

Раздел «Потенциал действия»

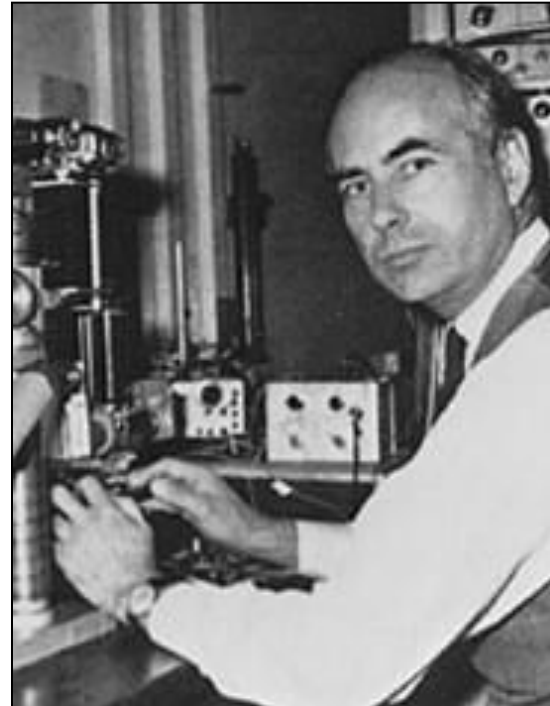
В 1939 г. **А. Ходжкин** и **А. Хаксли** зарегистрировали потенциал действия (ПД) от гигантского аксона кальмара. Оказалось, что потенциал мембраны аксона при возбуждении меняет знак (становится **положительным**), так же как и в экспериментах **Ю. Бернштейна**, выполненных на мышце.

HODGKIN, A. L. AND A. F. HUXLEY Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* 1939, 144: 710–711

А. Ходжкин (A. Hodgkin, 1949 г.)



А. Хаксли (A. Huxley, 1974 г.)

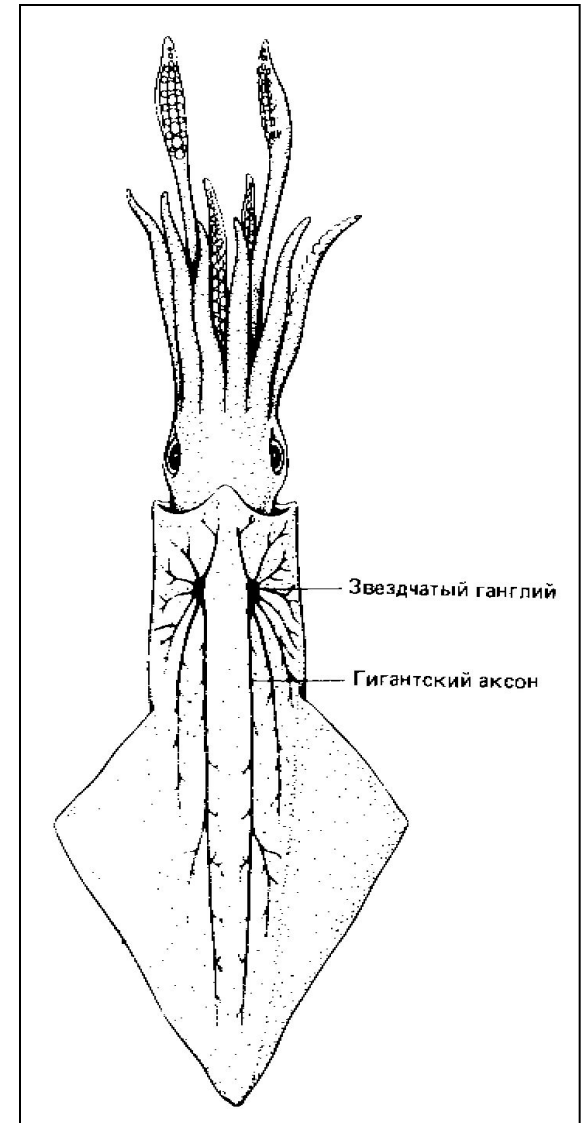


Нобелевскую премию кальмару за его гигантский аксон !!!

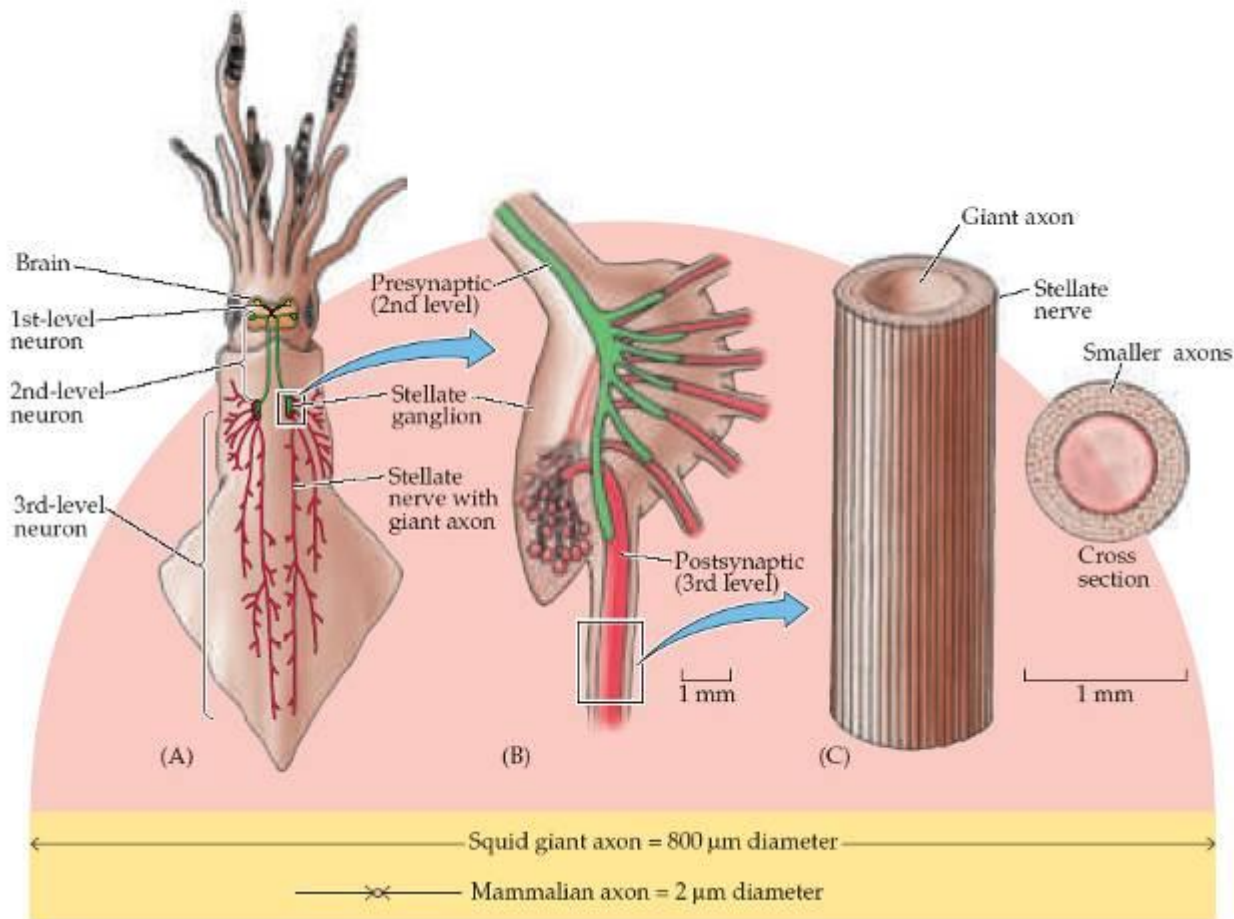
В 1936 г. английский зоолог **Дж. Янг** описал особые длинные тяжи у **кальмаров** и **каракатиц**, которые оказались необычайно **толстыми аксонами**, а не кровеносными сосудами, как считалось ранее. Они получили название **гигантских аксонов** и стали излюбленным объектом для изучения **функций**.

Young JZ (1936) Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 4:1–6

Кальмар **Loligo** и его **гигантские аксоны**. Благодаря своим крупным размерам эти аксоны быстро проводят возбуждение, обеспечивают тем самым синхронную активацию мышц мантии. Сокращаясь, эти мышцы вызывают резкий выброс воды, благодаря чему кальмар делает бросок назад.



Гигантский аксон кальмара

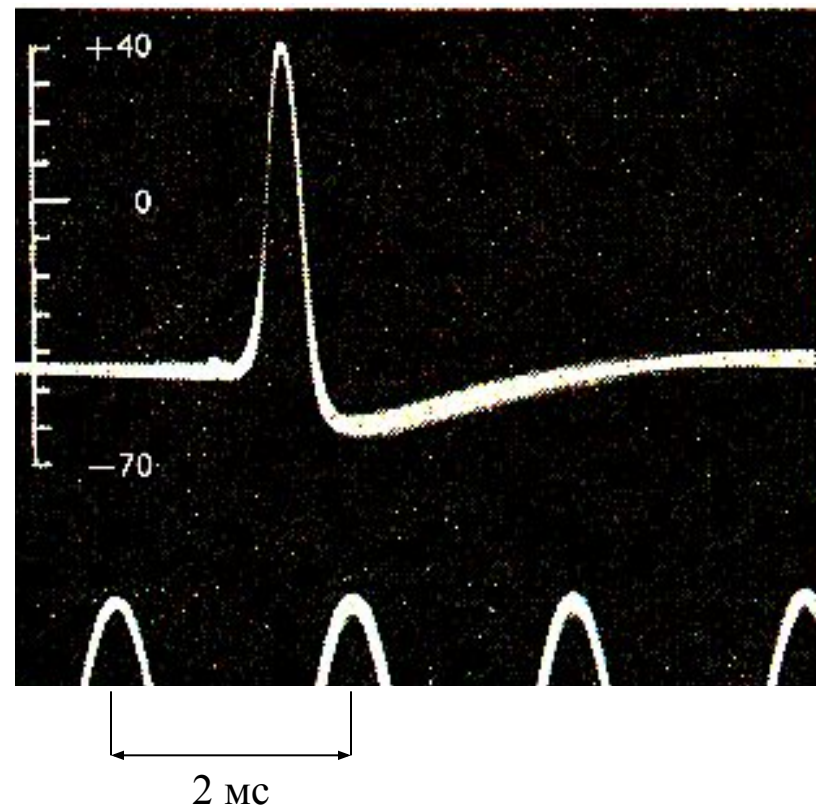
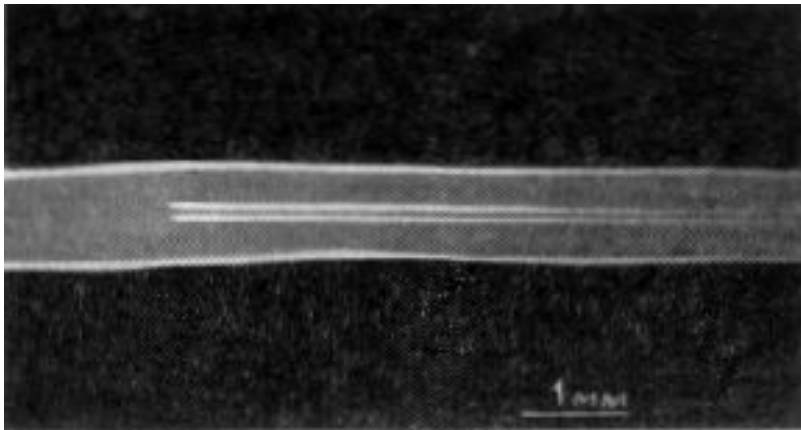


- (A) Diagram of a squid, showing the location of its giant nerve cells. Different colors indicate the neuronal components of the escape circuitry. The first- and second-level neurons originate in the brain, while the third-level neurons are in the stellate ganglion and innervate muscle cells of the mantle.
- (B) Giant synapses within the stellate ganglion. The second-level neuron forms a series of fingerlike processes, each of which makes an extraordinarily large synapse with a single third-level neuron.
- (C) Structure of a giant axon of a third-level neuron lying within its nerve. The enormous difference in the diameters of a squid giant axon and a mammalian axon are shown below.

Потенциал действия

ПД, зарегистрированные **А. Ходжкином** и **А. Хаксли** от **гигантского аксона кальмара**, помещенного в **морскую воду**.

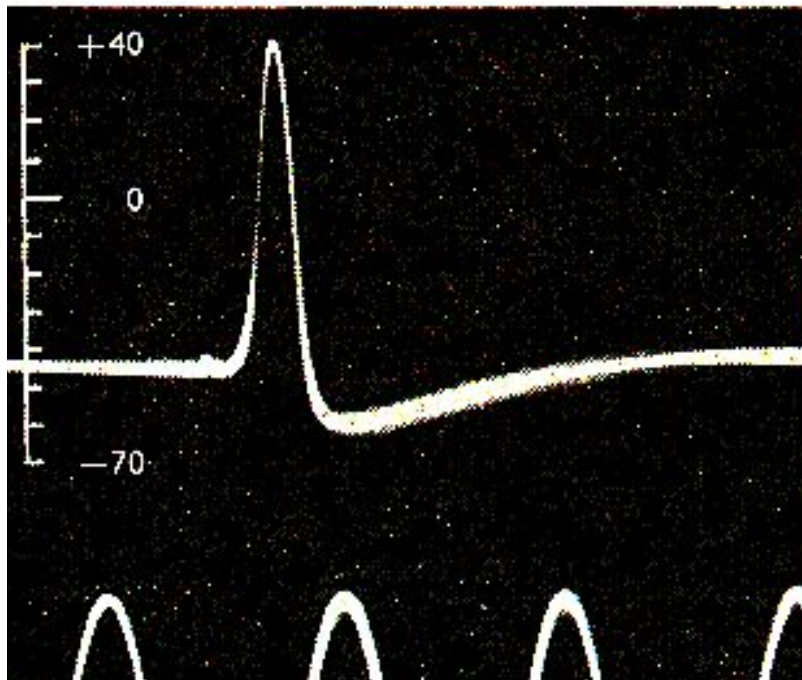
HODGKIN, A. L. AND A. F. HUXLEY *Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature 1939, 144: 710–711*



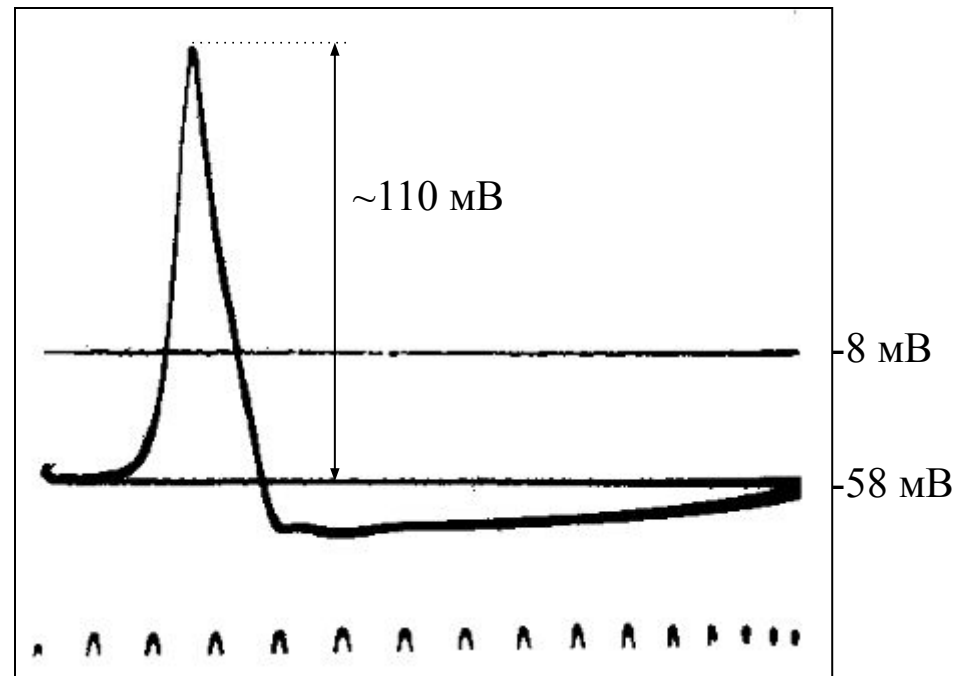
Потенциал действия

ПД, зарегистрированные **А. Ходжкином** и **А. Хаксли** от гигантского аксона кальмара, помещенного в морскую воду.

