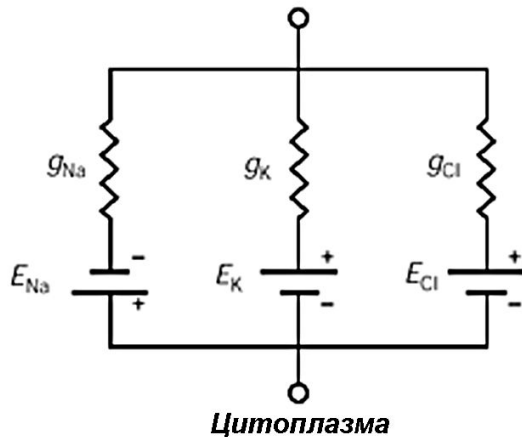


Sir Bernard Katz
(1911 - 2003)

Суммарная проводимость мембраны



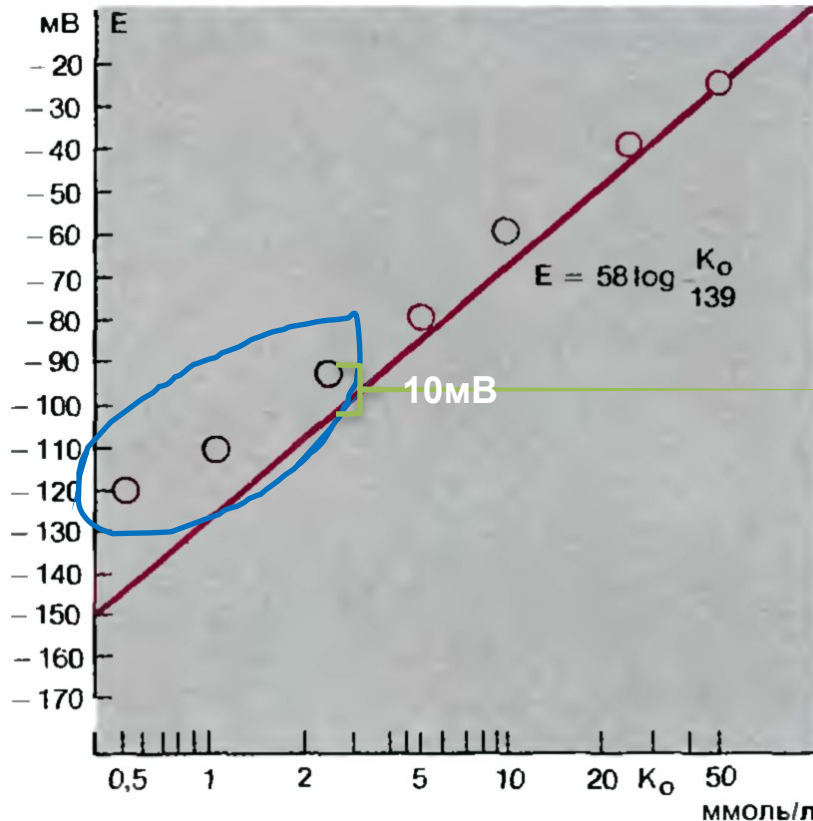
Внеклеточная сторона



Каждая группа ионных каналов, селективных для Na^+ , K^+ или Cl^- может быть представлена батареей, последовательно с проводником (резистором). Отметим направление полюсов батарей (отрицательное для K^+ и Cl^- положительное для Na^+).

Пассивный ток в нейроне может быть смоделирован посредством соответствующей электрической цепи. Цепь содержит элементы, представляющие ион-селективные мембранные каналы и замкнутые накоротко пути, имитирующие цитоплазму и внеклеточную среду.

Эксперимент: как внеклеточная концентрация K^+ влияет на внутриклеточный потенциал?



После сдвига внеклеточной концентрации K^+ , потенциал должен в соответствии с уравнением Нернста изменяться пропорционально логарифму $[K^+]_o$ (см красную линию на рисунке).

Это касается верхней части графика. Но по мере снижения $[K^+]_o$ показания становятся все менее отрицательными по сравнению с расчетными. Это расхождение связано с большей натриевой проницаемостью P_{Na} при низком значении $[K^+]_o$.

Однако, если прекратить поступление Na^+ , например путем замещения внеклеточного натрия (например слишком крупным катионом холином) отклонение исчезает. Следовательно нормальный потенциал покоя примерно на **10 мВ более положителен, чем E_K** .

Пассивный вход Na⁺

Попытаемся понять, почему потенциал покоя клетки не 75 мВ, а около 65 мВ.

- Потенциал покоя менее отрицателен, чем E_K так как мембрана не обладает полной непроницаемостью для Na^+ .
- Существует высокий градиент его концентрации (1:10) и кроме того его вход дополнительно усиливается отрицательным зарядом клетки, притягивающим катионы.
- Для определения проницаемости мембраны Na^+ введено понятие **проводимости мембраны (g)**. Эта величина **обратно сопротивлению**, измеряется в **Сименсах** и равна отношению общего трансмембранного тока данного вида ионов к **электродвижущей силе**. Последняя равна 0, когда мембранный потенциал E соответствует равновесному потенциалу данного иона.

- **В общем виде:**
$$g_{(ion)} = \frac{I(ion)}{E - E(ion)}$$
- Суммарный ток I_K и I_{Na} можно измерить в эксперименте.