HODGKIN, A. L. AND A. F. HUXLEY Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature 1939, 144: 710–711



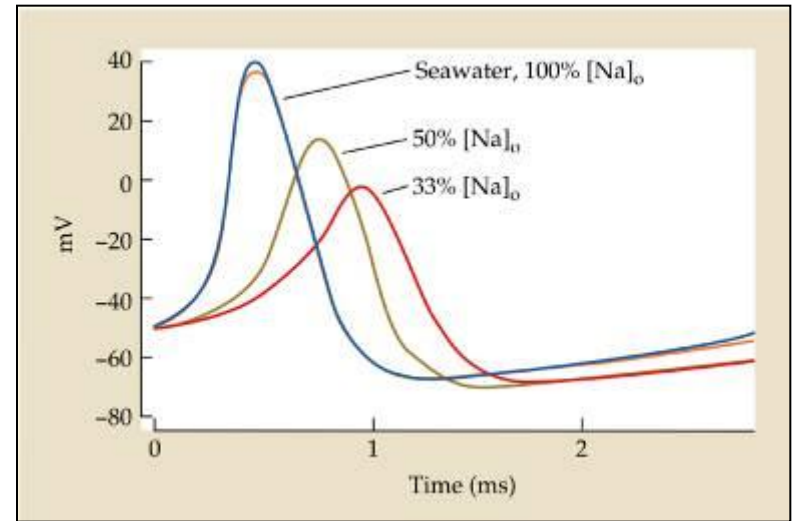
2 мс



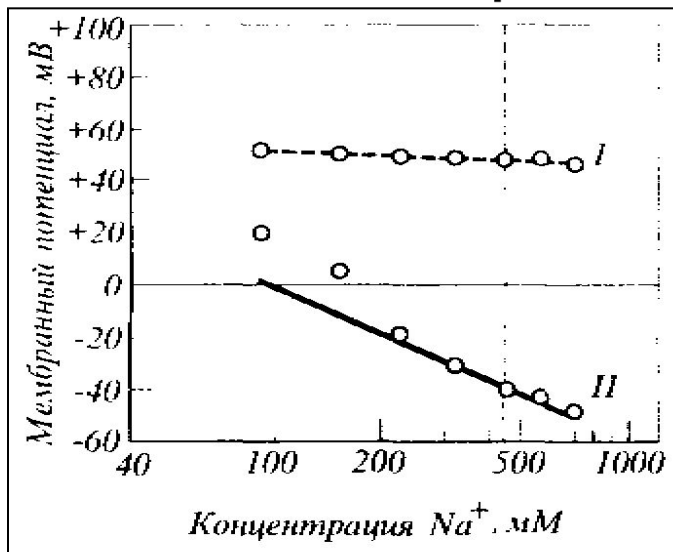
1 мс

Оказалось, что **амплитуда ПД** зависела от концентрации **ионов Na^+** во внешнем растворе. При этом **потенциал покоя** практически не изменялся.

Таким образом, предположения Э. Овертона были подтверждены прямыми экспериментами.

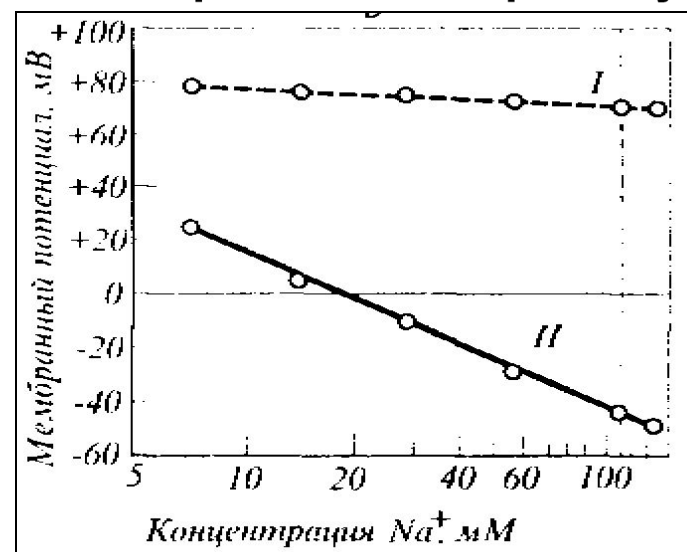


аксон кальмара



I –

миелинизированный нерв лягушки



Ходжкину, 1951)

Натриевая гипотеза

При отсутствии ионов Na^+ в наружной среде ПД не возникает. На основании таких результатов было высказано предположение, что фаза подъема и «вершина» ПД (*overshoot*) обусловлены временным повышением проницаемости мембраны для ионов Na^+ и его входом в клетку.

Следует отдать должное современнику Ю. Бернштейна Э. Овертону, который в 1902 г. сделал важное открытие, состоящее в том, что для генерации ПД в нерве необходим Na^+ . На основании своих результатов он впервые выдвинул предположение о том, что развитие ПД обусловлено Na^+ -проводимостью. Однако результаты Э. Овертона остались без должного внимания со стороны современников.

Концентрация ионов Na^+ во внеклеточной среде примерно в 10 раз выше, чем внутри клетки, поэтому E_{Na^+} составляет +50-60 мВ. Абсолютное значение потенциала на вершине ПД в экспериментах А. Ходжкина и А. Хаксли находилось в этих пределах.

$$E_{\text{Na}^+} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Na}^+]_{\text{out}}}{[\text{Na}^+]_{\text{in}}} \approx 58 \text{ мВ}$$

Ernest Overton's Contribution to the Cell Membrane Concept: A Centennial Appreciation

Arnost Kleinzeller

Physiology 12:49-53, 1997. ;

In a series of three lectures in 1895–1899, Charles Ernest Overton (1865–1933) pioneered three fundamental concepts of the structure and function of cell membranes: 1) the lipid theory of cell permeability, 2) the lipid theory of narcosis, and 3) the involvement of an Na^+/K^+ exchange in muscle and nerve excitability.

The sum of observed data led Overton to suggest that the initial phase of the excitation process in muscle and nerve is due to an (per se electroneutral) exchange of Na^+ entering the cells for K^+ loss.



Overton, E. Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. II. Mitt. Ueber die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels. *Pfluegers Arch.* 92: 346–386, 1902.

Изменения потенциала мембраны во время генерации ПД обуславливаются несколькими токами:

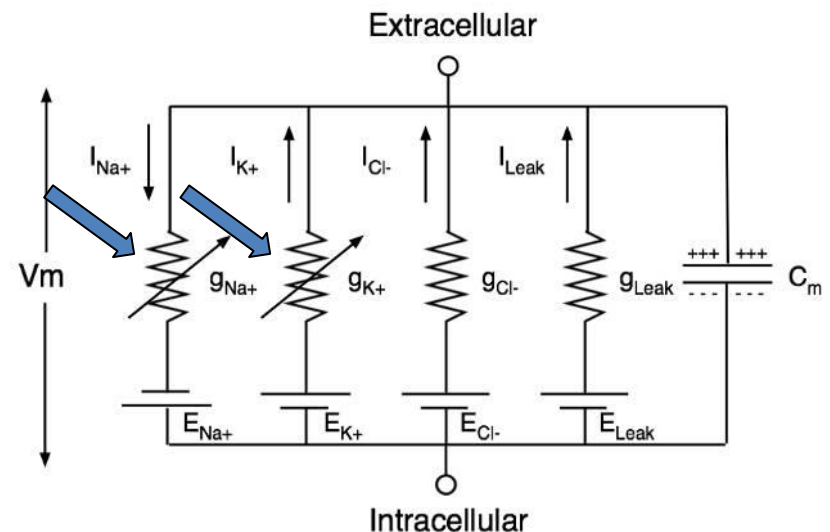
Na^+ - и K^+ -проводимости (g_{Na} и g_{K}) и результирующие токи (I_{Na} и I_{K}) сложным образом зависят как от времени t , так и от изменяющегося во времени мембранного потенциала $V(t)$:

$$I_{\text{Na}}(V, t) = g_{\text{Na}}(V, t) [V(t) - E_{\text{Na}}],$$

$$I_{\text{K}}(V, t) = g_{\text{K}}(V, t) [V(t) - E_{\text{K}}],$$

Быстрый ионный ток I_{ion} , текущий через мембрану, представляет собой сумму Na^+ - и K^+ -токов:

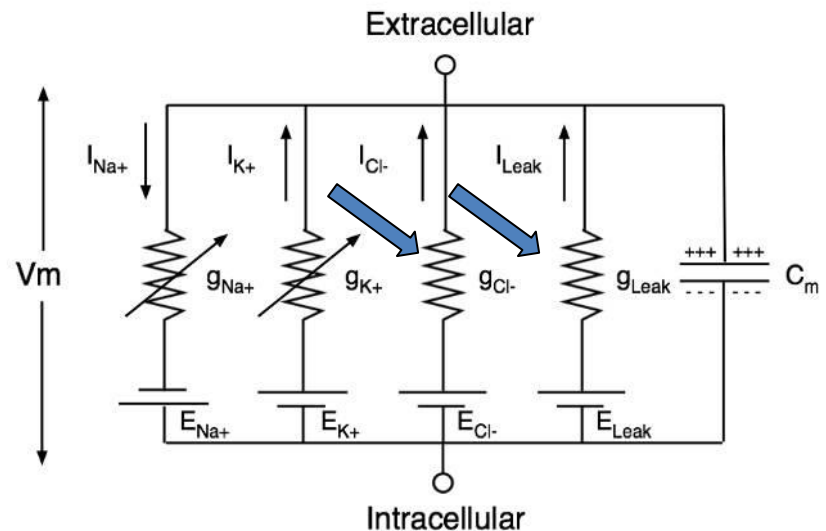
$$I_{\text{ion}}(V, t) = I_{\text{Na}}(V, t) + I_{\text{K}}(V, t).$$



Изменения потенциала мембраны во время генерации ПД обуславливаются несколькими токами:

В мембранах нейронов присутствует также так называемый ток утечки I_L (от англ. leak), протекающий через другие (потенциал-независимые) каналы. В мембранах аксонов (например, аксона кальмара) этот ток слабо выражен и вклад его в изменение потенциала относительно незначим. Однако в мембранах нейронов этот ток сопоставим с потенциал-зависимыми токами, поэтому его также необходимо учитывать при расчете потенциала:

$$I_L(V, t) = g_L(V, t) [V(t) - E_L].$$

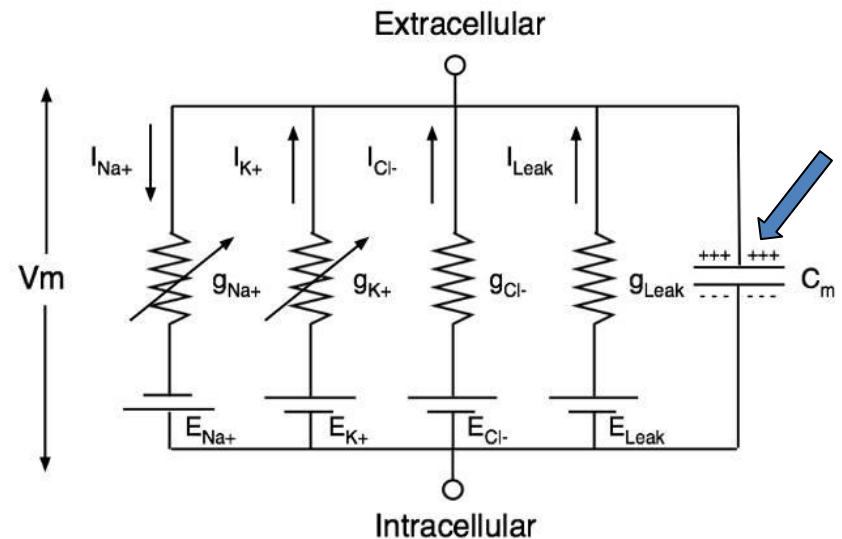


Изменения потенциала мембраны во время генерации ПД обуславливаются несколькими токами:

Быстрые изменения потенциала при развитии ПД приводят к генерации емкостного тока I_C , который обуславливает заряд и разряд мембранной емкости C_m :

$$I_C(t) = C_m dV(t)/dt.$$

Необходимо отметить, что этот ток зависит только от времени.



Таким образом, общий ток $I_M(V,t)$ при генерации ПД представляет собой сумму перечисленных токов:

$$I_M(V,t) = I_{Na}(V,t) + I_{K}(V,t) + I_L(V,t) + I_C(t)$$

Проблема измерения токов

- Разделение перечисленных токов, зависимых как от времени, так и самого потенциала, представляет собой трудную задачу и требует использования нескольких специальных методов одновременно.
- Например, чтобы доказать, что в основе ПД лежат изменения проводимостей для Na^+ и K^+ , необходимо напрямую измерить эти показатели. Однако чтобы решить эту задачу необходимо преодолеть две проблемы:
 - 1) токи, протекающие через мембрану, приводят к изменению мембранного потенциала, что в свою очередь вызывает изменения проводимостей. Эта проблема была решена при использовании **методики фиксации потенциала**, разработанной К. Коуллом. При неизменном уровне потенциала токи будут отражать изменения проводимости мембраны, которые не зависят от потенциала.
 - 2) чтобы исследовать токи Na^+ и K^+ , а также ток утечки в отдельности, их надо разделить. В ранних исследованиях Na^+ во внешнем растворе заменяли на катионы большого размера (**холин**), не проникающий через мембрану. Затем стали использовать **селективные блокаторы** для каждого типа ионных каналов.

Эквивалентная электрическая схема мембраны аксона

Ионный ток, который протекает через единицу площади мембраны во время генерации ПД, описывается уравнением:

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + I_i$$

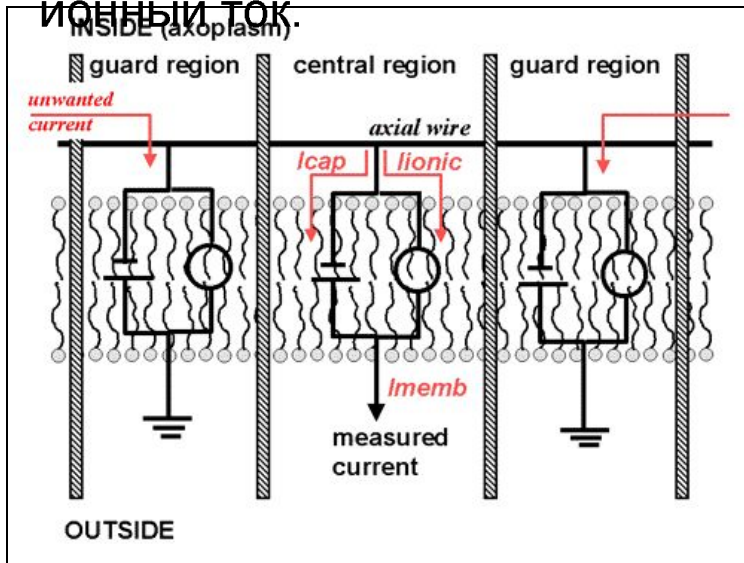
I_m - общий ток, протекающий через мембрану;

C_m - емкость мембраны;

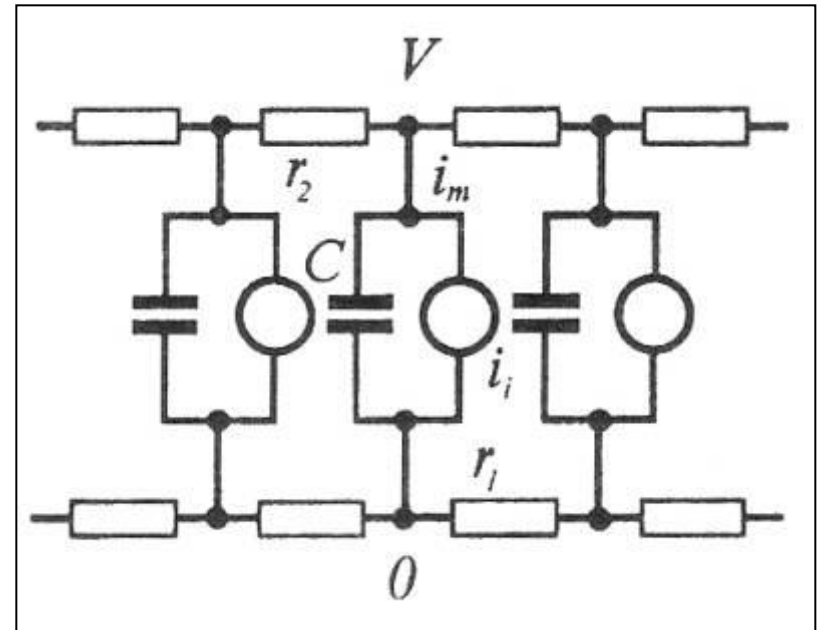
V - потенциал

t - время

I_i - ионный ток.

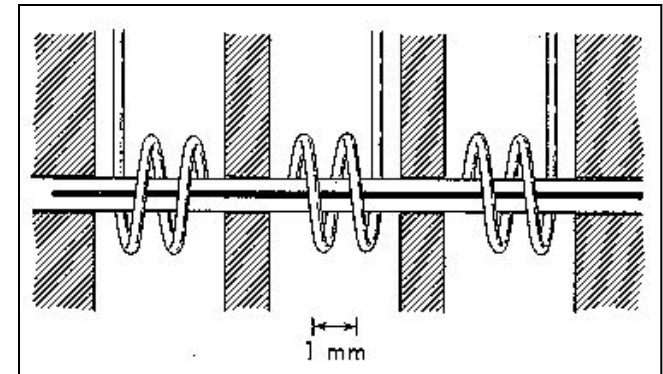


Заряд мембранной емкости в частных производных, записан так как ПД распространяется так как ПД есть изменяется как во времени, то и в пространстве. так

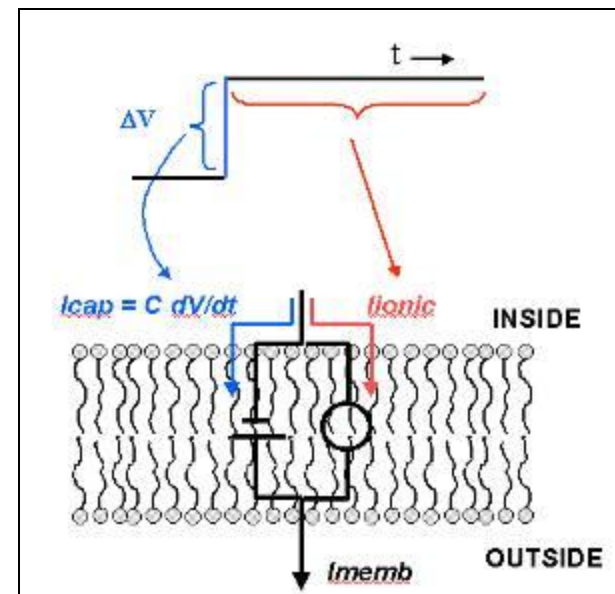
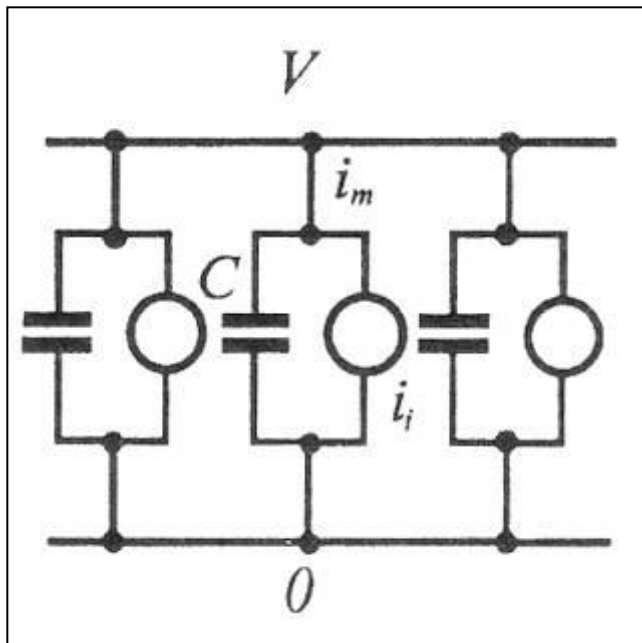


Фиксация пространства

Используя **длинные** стимулирующий (внутри аксона), регистрирующий (внутри аксона) и внешний электроды, можно исключить распространение ПД по волокну, и ПД (так называемый «**мембранный ПД**») фрагментах волокна одновременно. Уравнение в **частных производных** В-нении в **обычных производных** заменяется ура



$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + I_i$$

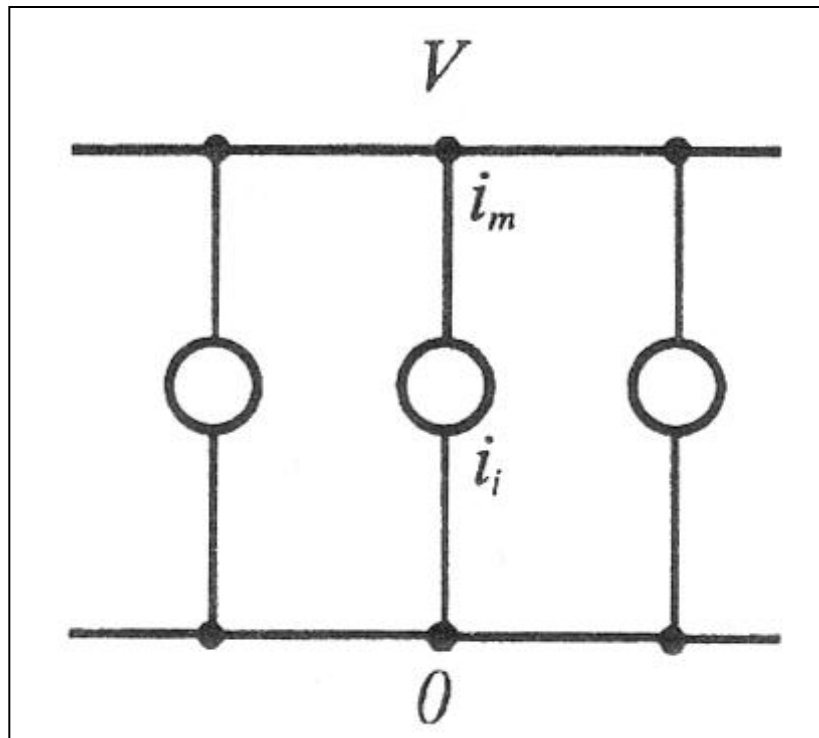


Фиксация потенциала

Если потенциал зафиксировать

(на обкладках мембранного конденсатора),
производная постоянной величины равна 0, то
и уравнение V

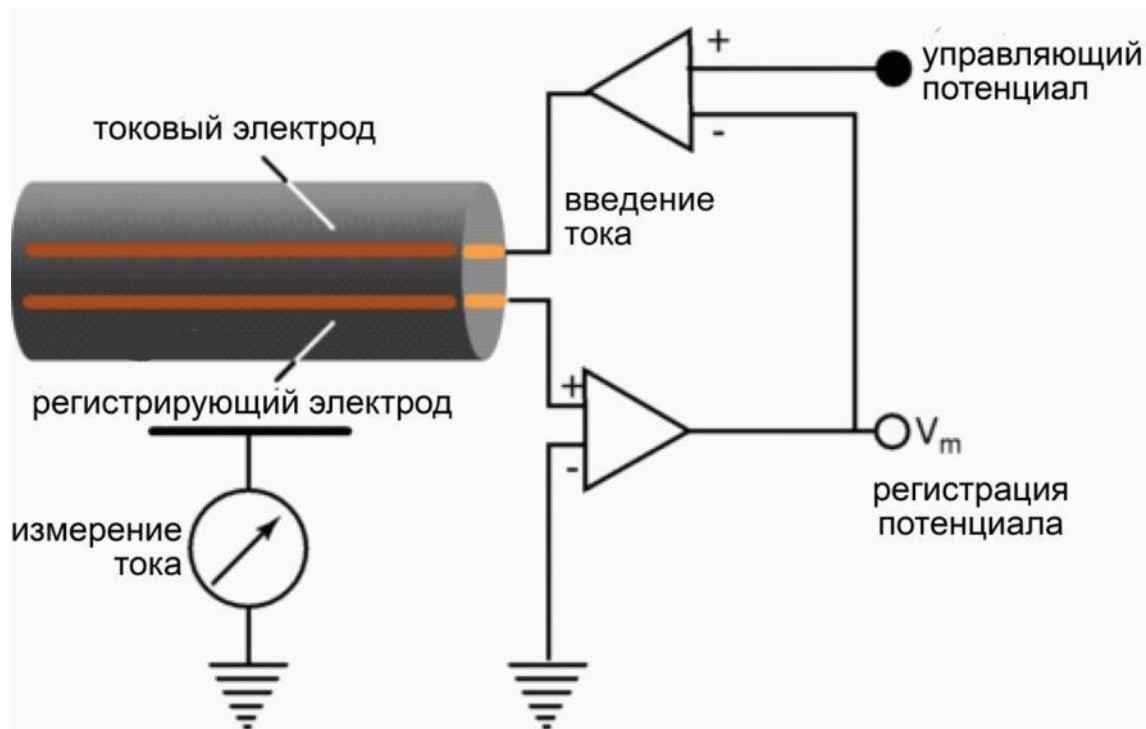
$$I_m = I_i$$



Принцип работы электрической схемы для фиксации потенциала на мембране аксона

Разность потенциалов по разные стороны мембраны фиксируется с помощью **электронной системы с обратной связью**. При этом потенциал можно ступенчато изменять на любую величину.

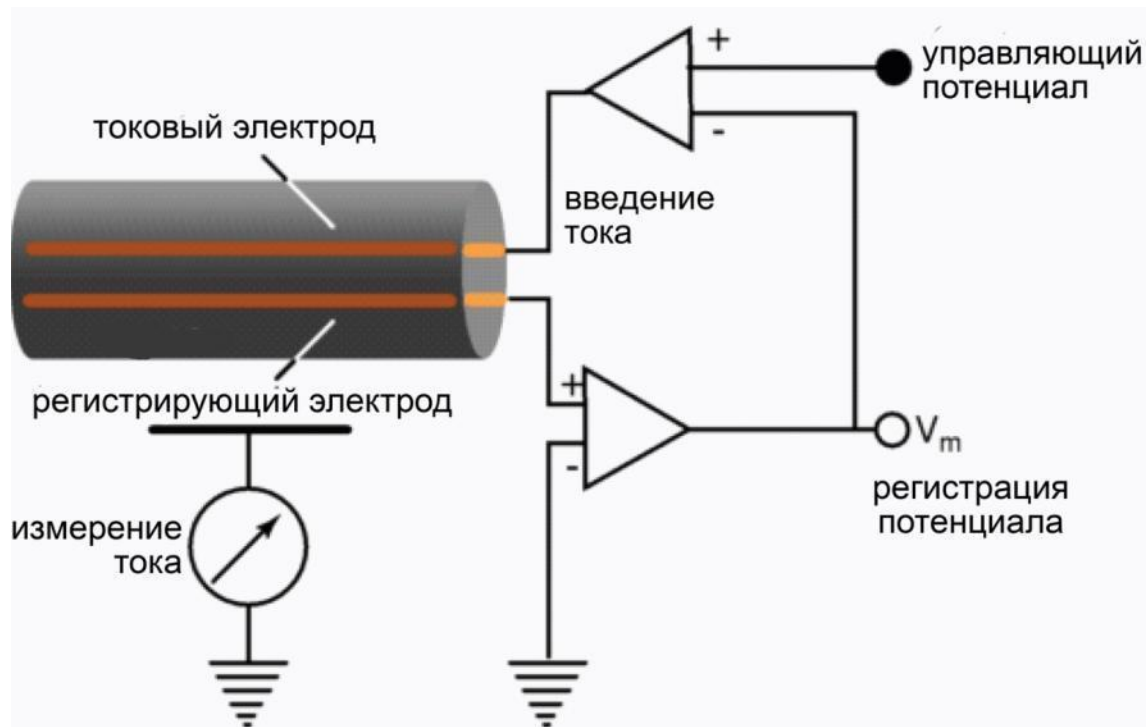
Такой метод позволяет измерять **ионные токи**, протекающие через мембрану через **каналы**, которые активируются при **изменении потенциала**.



Принцип работы электрической схемы для фиксации потенциала на мембране аксона

В соответствии с **законом Ома**, если напряжение на мембране **постоянно**, изменения **тока** однозначно связаны с изменениями **проводимости g** (обратной **сопротивлению R**), которые в свою очередь связаны с открыванием и закрыванием **ионных каналов**.

$$V = I \cdot R = I/g \text{ const}$$

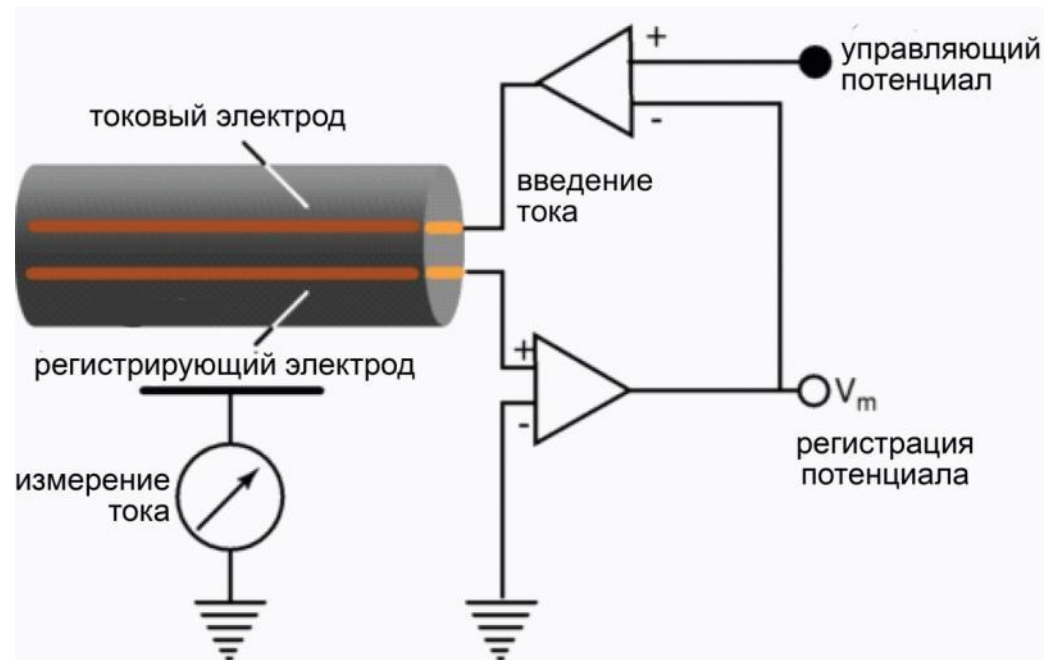


Принцип работы электрической схемы для фиксации потенциала

При помощи **усилителя-регулятора** внутриклеточный потенциал **сравнивают** с управляющим потенциалом.

Отклонение мембранного потенциала от **управляющего** усиливается, и на выходе **усилителя** возникает **управляющий ток**.

Этот ток течет через электроды, расположенные по разные стороны мембраны, в таком направлении, что **мембранный потенциал** вновь становится **равным управляющему**.

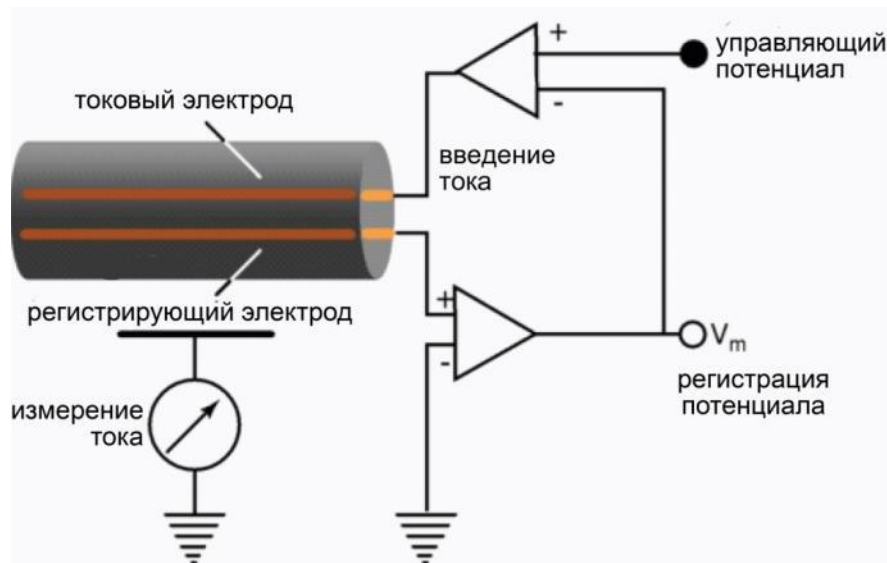


Принцип работы электрической схемы для фиксации потенциала (.....ение)

В ответ на ступенчатую деполяризацию открываются натриевые (или какие-либо другие) каналы, соответствующие ионы входят в аксон по электрохимическому градиенту и переносят с собой электрические заряды.

Эти заряды сдвигают мембранный потенциал в сторону деполяризации, однако, это отклонение компенсируется в результате удаления из клетки избыточных зарядов с помощью усилителя-регулятора.

При этом записывается ток, который подается усилителем для поддержания мембранного потенциала на необходимом уровне. Этот противоположный по знаку ток равен по абсолютной величине ионному току, протекающему через мембрану.



Этот метод оказался революционным для своего времени, поскольку предоставил ряд принципиальных возможностей для исследования возбудимости клеточных мембран:

- Емкостной ток I_C был удален из общего тока, поскольку он имеет место только во время быстрых процессов и развивается в первые несколько мкс. При длительном поддержании потенциала на постоянном уровне дифференциал $dV(t)/dt=0$, и, следовательно, $I_C=0$. Относительно медленные (порядка нескольких мс) ионные токи более продолжительны и поэтому могут быть измерены независимо от I_C .
- Мембранный потенциал может быть зафиксирован на любом **тестовом** уровне и оставаться на этом постоянном уровне сколь угодно долго. При этом представляется возможным регистрировать временную динамику результирующих **потенциал-зависимых токов**, активируемых изменением потенциала.
- Варьируя амплитудой приращения потенциала, выявляют зависимость **ионной проводимости от мембранного потенциала**.