- Рассчитаем отклонение потенциала клетки от E_K : $E - E_K$. По уравнению Нернста:

$$E_{Na} = 61 \times \lg(440/50) = 61 \times 1.1 = 55 \text{ мВ.}$$

$$\text{Следовательно: } E - E_{Na} = -75 \text{ мВ} - 55 \text{ мВ} = -130 \text{ мВ}$$


$$I_{Na} = g_{Na} * E - E_{Na} = g_{Na} * (-130).$$

$$\text{Поскольку } g_K / g_{Na} = 15 \text{ (известно из опыта),}$$

а выходящий I_K должен компенсировать пассивный входящий I_{Na} , то есть $I_{Na} = -I_K$,

$$E - E_K = \frac{I_K}{g_K} = \frac{-g_{Na} * (-130)}{g_K} = -g_{Na} * (-130) / 15 = 9 \text{ мВ.}$$

- Таким образом, итоговый потенциал покоя клетки будет равен: $-75 \text{ мВ} + 9 \text{ мВ} = 66 \text{ мВ}$



Вопрос: в чем причина
неустойчивости нового потенциала?

Потому, что новый $E_{\text{клетки}}$ не
соответствует ни E_K , ни E_{Na} , в то
время как динамика g_K гораздо
выше, чем g_{Na}

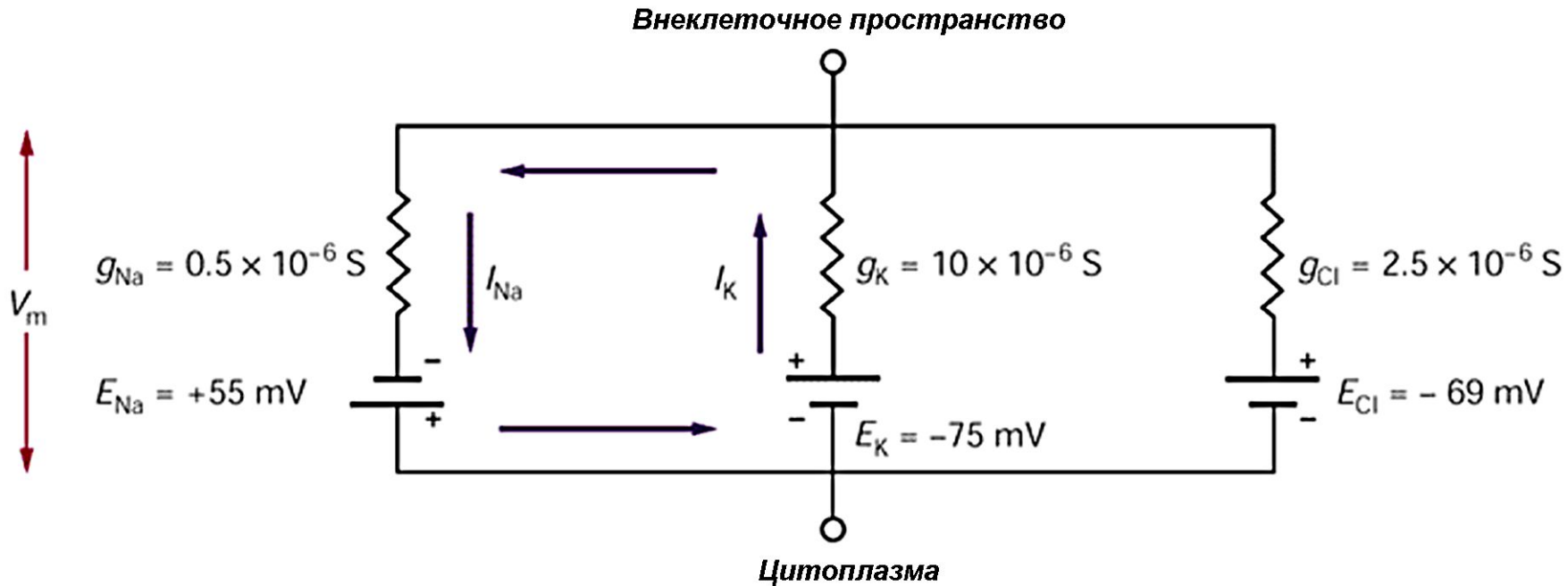
Каким будет потенциал покоя клетки, пропускающей любые ионы?

Примерный ионный состав клетки, пропускающей любые ионы:

Ионы	Внеклеточная	Внутриклеточная	Внутри-Виртуальная
Na ⁺	145	12	225
K ⁺	4	155	6
др. ⁺	5	-	8
Cl ⁻	120	4	67
HCO ₃ ⁻	27	8	17
A ⁻ (др.-)	7	155	155
Потенциал покоя клетки		-90мВ	-11мВ

$g = I / V$ $V = I / g$ $I = g * E(\text{ion})$ И так: $V_m = g * E(\text{ion}) / g(\text{ion})$

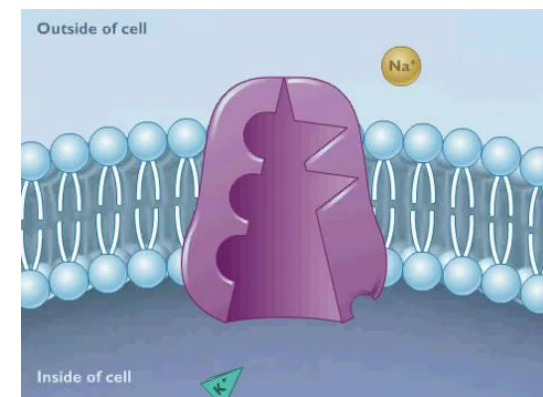
Электродэквивалентная цепь, включая проводящие пути для Na^+ , K^+ и Cl^-