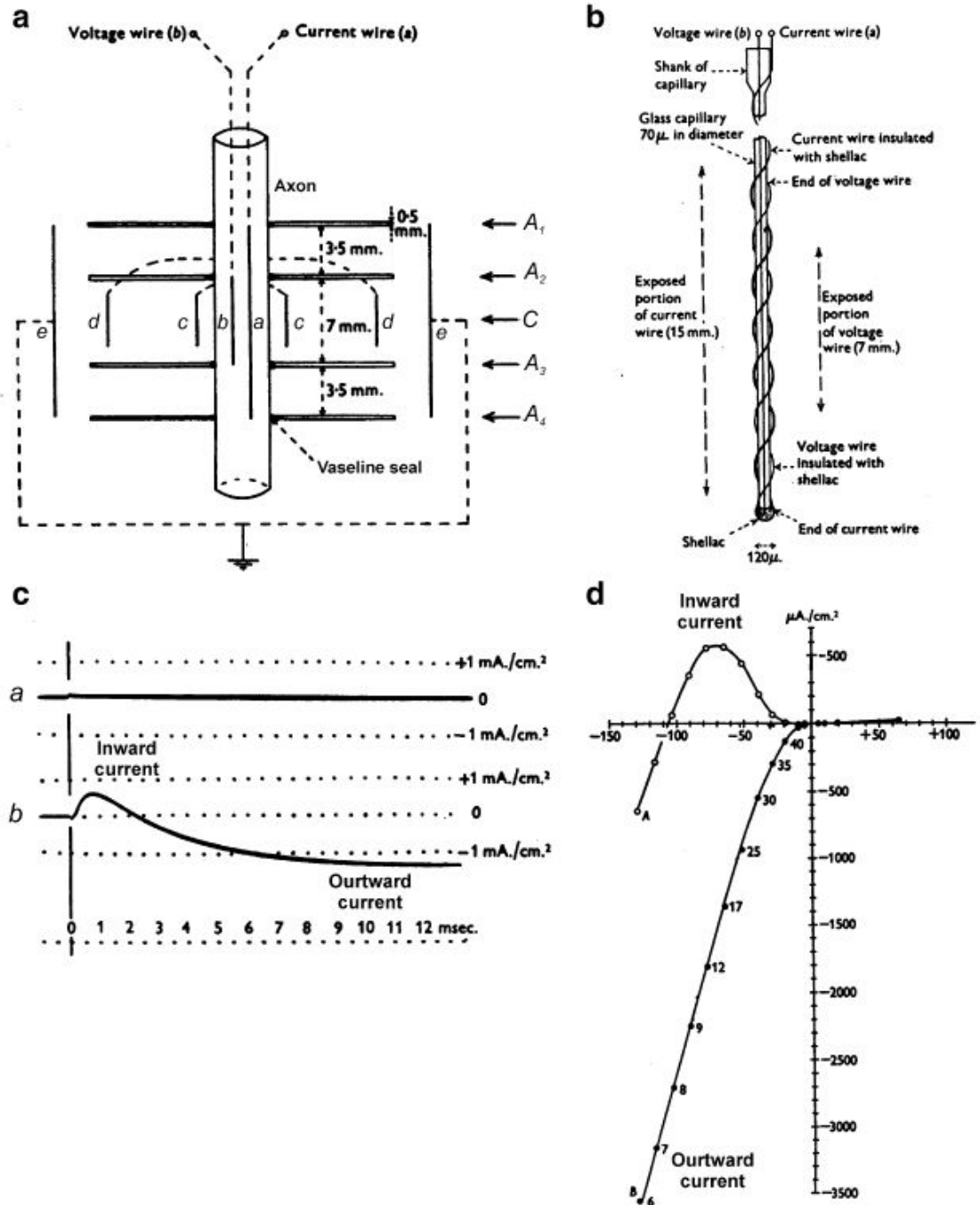
Этот метод оказался революционным для своего времени, поскольку предоставил ряд принципиальных возможностей для исследования возбудимости клеточных мембран:

- Фиксируя на мембране определенный (кондиционирующий) уровень потенциала для стабилизации ее состояния, можно исследовать процессы **активации** и **инактивации** ионных каналов в зависимости времени и потенциала.
- Изменяя концентрации ионов по обе стороны мембраны и/или устраняя определенную ионную проводимость с помощью нейротоксинов, специфически блокирующих ионную проводимость, можно установить относительный вклад I_{Na} и I_K в общий ионный ток.
- Существенным дальнейшим развитием метода явилось применение длинных внутренних и внешних электродов, что позволило «зафиксировать пространство» - так называемый прием «**фиксации пространства**». Это обеспечивало постоянный уровень трансмембранного потенциала и одновременное протекание одинаковых процессов в любой точке внутриклеточного и внеклеточного пространствах без искажений, которые могли иметь место при распространении локальных изменений потенциала и, соответственно, ионных токов вдоль мембраны.

Ионные токи во время генерации ПД в аксоне кальмара

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952)
 Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo.

J Physiol (Lond) 116:424–448



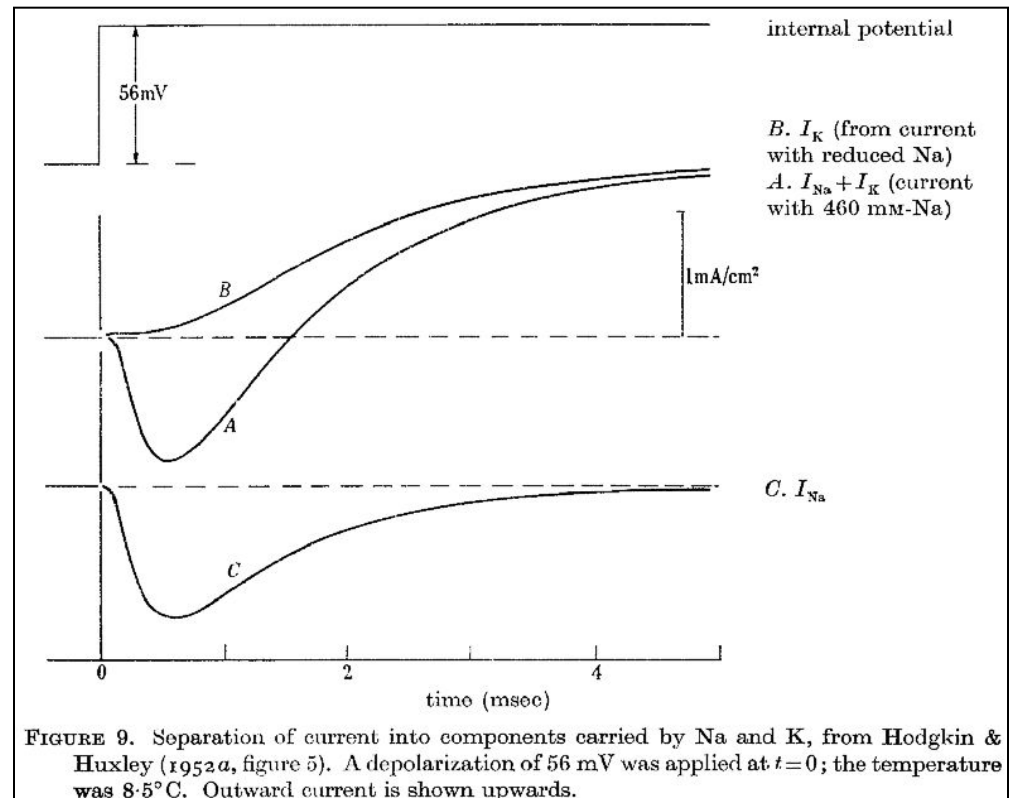
Ионные токи во время генерации ПД в аксоне кальмара

Методика фиксации потенциала позволяет регистрировать ионные токи, проходящие через возбужденную мембрану во время генерации ПД. Таким образом можно выделить «вольтамперные» характеристики мембраны аксона. С использованием этого метода в 1952 г. А. Ходжкин, А. Хаксли и В. Катц впервые измерили ионные токи, проходящие через мембрану во время возбуждения.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952)

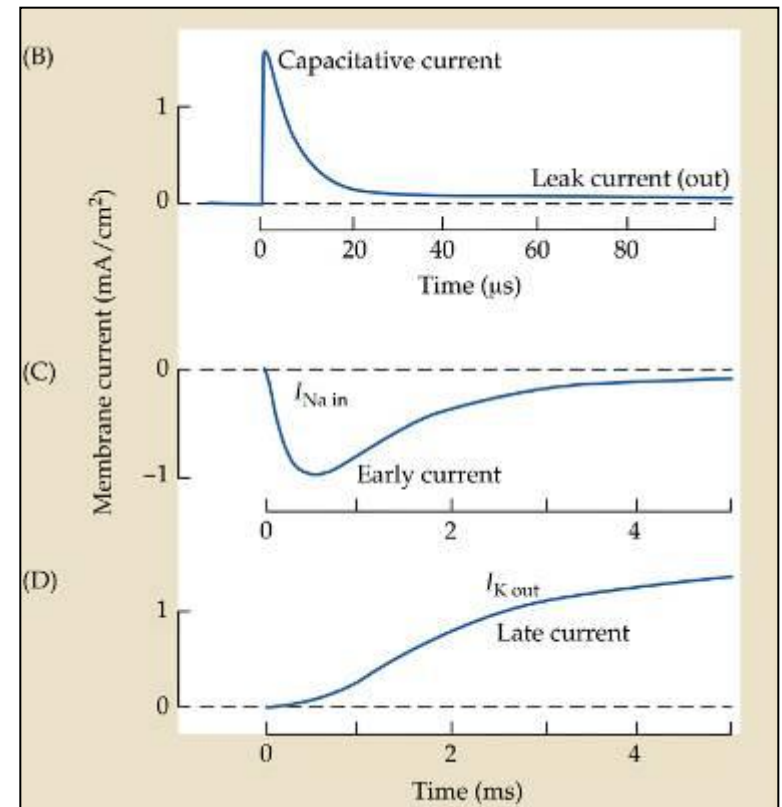
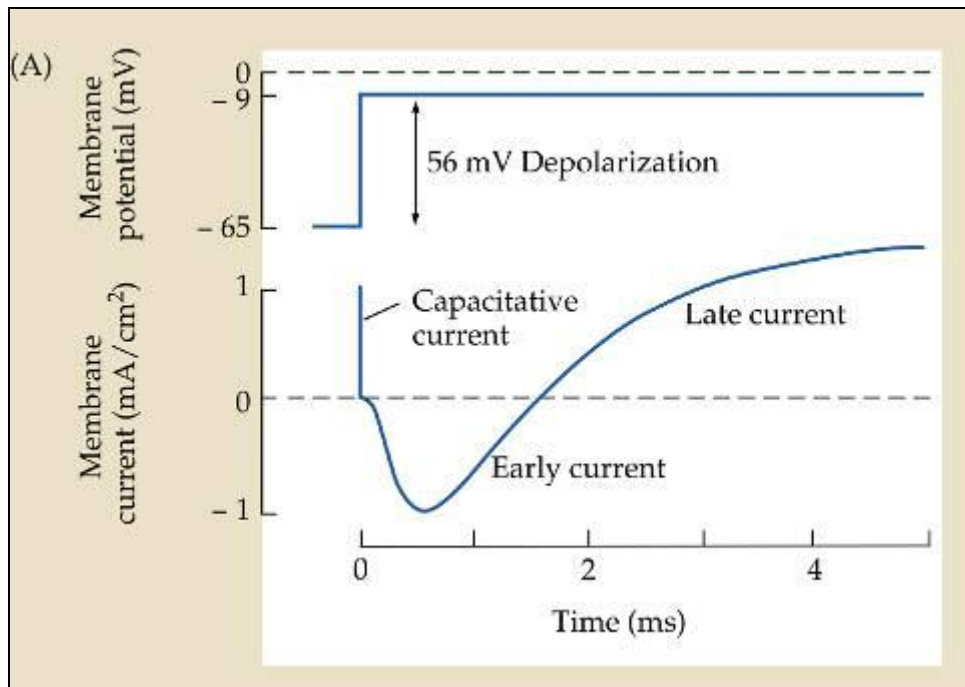
Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*.

J Physiol (Lond) 116:424–448



Ионные токи во время генерации ПД в аксоне кальмара

Методика фиксации потенциала позволяет регистрировать ионные токи, проходящие через возбужденную мембрану во время генерации ПД. Таким образом можно получить «вольт-амперные» характеристики мембраны аксона. С использованием этого метода в 1952 г. А. Ходжкин, А. Хаксли и Б. Катц впервые измерили ионные токи, проходящие через мембрану во время возбуждения.

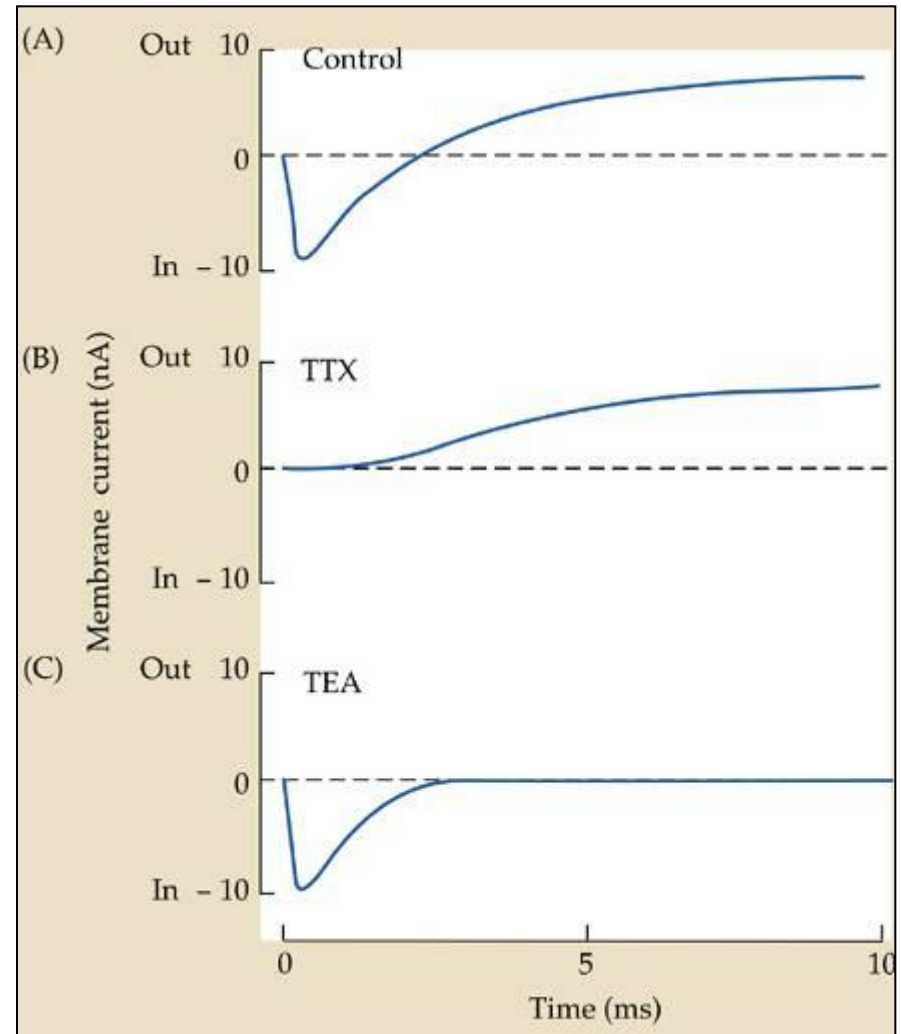


Фармакологическое разделение мембранных токов

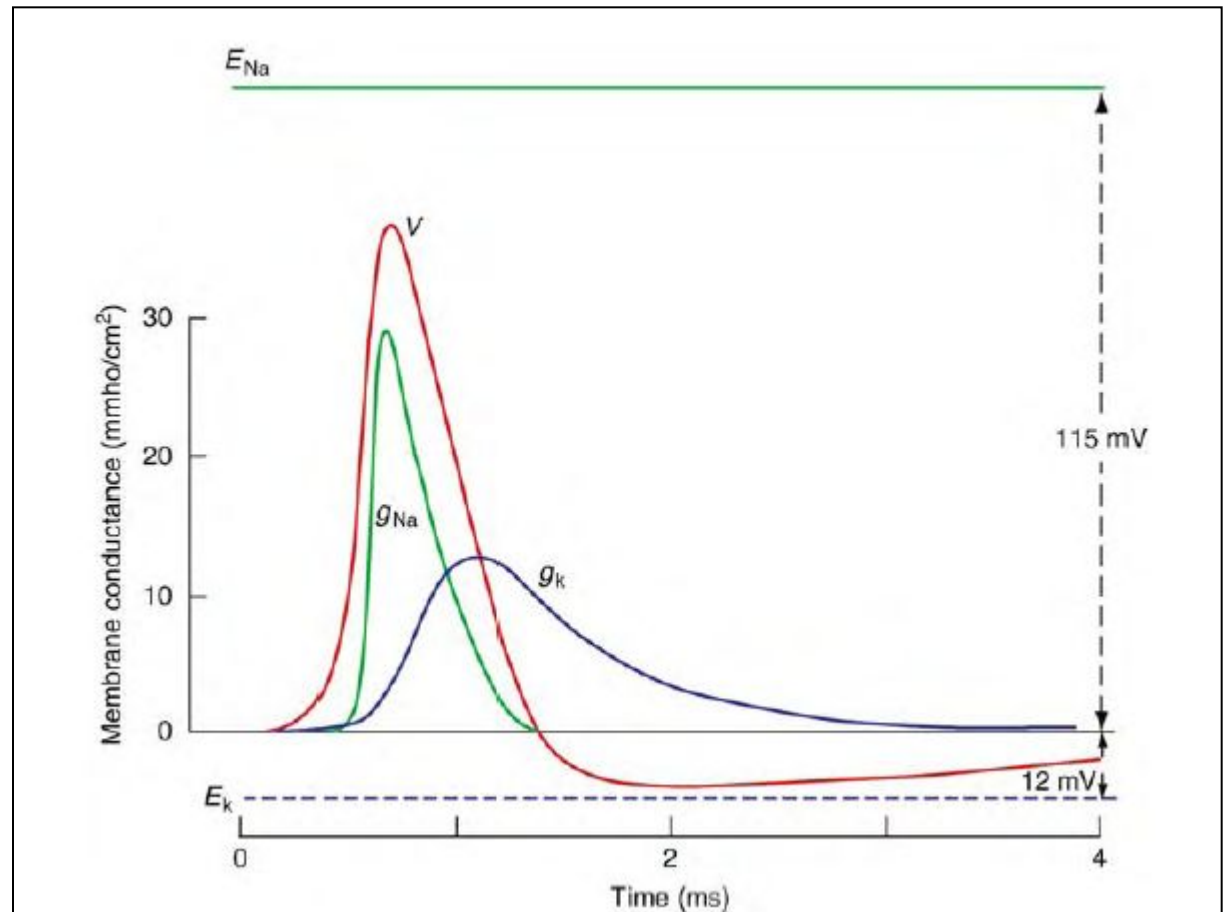
A. Потенциал в нормальных условиях.

B. Блокирование Na^+ -тока тетродотоксином (TTX).

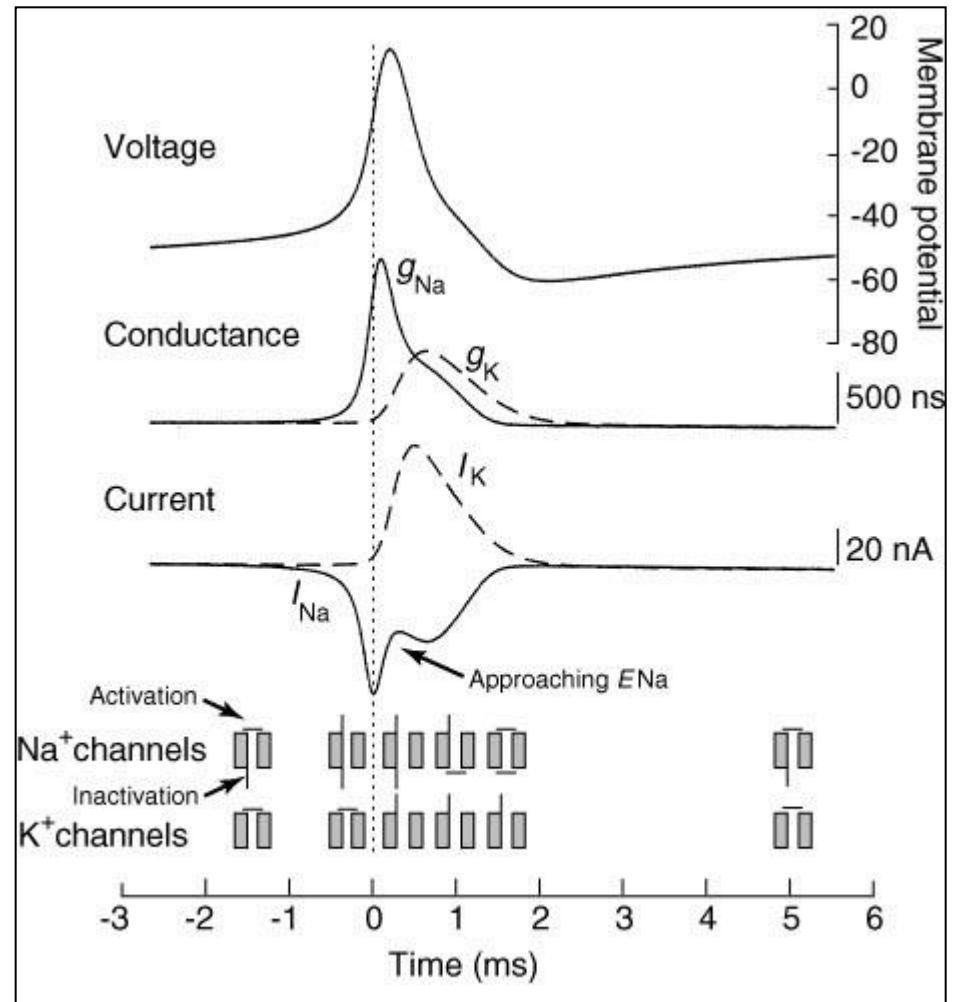
C. Блокирование K^+ -тока тетраэтил-аммонием (TEA).



Временные динамики развития ПД (V) и определяющих его ионных проводимостей (g_{Na} и g_K), рассчитанные А. Ходжкиным и А. Хаксли на основе результатов экспериментов на гигантском аксоне кальмара с использованием методики фиксации потенциала. E_{Na} и E_K – обозначают уровни равновесных потенциалов для соответствующих ионов.



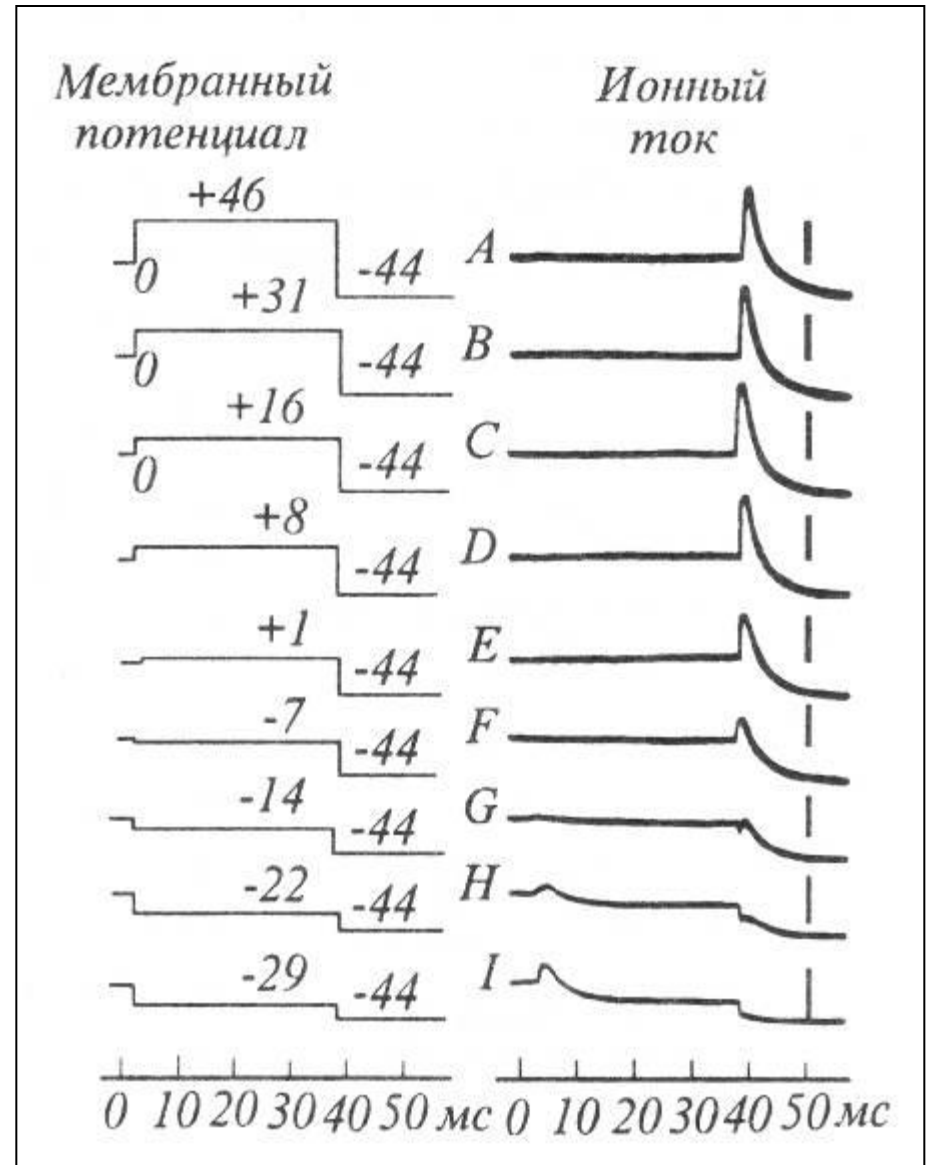
Временные динамики развития ПД (V) и определяющих его ионных проводимостей (g_{Na} и g_K), рассчитанные А. Ходжкиным и А. Хаксли на основе результатов экспериментов на гигантском аксоне кальмара с использованием методики фиксации потенциала.



Инактивация натриевой проводимости мембраны

Мембранный потенциал предварительно **фиксировали** на определенном уровне (от -46 мВ, гиперполяризация относительно потенциала покоя (-65 мВ), до +29 мВ, деполяризация).

Затем мембрану деполяризовали на 44 мВ. В результате регистрировали **входящий Na^+ -ток**. Амплитуда тока **увеличивалась** с гиперполяризацией и **уменьшалась** с деполяризацией.



Инактивация натриевой проводимости мембраны

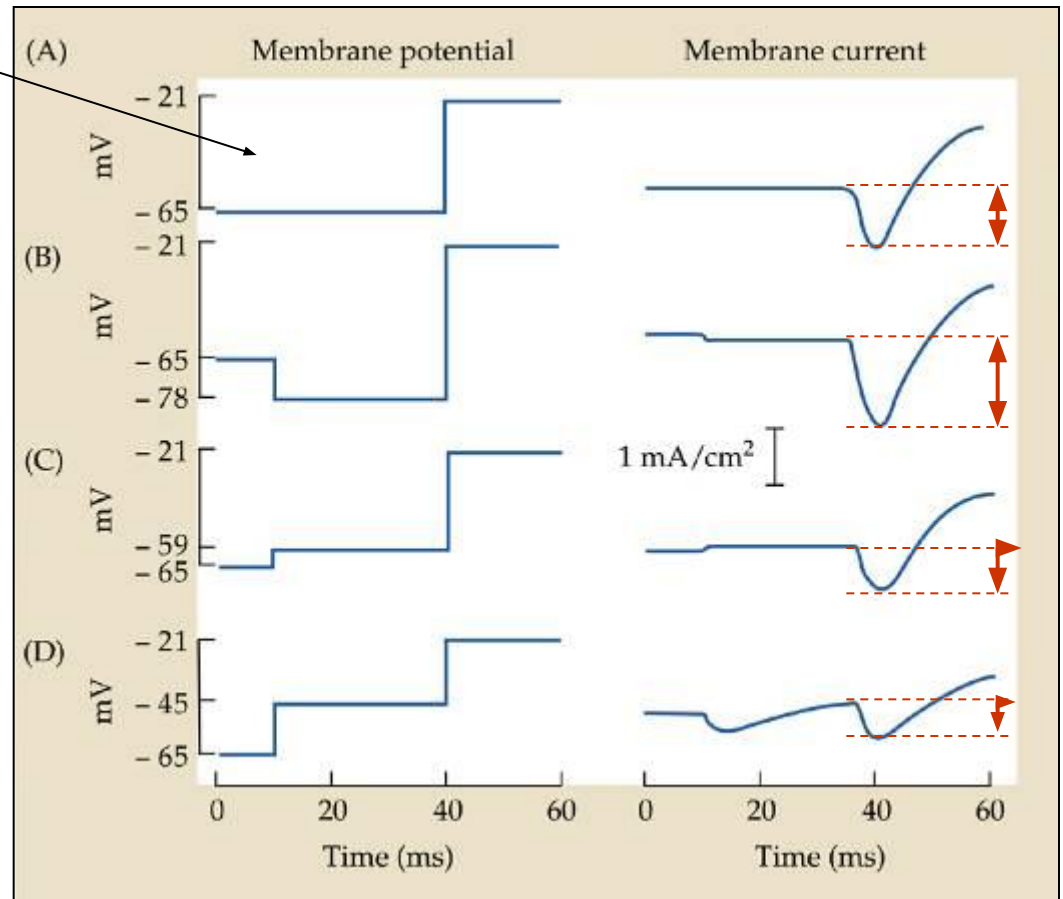
А. Мембранный ток при фиксации потенциала на уровне потенциала покоя (-65 мВ).

То же при фиксации потенциала на уровне:

-78 мВ (B);

-59 мВ (C);

-45 мВ (D).



Инактивация натриевой проводимости мембраны

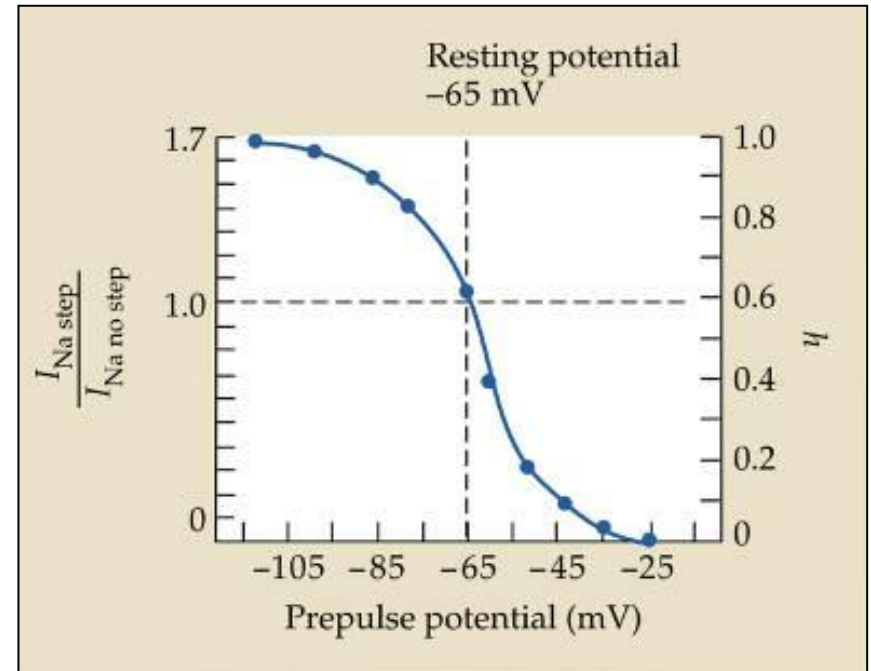
(

График зависимости пронормированной амплитуды тока от уровня мембранного потенциала, на котором мембрану предварительно фиксировали. «1» по оси ординат соответствует амплитуде тока при потенциале покоя. По оси абсцисс - влево - гиперполяризация, вправо – деполяризация относительно потенциала покоя (-65 мВ).

При увеличении гиперполяризации амплитуда тока возрастает, что объясняется увеличением числа неинaktivированных (потенциально «готовых» к активации) Na^+ -каналов.

При деполяризации, с-
ло неинaktivированных каналов
уменьшается
увеличивается и соответственно,
ванных каналов.

При гиперполяризации ~30 мВ
все Na^+ -каналы неинaktivированы
(на активаци-
ции) потенциально готовы к



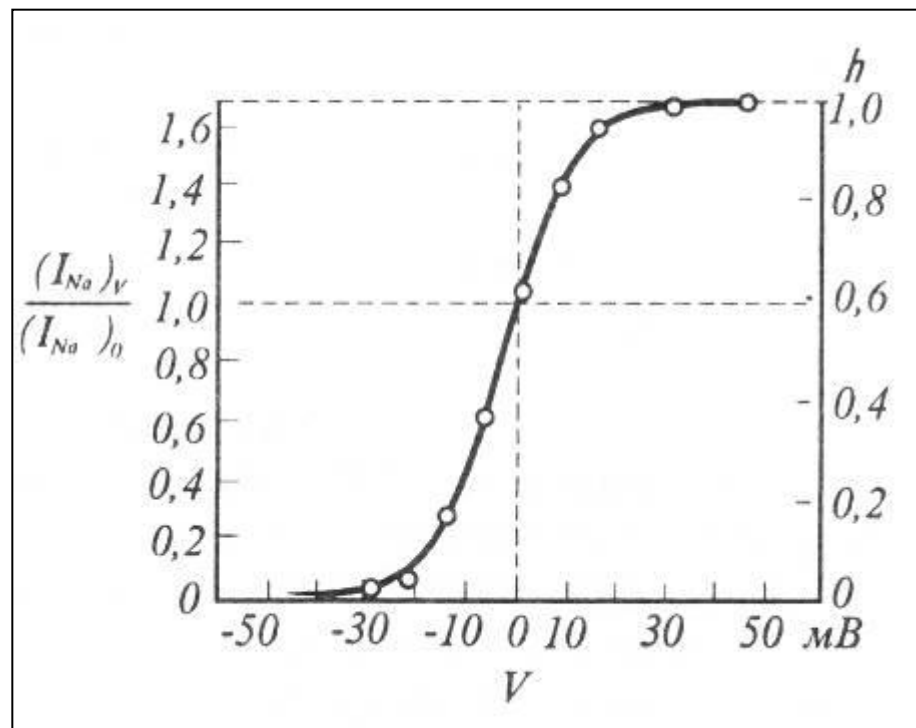
Инактивация натриевой проводимости мембраны (продолжение)

График зависимости **пронормированной амплитуды тока** от **уровня мембранного потенциала**, на котором мембрану предварительно фиксировали. «1» по оси ординат соответствует амплитуде тока при **потенциале покоя**. По оси абсцисс - вправо - **гиперполяризация**, влево – **деполяризация** относительно потенциала покоя (принят за «0»).