- Потенциал покоя менее отрицателен, чем E_{Cl} , так как мембрана не обладает полной непроницаемостью для Na^+ .
- Суммарный ток равен нулю (так как концентрация Cl^- в ядре того же вода дополнительно усиливается отрицательным зарядом клетки; притягиваются катоды).
- Для определения проницаемости мембраны P_{Cl} в данном случае проводимости мембраны (g). Это величина обратная сопротивлению, которое создается ионными каналами общего электрического потенциала E соответствующего разности потенциалов данного иона E_{ion} , когда мембранный потенциал E соответствует разности потенциалов.
- В общем виде: $E(\text{ion}) = \frac{I(\text{ion})}{g(\text{ion})}$
- Суммарный ток I_{Cl} и I_{Na} можно измерить в эксперименте.
- Рассчитаем отклонение потенциала клетки от E_{Cl} : $E = E_{Cl}$. По уравнению Нернста: $E_{Na} = 61 \text{ мВ} \cdot \lg \left(\frac{140}{5} \right) = 61 \cdot 1,3 = 79 \text{ мВ}$. Следовательно: $E = E_{Na} = 79 \text{ мВ} = 79 \text{ мВ} - 69 \text{ мВ} = 10 \text{ мВ}$.
- $I_{Na} = g_{Na} \cdot (E - E_{Na}) = 0,5 \cdot (-10) = -5 \text{ нА}$. Поскольку $g_{Cl} / g_{Na} = 5$ (известно из опыта), а выходящий ток должен компенсировать пассивный входящий ток, то есть: $I_{Cl} = 5 \cdot I_{Na}$.
- $E - E_{Cl} = \frac{I_{Na}}{g_{Cl}} = \frac{-5 \text{ нА}}{2,5 \cdot 10^{-6} \text{ С}} = -2 \text{ мВ}$.
- Таким образом, итоговый потенциал покоя клетки будет равен: $-75 \text{ мВ} + 2 \text{ мВ} = -73 \text{ мВ}$.

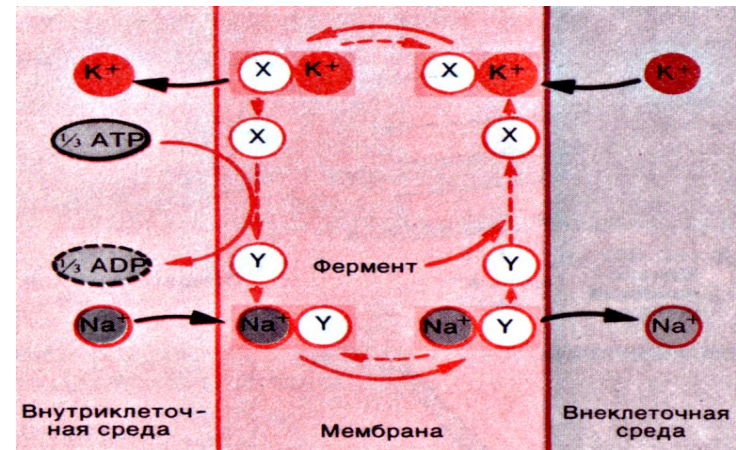
В данном случае, отсутствует ток через хлорные каналы так как V_m находится в области равновесного потенциала Нернста для Cl^-