При увеличении **гиперполяризации** амплитуда тока возрастает, что объясняется увеличением числа **неинактивированных** (потенциально «готовых» к активации) **Na⁺-каналов**.

При **деполяризации**, **с-**
ло **неинактивированных каналов**
уменьшается **напротив, чи**
увеличивается **соответственно,**
и число **инактивиро-**
ванных каналов.

При **гиперполяризации** **~30 мВ**
все **Na⁺-каналы неактивированы**
(**на** **актива-**
ции) потенциально готовы к



Активационные и инактивационные механизмы проводимости мембраны

J. Physiol. (1952) 117, 500-544

A QUANTITATIVE DESCRIPTION OF MEMBRANE
CURRENT AND ITS APPLICATION TO CONDUCTION
AND EXCITATION IN NERVE

BY A. L. HODGKIN AND A. F. HUXLEY

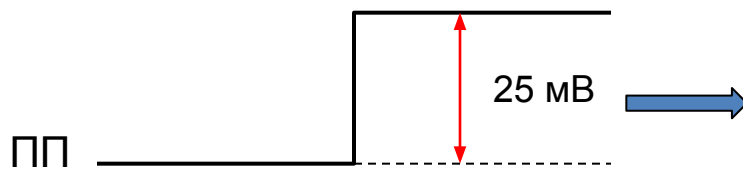
$$I_{ion} = \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - E_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V_m - E_K) + \bar{g}_L (V_m - E_L)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1-m) - \beta_m(V)m$$

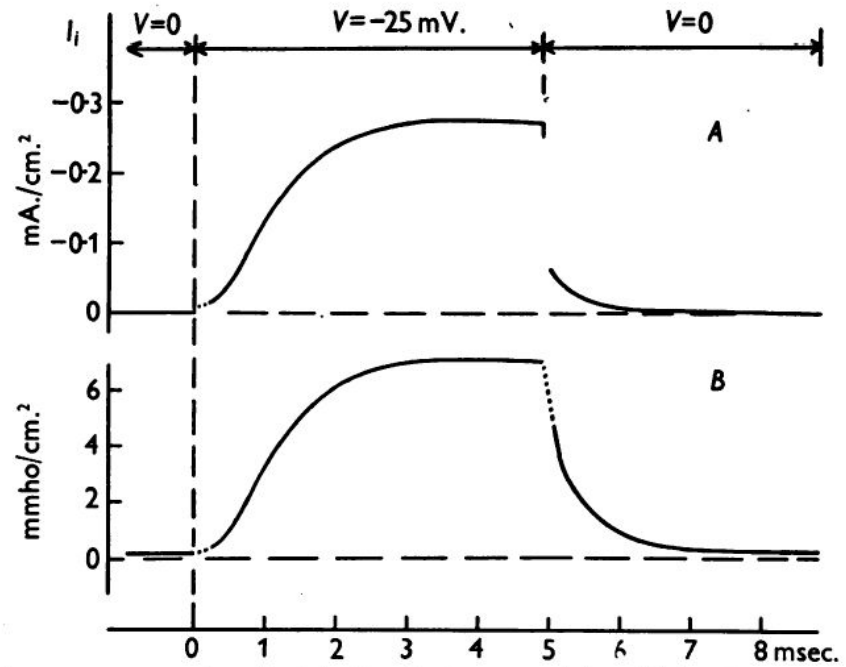
$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1-h) - \beta_h(V)h$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n$$

Активация калиевой проводимости



$$g_K = I_K (V - V_K) \rightarrow$$

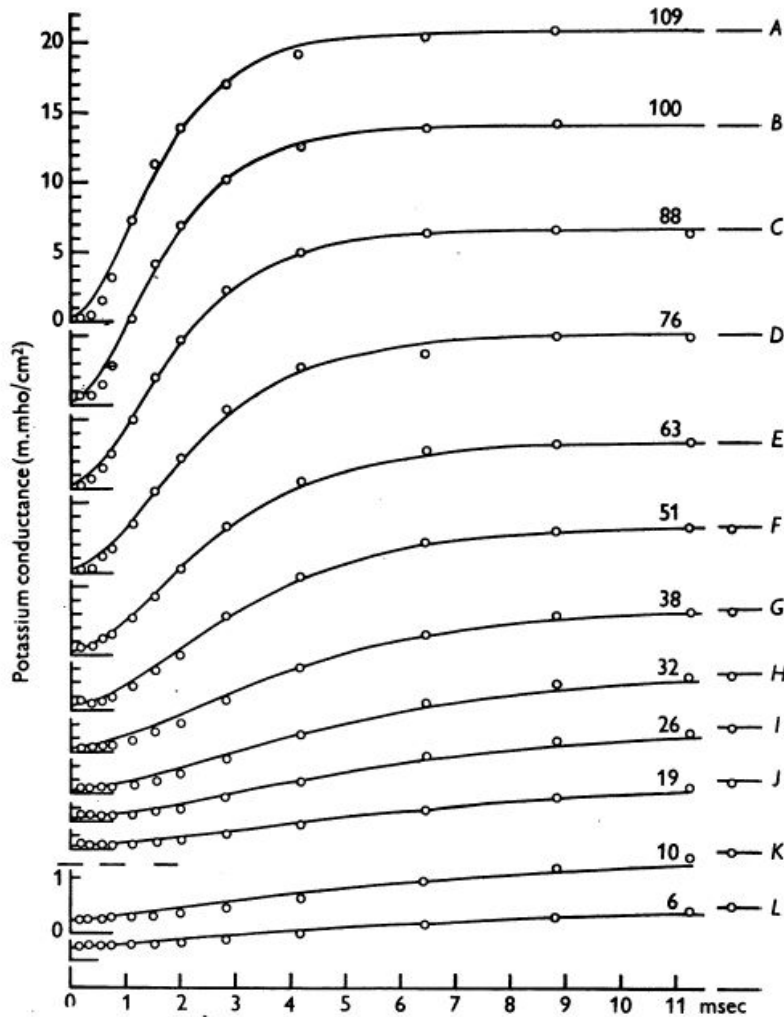


HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F. (1952)

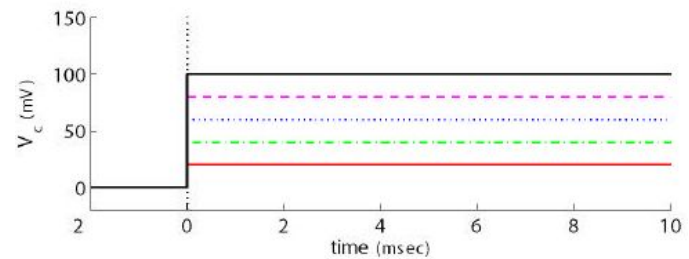
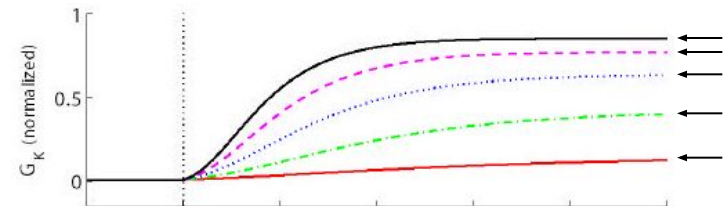
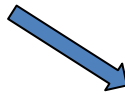
The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo

J. Physiol. 116, 473-496.

Активация калиевой проводимости

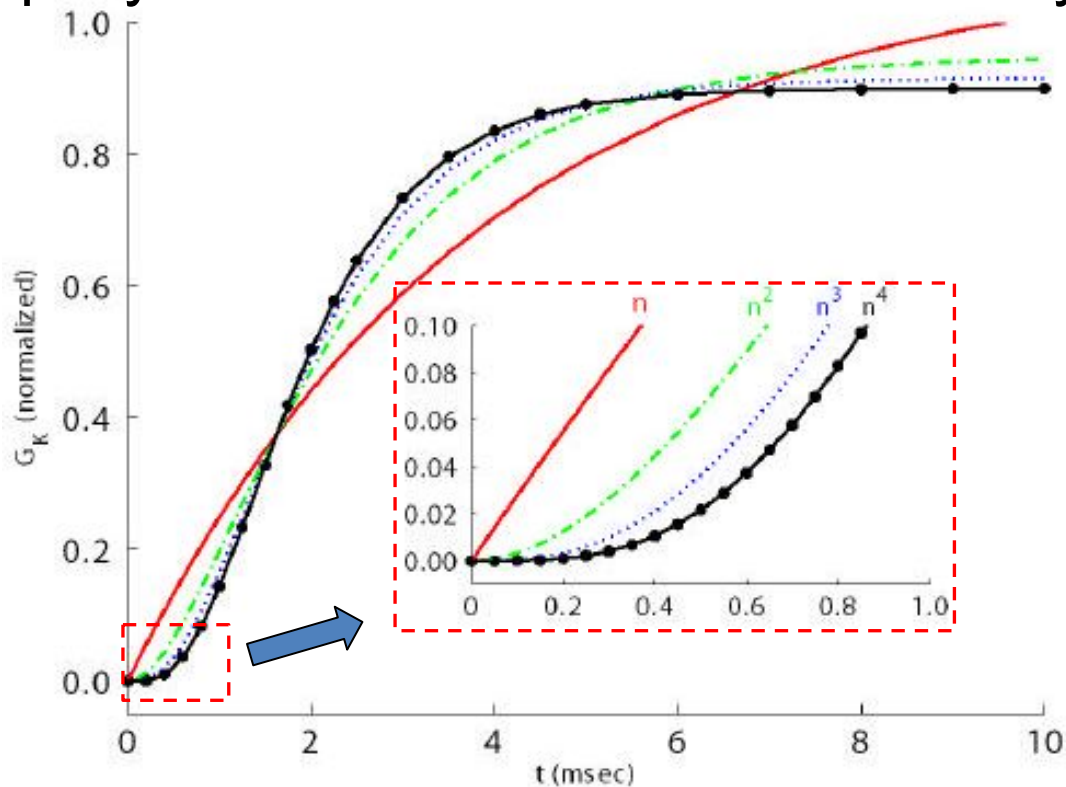


Curve	V (mV) (1)	$g_{K\infty}$ (m.mho/cm ²) (2)	n_{∞} (3)
—	(-∞)	(24·31)	(1·000)
A	-109	20·70	0·961
B	-100	20·00	0·953
C	- 88	18·60	0·935
D	- 76	17·00	0·915
E	- 63	15·30	0·891
F	- 51	13·27	0·859
G	- 38	10·29	0·806
H	- 32	8·62	0·772
I	- 26	6·84	0·728
J	- 19	5·00	0·674
K	- 10	1·47	0·496
L	- 6	0·98	0·448
—	(0)	(0·24)	(0·315)



Модель активации калиевой проводимости

Зависимость величины G_K от времени. Вставленный рисунок – то же в течение 1-ой секунды



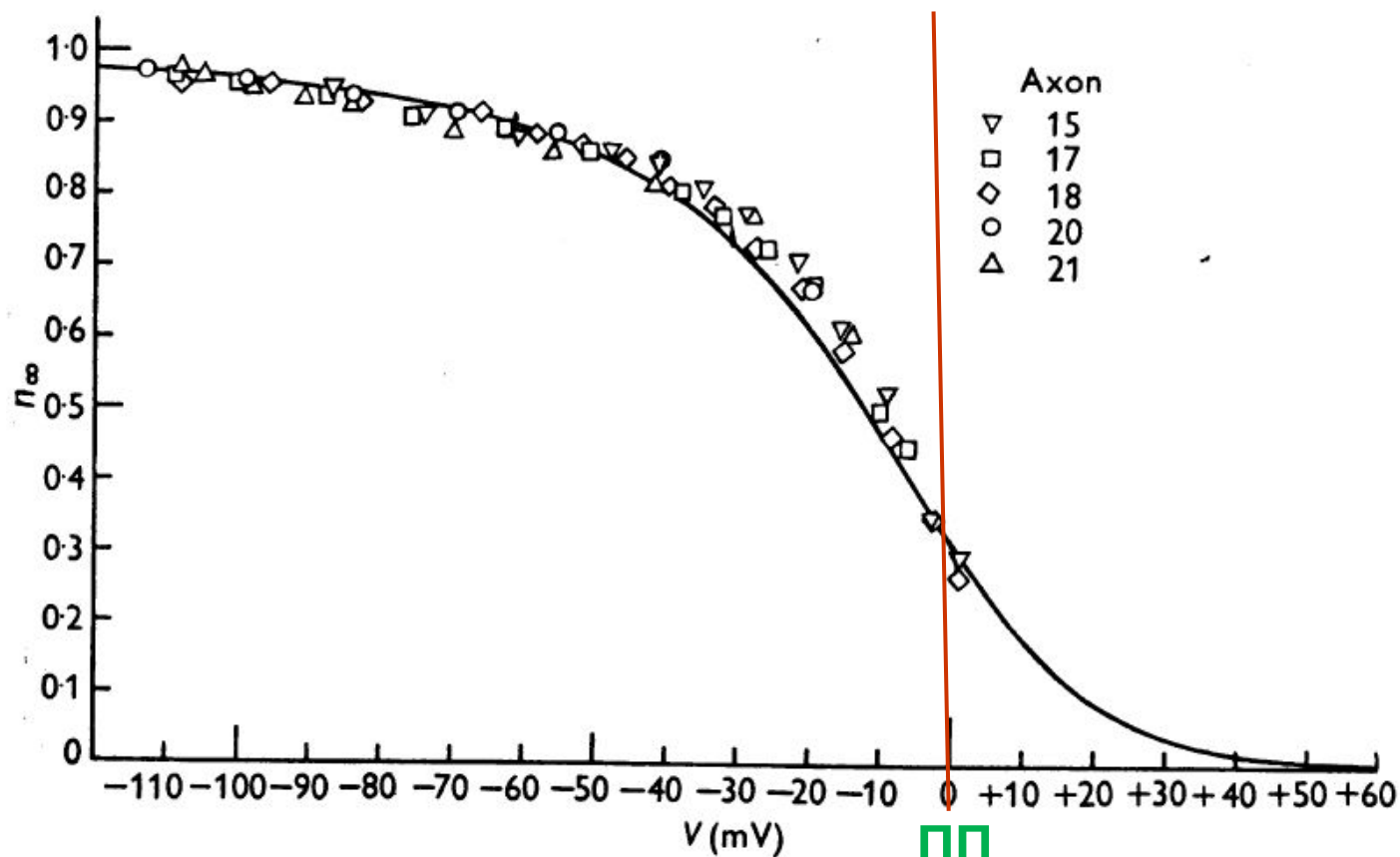
$$G_K = \bar{g}_K n^j \quad (j = 1-4)$$

$$n(t) = n_\infty(V_c) - (n_\infty(V_c) - n_0(0))e^{-t/\tau_n(V_c)}$$

$$G_K = \bar{g}_K n^4 = \bar{g}_K \left[n_\infty(V_c) - (n_\infty(V_c) - n_\infty(0))e^{-t/\tau_n} \right]^4$$

Кривая активации калиевой проводимости

Зависимость величины n_{∞} от потенциала



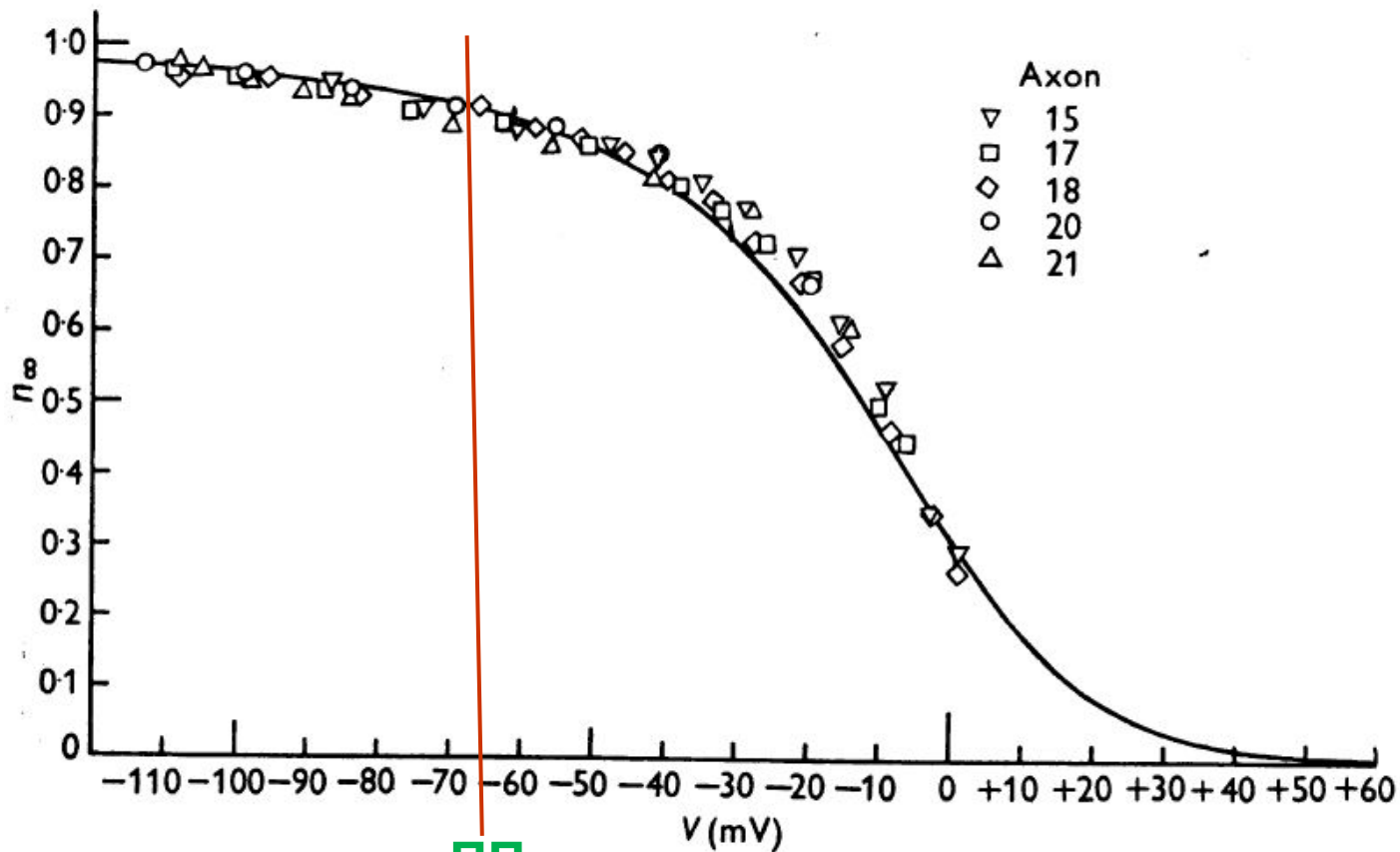
деполяризация

ПП

гиперполяризация

Кривая активации калиевой проводимости

Зависимость величины n_{∞} от потенциала



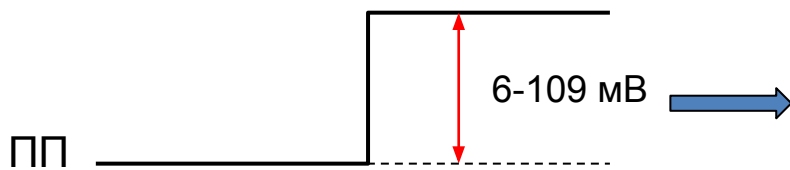
гиперполяризация **пп**

деполяризация

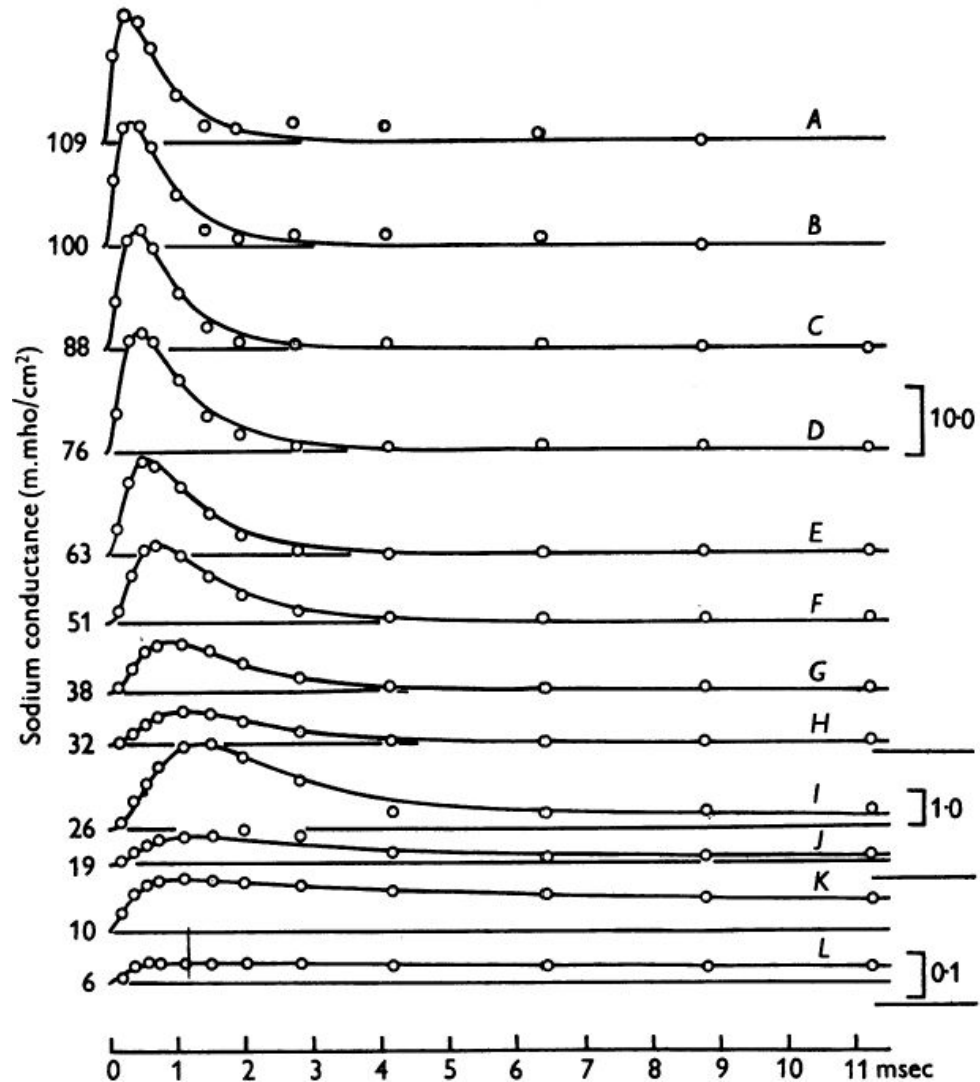
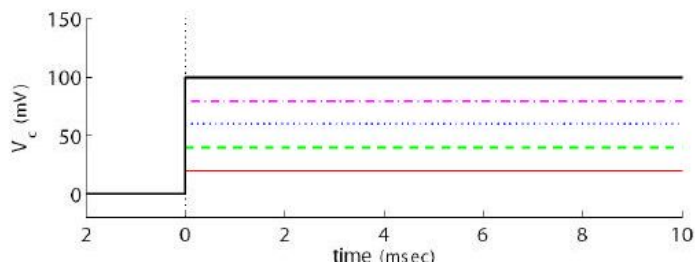
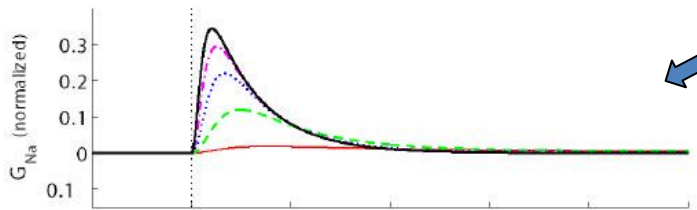
Активация калиевой проводимости мембраны

- Для K^+ -проводимости А. Ходжкин и А. Хаксли ввели переменную n , которая отражает зависимость проводимости K^+ от времени и потенциала. Они использовали уравнение:
- $g_K = n^4 * G_K$
- В уравнении G_K - максимальная проводимость для K^+ , когда все K^+ -каналы открыты и способны пропускать ионы.
- Значения переменной n изменяются между «0» и «1» как функция от времени и потенциала.
- n^4 представляет долю от максимальной K^+ -проводимости в данный момент времени.

Активация натриевой проводимости

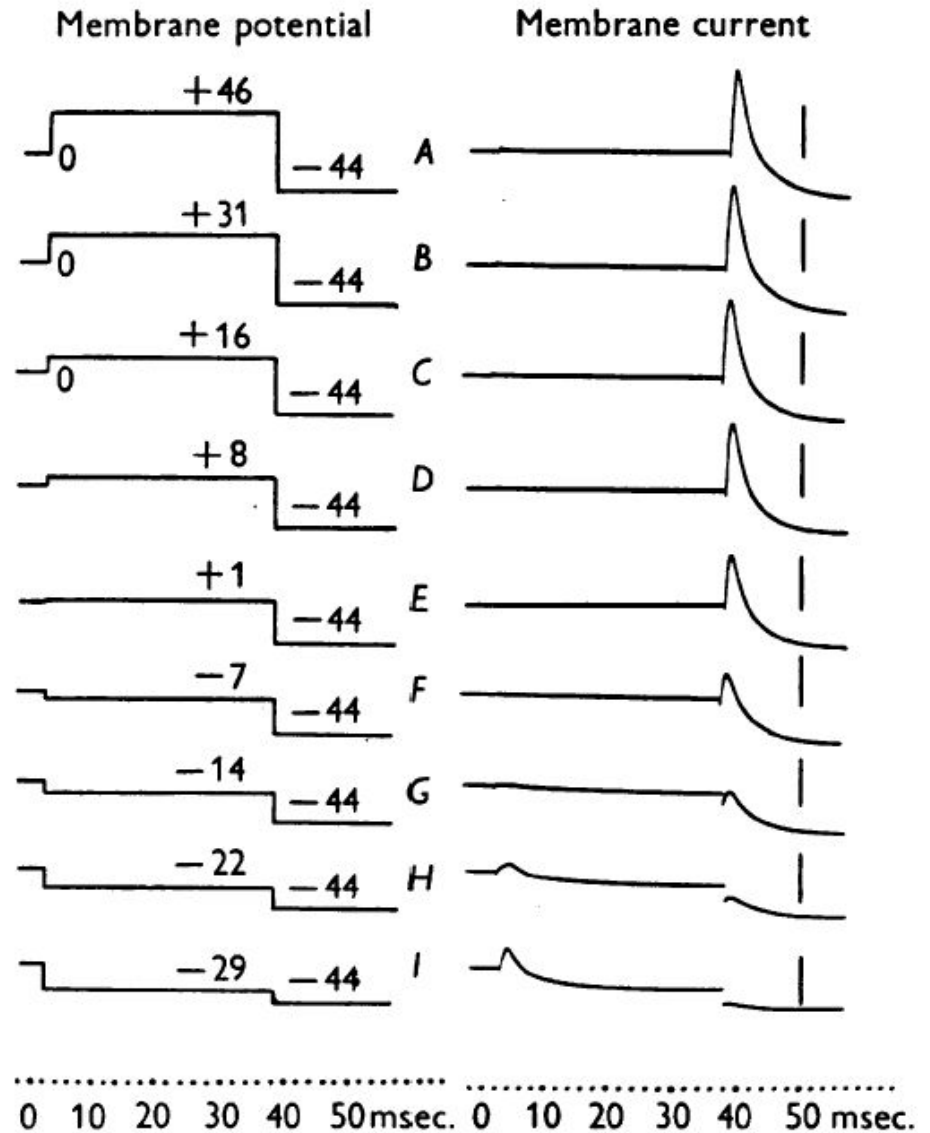


$$g_{Na} = I_{Na} (V - V_{Na})$$



Инактивация натриевой проводимости

$$g_{Na} = I_{Na} (V - V_{Na})$$



Активация и инактивация натриевой проводимости

Curve	V (mV)	g'_{Na} (m.mho/cm ²)	m_{∞}	h_{∞}
—	($-\infty$)	(42.9)	(1.00)	—
A	-109	40.3	0.980	(0)
B	-100	42.6	0.997	(0)
C	-88	46.8	1.029	(0)
D	-76	39.5	0.975	(0)
E	-63	38.2	0.963	(0)
F	-51	30.7	0.895	(0)
G	-38	20.0	0.778	(0)
H	-32	15.3	0.709	(0)
I	-26	7.90	0.569	(0.029)
J	-19	1.44	0.323	(0.069)
K	-10	0.13	0.145	(0.263)
L	-6	0.046	0.103	(0.388)
—	(0)	(0.0033)	(0.042)	(0.608)

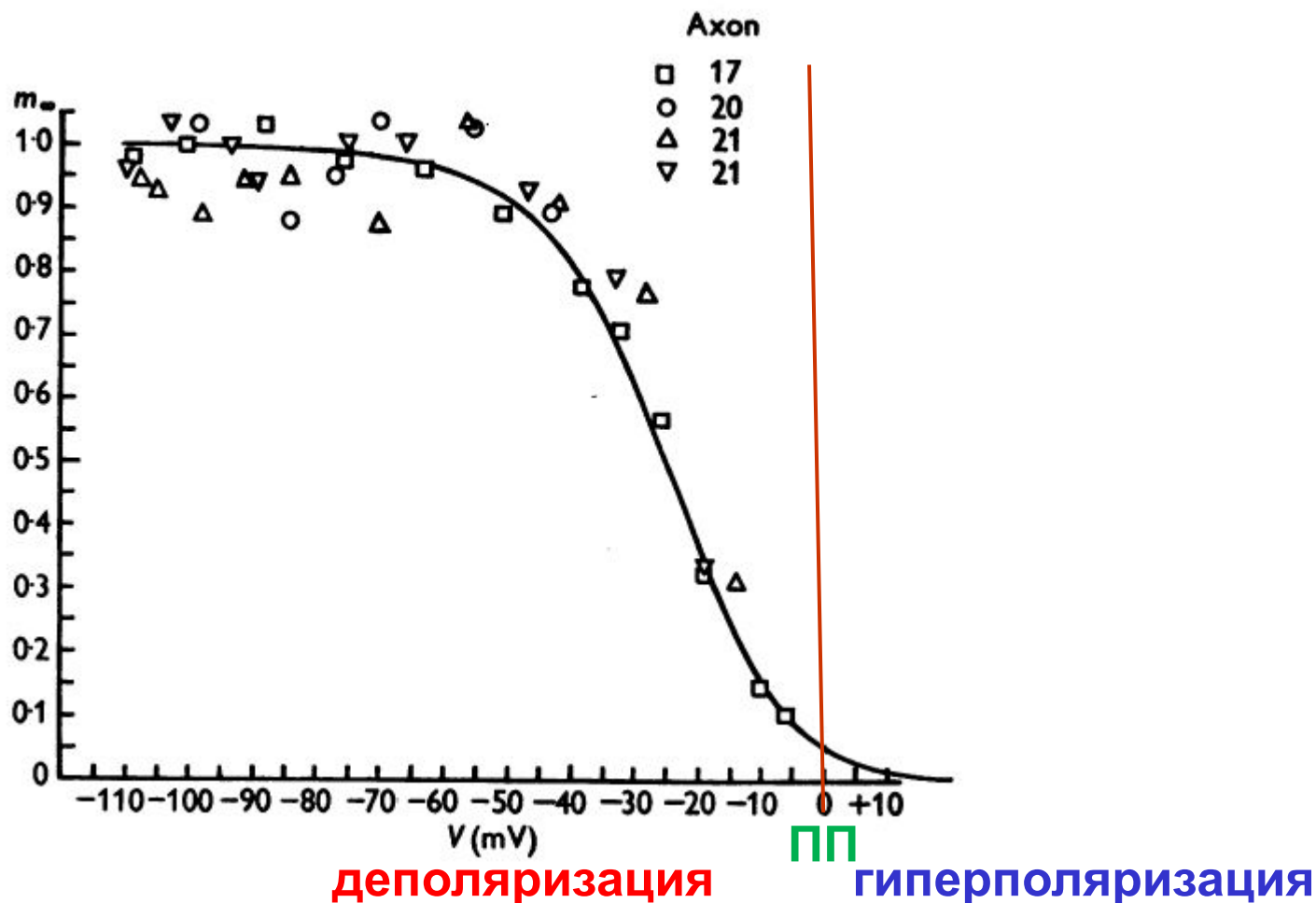
$$m = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) \exp(-t/\tau_m),$$