Неустойчивость потенциала покоя и натриевый насос

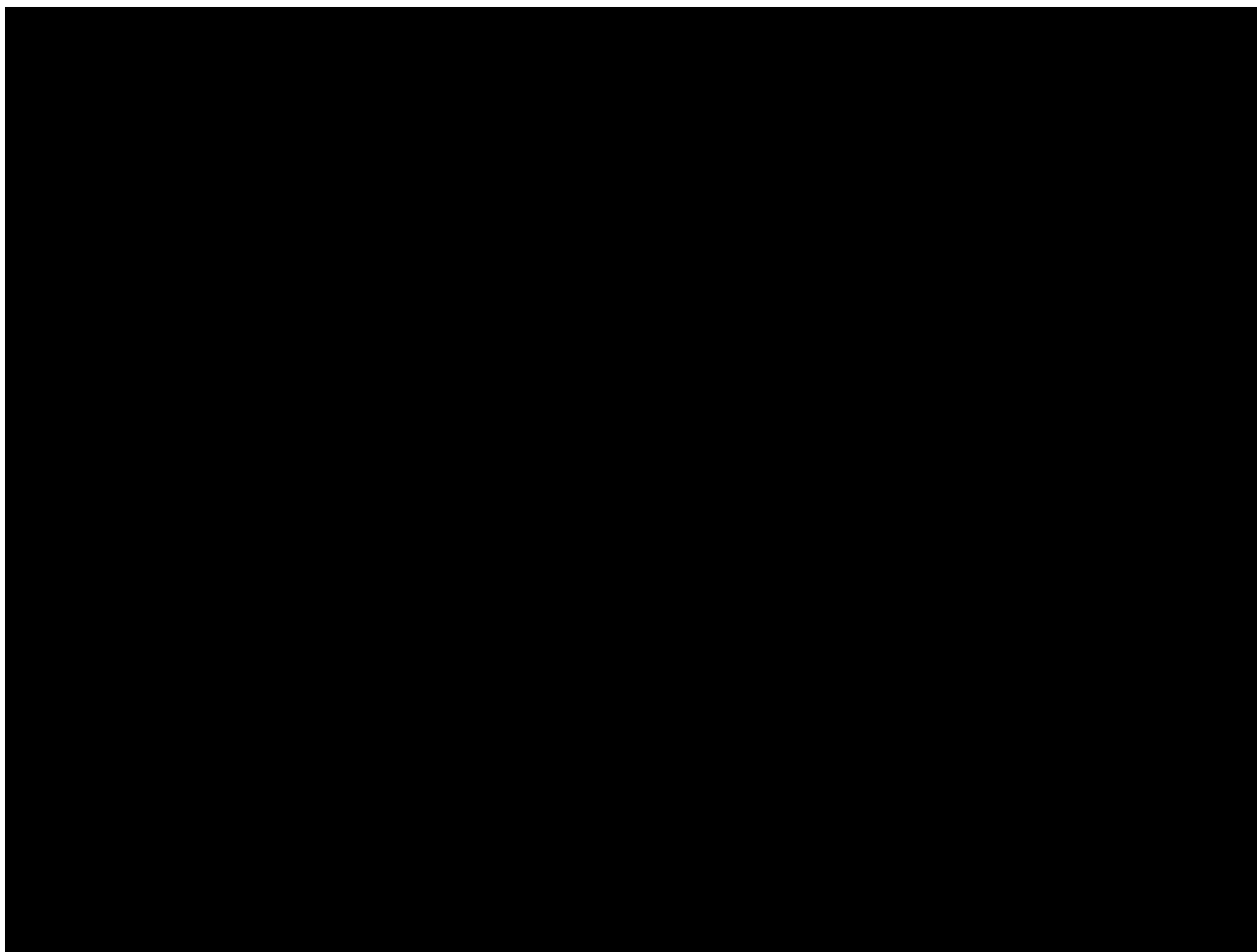


- Причина неустойчивости потенциала покоя в постоянном входе Na^+ и выходе K^+ .
- Набор первого и потеря второго приведут к выравниванию их концентраций
- По мере замены K^+ на Na^+ , потенциал покоя клетки по уравнению Нернста будет уменьшаться (становиться менее отрицательным).
- По мере накопления в клетке катионов, повышается осмотическое давление в клетке, что приводит к поступлению в нее воды, т.е. к дальнейшей потере K^+ .
- Набухание клетки и снижение потенциала – итог пассивного трансмембранного тока ионов.
- Натриевый насос и сопряженный $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ обменник компенсируют пассивные ионные токи.

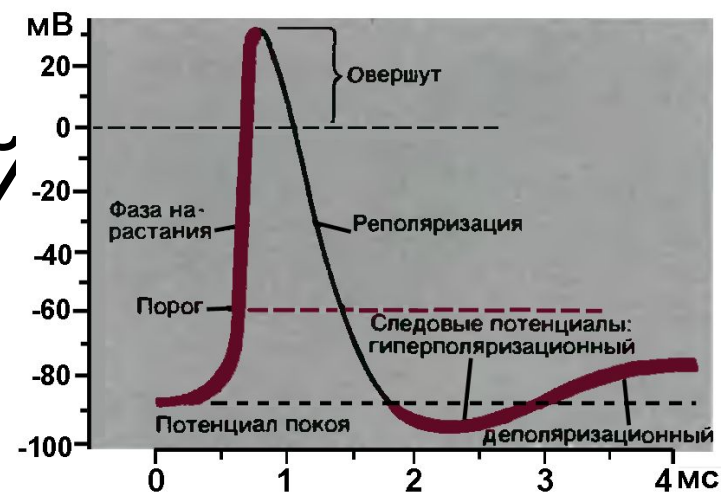
Активный транспорт ионов происходит с затратой энергии



Потенциал действия



Потенциал дей



Быстрый сдвиг мембранного потенциала нервных или мышечных клеток в положительном направлении называют потенциалом действия (ПД).

Его регистрируют с помощью внутриклеточных электродов. Потенциал покоя (ПП) возрастает при этом до +30мВ и затем возвращается к исходному уровню. Длительность ПД составляет 1-10 мс.

В развитии ПД выделяют несколько фаз:

1. Быстрая **фаза нарастания** длительностью в 0.2-0.5 мс. Также называют депполяризацией.
2. Переход за нулевую линию, когда потенциал становится положительным – **овершут**.
3. Фаза вслед за пиком, в которой восстанавливается потенциал мембраны – **реполяризация**.
4. Часто кривая пересекает уровень ПП, обр. **гиперполяризационный следовой потенциал**.
5. Последний медленный участок называется **деполяризационным следовым потенциалом**.

ПД всегда возникают при **деполяризации** мембраны до -50мВ. Этот уровень потенциала называется **порогом**. В таком состоянии потенциал мембраны становится нестабильным.

Он быстро переходит к реверсии поляризации – быстрому нарастанию ПД до пика. Это **автоматически** прогрессирующее нарушение ПП называется **возбуждением** и длится 1 мс.

Ионные токи потенциала действия Принцип «все или ничего»

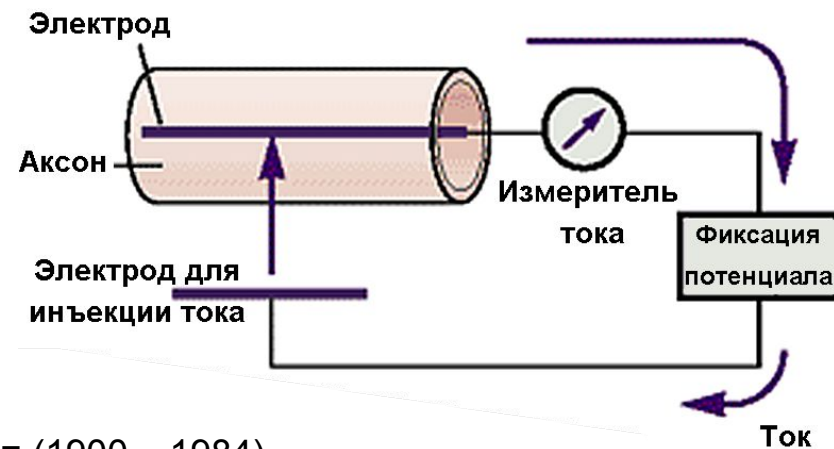
- Поскольку потенциал покоя весьма близок к равновесному потенциалу (РП) для K^+ , следовательно потенциал действия не может определяться этим видом ионов.
 - Сдвиг потенциала к положительным значениям может произойти только за счет Na^+ (с его РП +55).
 - Чтобы Na^+ входил в клетку проводимость ее мембраны (g_{Na}) должна возрасти как следствие деполяризации до порогового уровня.
 - Роль K^+ заключается в реполяризации клетки (в случае блокады калиевого тока тетраэтиламмонием реполяризация наступает гораздо медленнее. Таким образом ПД – это вход Na^+ в клетку с выходом K^+).
- **Вопрос: меняется ли существенно ионный состав клетки при ПД?**

Ответ: нет. Подобно тому, как участок мембраны $1\text{мкм} \times 0.001\text{мкм}$ поляризуется до -90мВ всего 6 ионами K^+ , для деполяризации ее до уровня $+30\text{мВ}$ потребуются 9 ионов Na^+ . Для существенного сдвига в соотношении внутриклеточных концентраций ионов потребовалось бы множество ПД и прекращение работы Na^+ насосов.

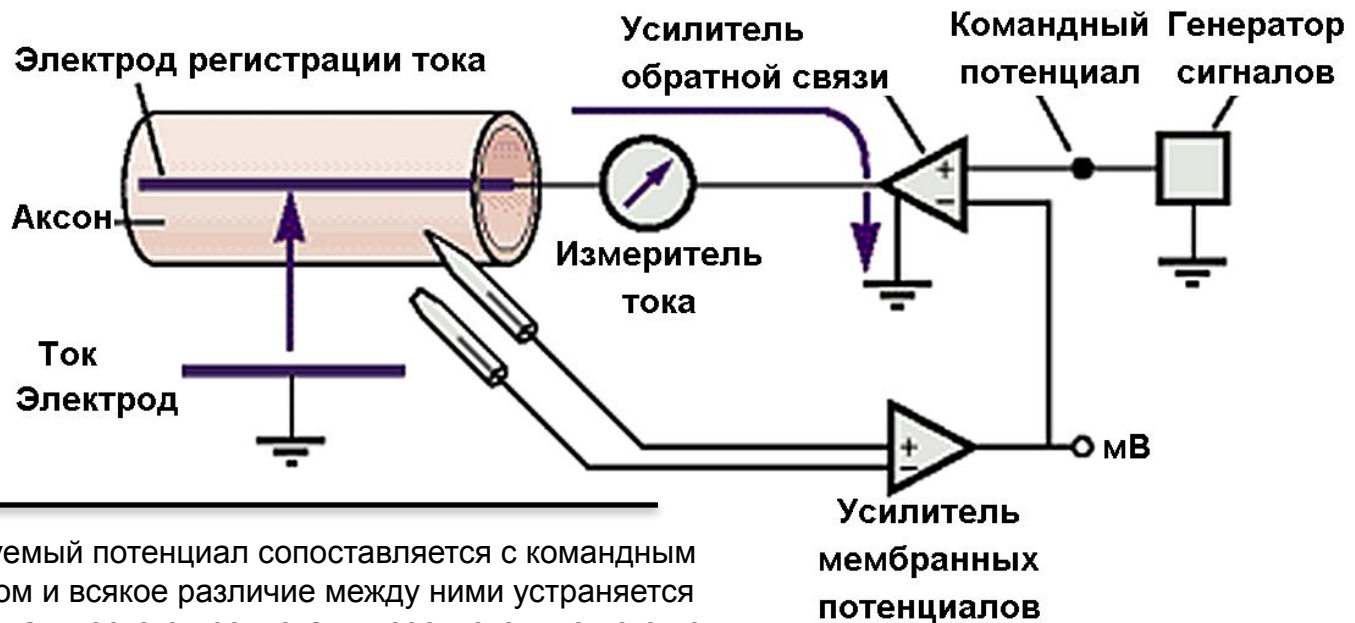
Метод фиксации потенциала



Кеннет Стюарт Коул (1900 – 1984)



Метод фиксации потенциалов применяют для измерения токов, возникающих во время развития потенциала действия. Прямое измерение этих токов невозможно, так как вольтаж-зависимые токи изменяются по мере сдвига мембранного потенциала и, вместе с тем, сами изменяют его.



Регистрируемый потенциал сопоставляется с командным потенциалом и всякое различие между ними устраняется путем автоматического пропускания соответствующего по величине компенсаторного тока

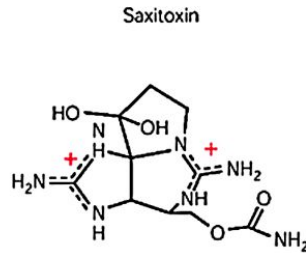
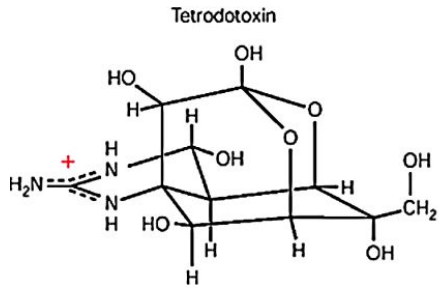
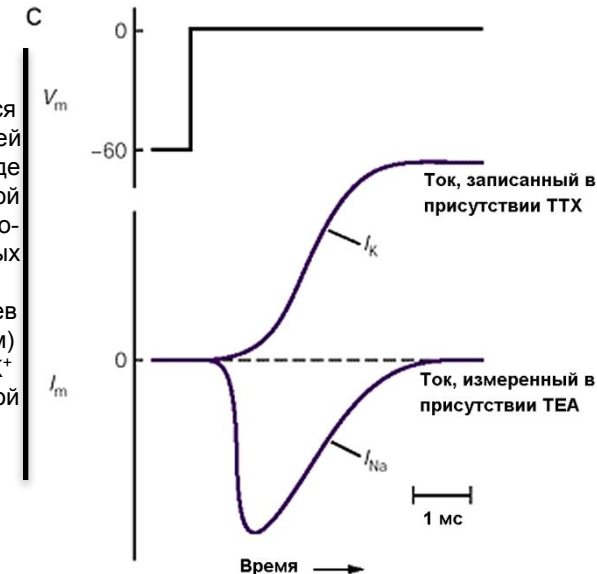
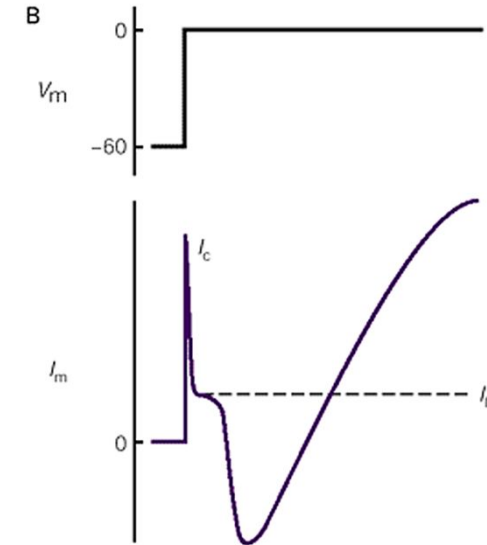
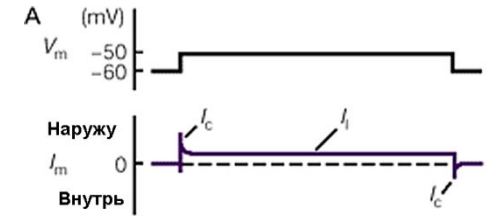
19 Ионные токи при ПД

Эксперимент с применением метода фиксации потенциала демонстрирует последовательную активацию 2х типов вольтаж-зависимых ионных каналов.

A. Слабая деполяризация сопровождается емкостными токами и токами утечки (I_c , I_l)

B. Сильная деполяризация возбуждает сильные емкостные и протечные токи, а также входящие токи (токи внутрь), сменяемые затем выходящими (токами наружу).

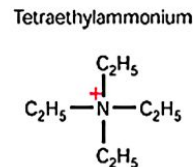
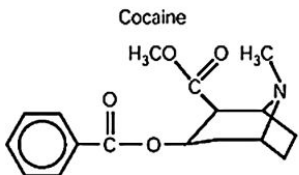
C. Деполяризация клетки в присутствии тетродотоксина (ТТХ), который блокирует Na^+ токи, а затем в присутствии тетраэтиламмония (ТЕА), блокирующего K^+ токи, демонстрирует в чистом виде K^+ либо Na^+ токи (I_K и I_{Na} , соответственно), после вычитания из них I_c и I_l .



Реагенты, блокирующие вольтаж-зависимые Na^+ и K^+ каналы.

Тетродотоксин и **сакситоксин** соединяются с натриевым каналом с высочайшей афинностью. Первый содержится в ряде видов рыб, тритонов и лягушек. Второй синтезируется жгутиконосцами и цианобактериями, создающими эффект «красных приливов».

Кокаин – активная субстанция из листьев коки (являлся первым местным анестетиком) **Тетраэтиламмоний** – катионблокирует K^+ вольтаж-зависимые каналы при невысокой афинности. Заряд реагента показан как $+$

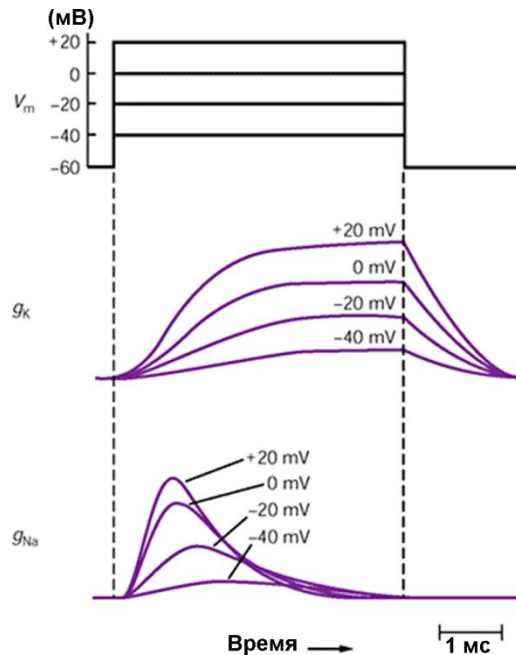


Расчет Na⁺ и K⁺ проводимости

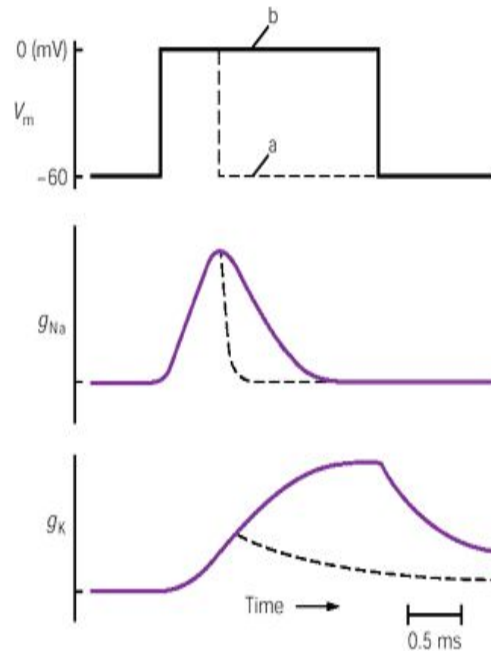
Свойства натриевых и калиевых каналов

$$g_K = \frac{I_K}{(V_m - E_K)}$$

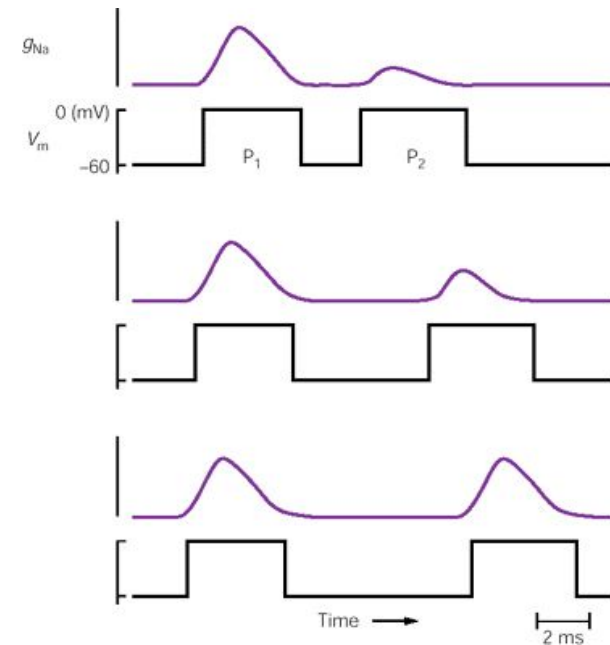
$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{(V_m - E_{Na})}$$



Свойство 1: натриевый канал включается и выключается гораздо быстрее, чем калиевый при разных потенциалах.

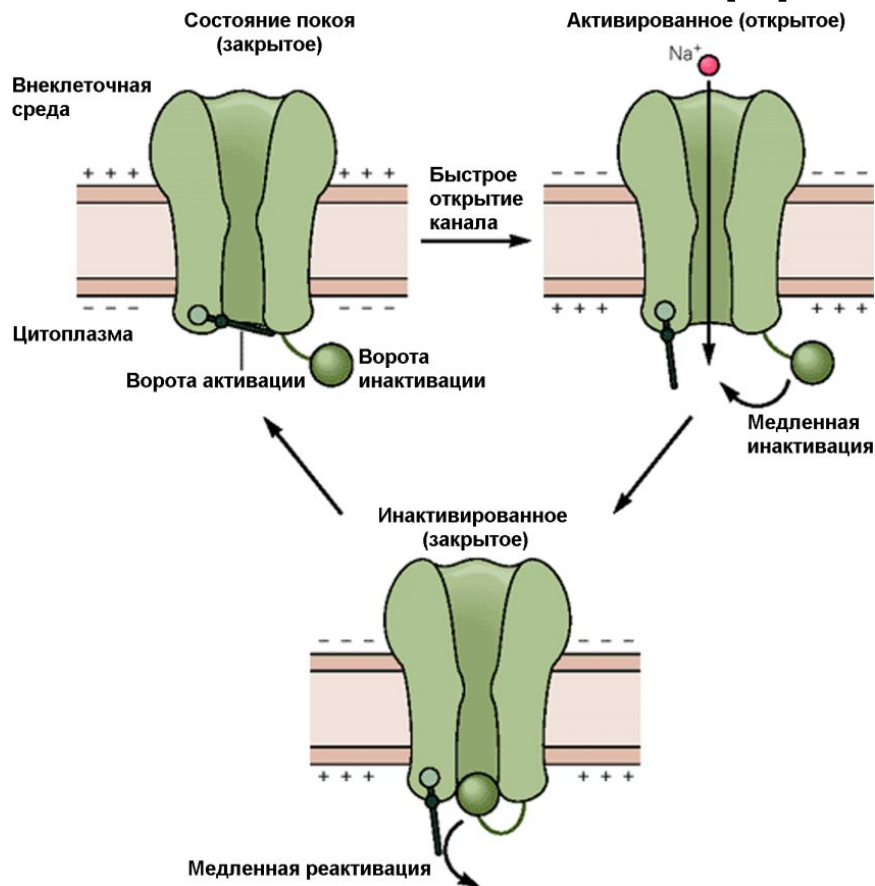


Свойство 2: натриевые и калиевые каналы отвечают по-разному на длительную деполяризацию

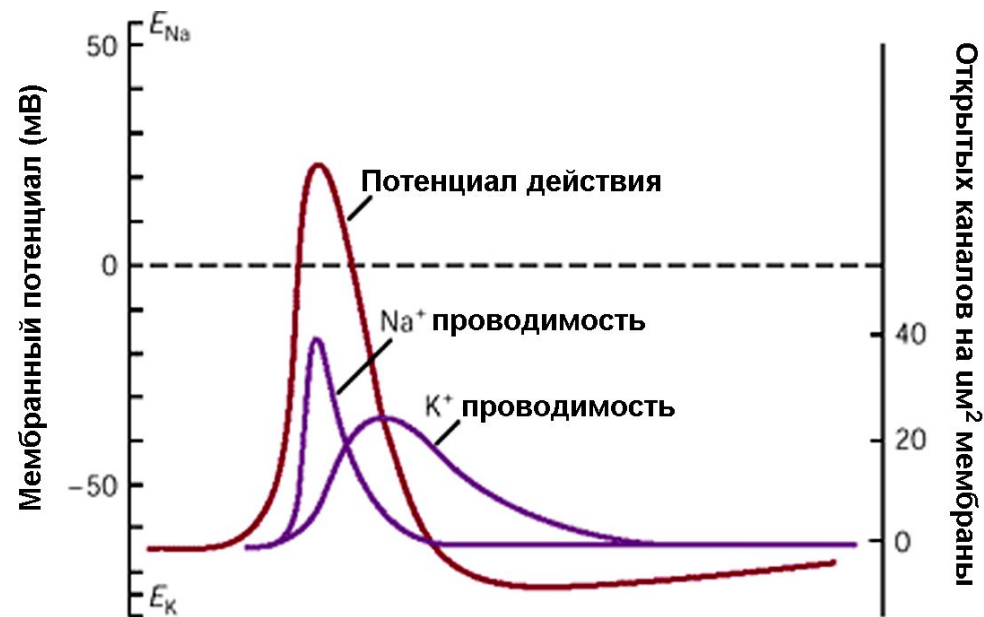


Свойство 3: натриевые каналы остаются инактивированными еще в течение нескольких миллисекунд после окончания деполяризации.

Реконструкция потенциала действия



Вольтаж-зависимый натриевый канал обладает двумя типами ворот, которые противоположным образом реагируют на деполяризацию

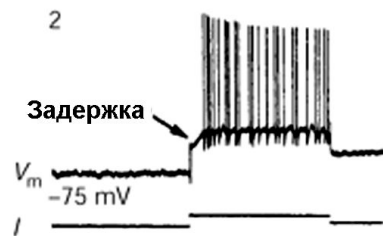
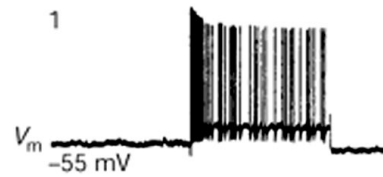


Последовательное открытие вольтаж-зависимых натриевых и калиевых каналов генерирует потенциал действия. Форма потенциала действия определяется комплексом их свойств.

Чсть этого открытие принадлежит английским ученым Ходжкину и Хаксли.

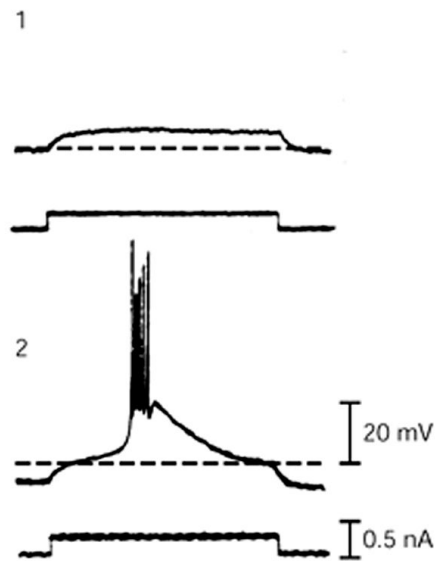
Ионные каналы по-разному экспрессируются в различных типах нейронов, что определяет характер их активности

A Отсроченные разряды



50 mV
5 nA
1 s

B Потенциал-зависимая возбудимость



C Пачечная активность



D Аккомодация