$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) \exp(-t/\tau_h),$$

$$g_{Na} = m^3 h \bar{g}_{Na}$$

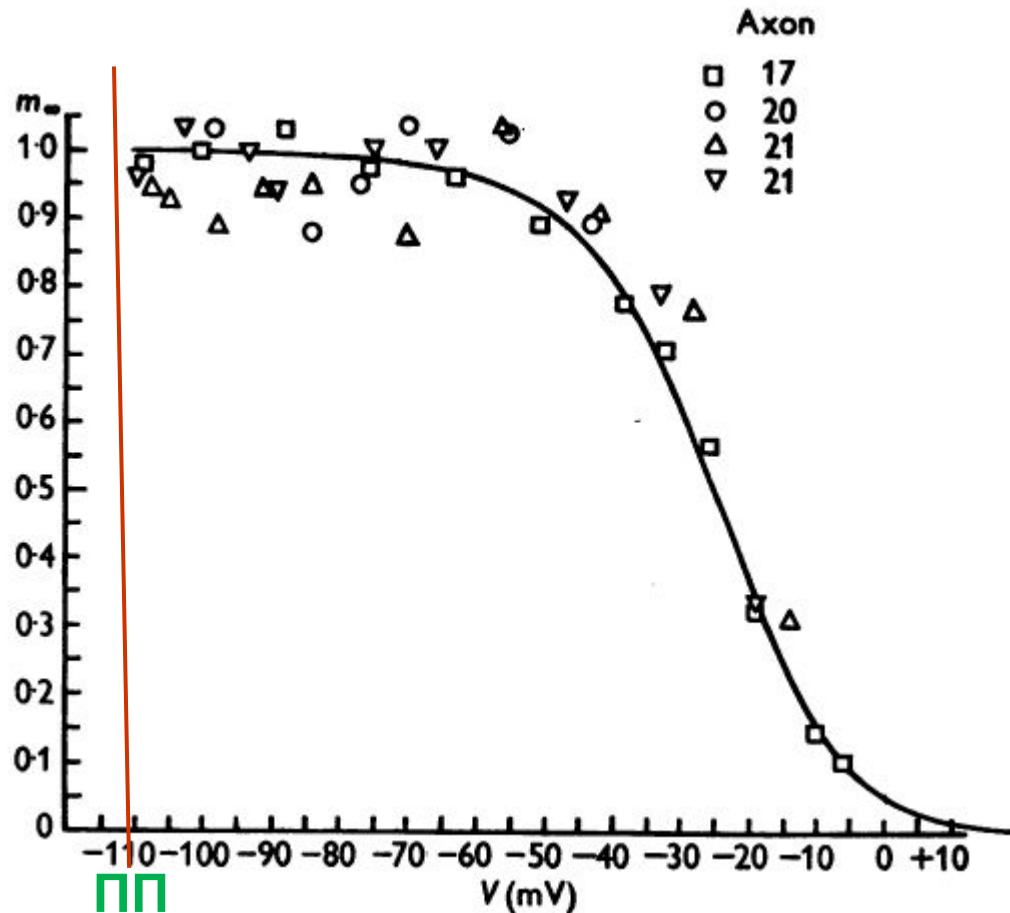
Кривая активации натриевой проводимости

Зависимость величины m_{∞} от потенциала



Кривая активации натриевой проводимости

Зависимость величины m_{∞} от потенциала

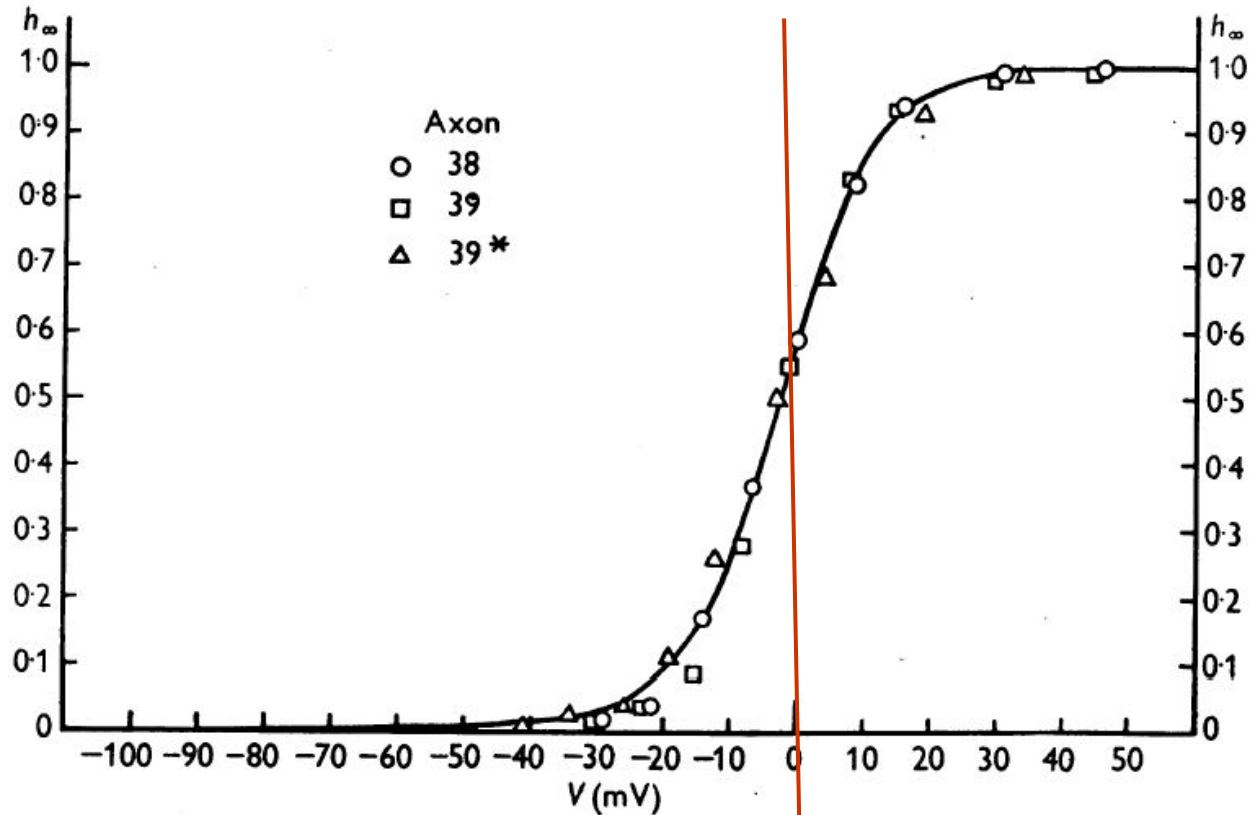


гиперполяризация

деполяризация

Кривая инактивации натриевой проводимости

Зависимость величины h_{∞} от потенциала



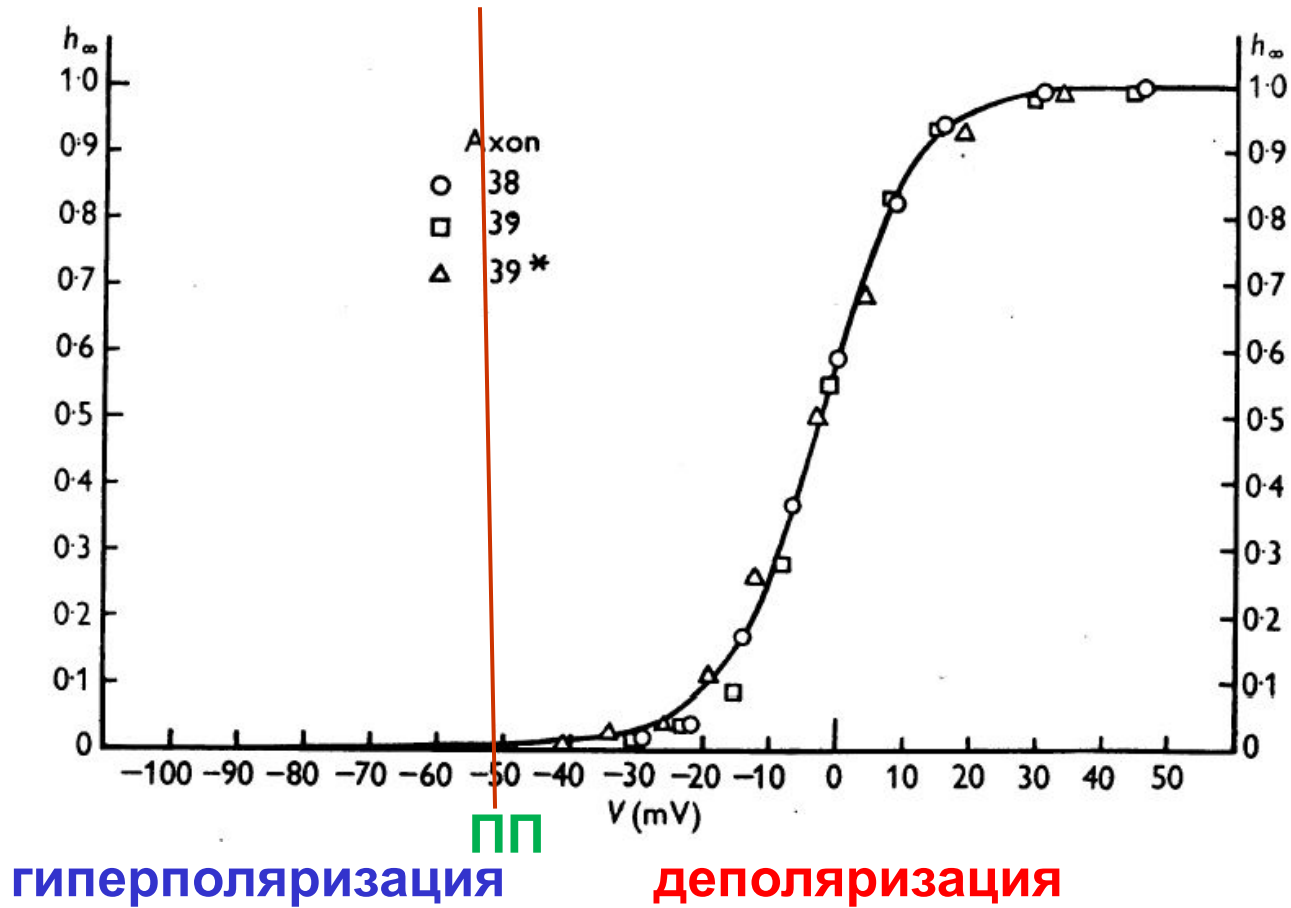
деполяризация

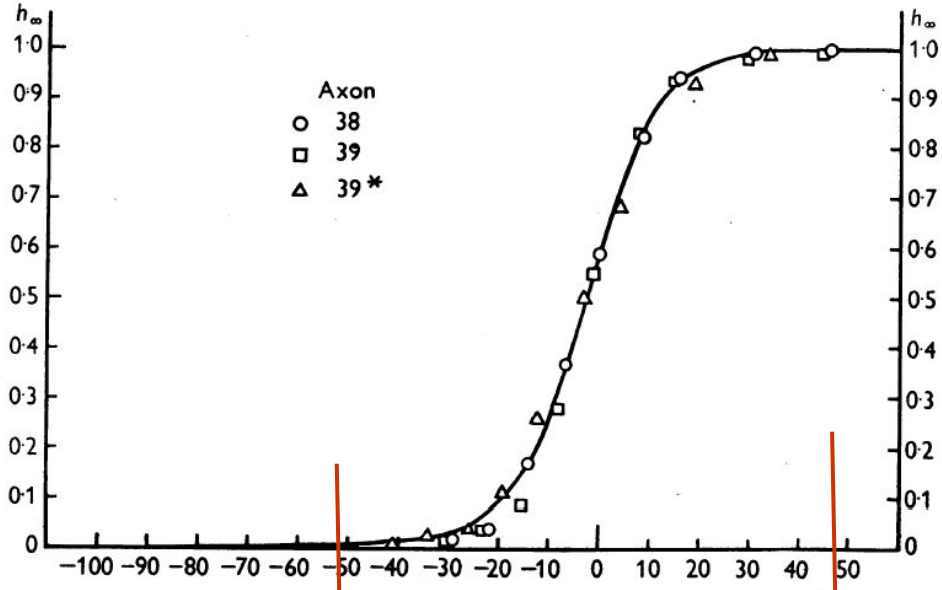
пп

гиперполяризация

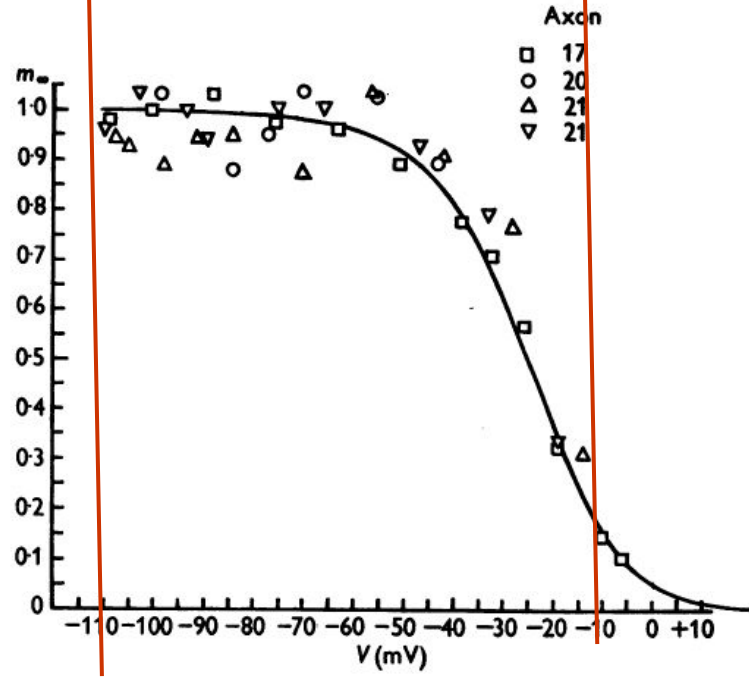
Кривая инактивации натриевой проводимости

Зависимость величины h_{∞} от потенциала





Активация



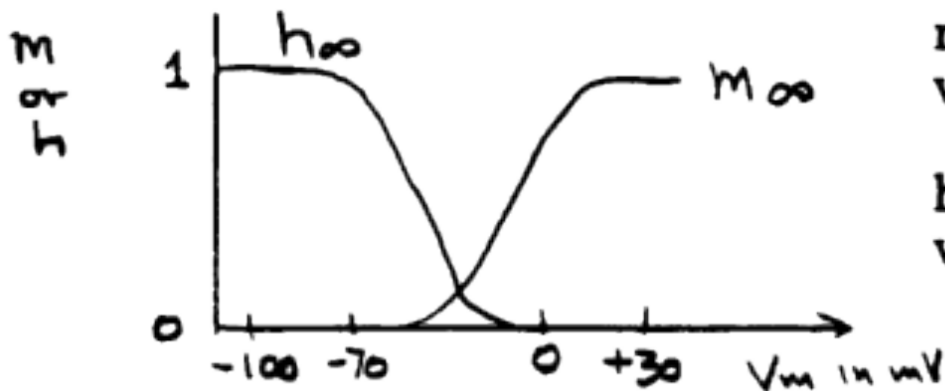
Инактивация

Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

- Для Na^+ -проводимости А. Ходжкин и А. Хаксли ввели переменные m и h , которые отражают зависимость проводимости Na^+ от времени и потенциала. Они использовали уравнение:
- $g_{\text{Na}} = m^3 h^* G_{\text{Na}}$
- В уравнении G_{Na} - максимальная проводимость для Na^+ , когда все Na^+ -каналы открыты и способны пропускать ионы.
- Значения переменных m и h изменяются между «0» и «1» как функция от времени и потенциала.
- Произведение $m^3 h$ представляет долю от максимальной Na^+ -проводимости в данный момент времени.

Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

- Сначала они исследовали зависимость величин m и h от потенциала, зафиксированного на мембране в течение долгого времени.

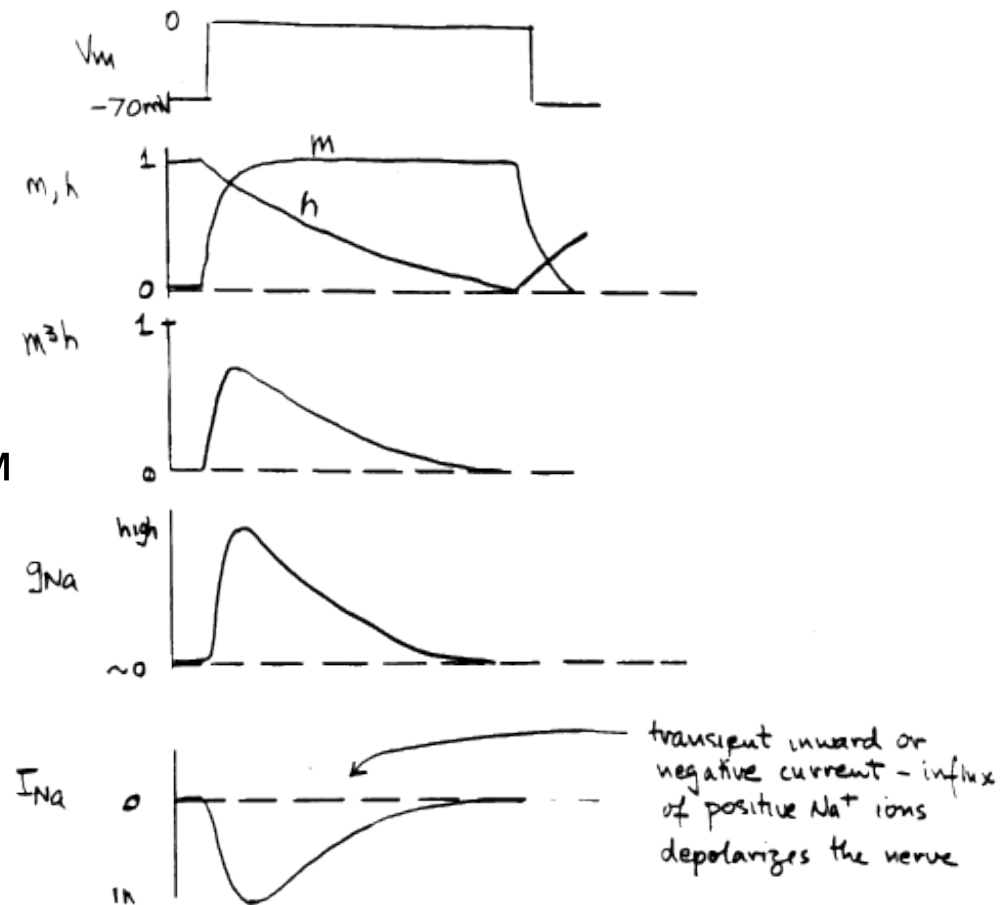


m_∞ = value of m reached at each voltage after long time

h_∞ = value of h reached at each voltage after long time

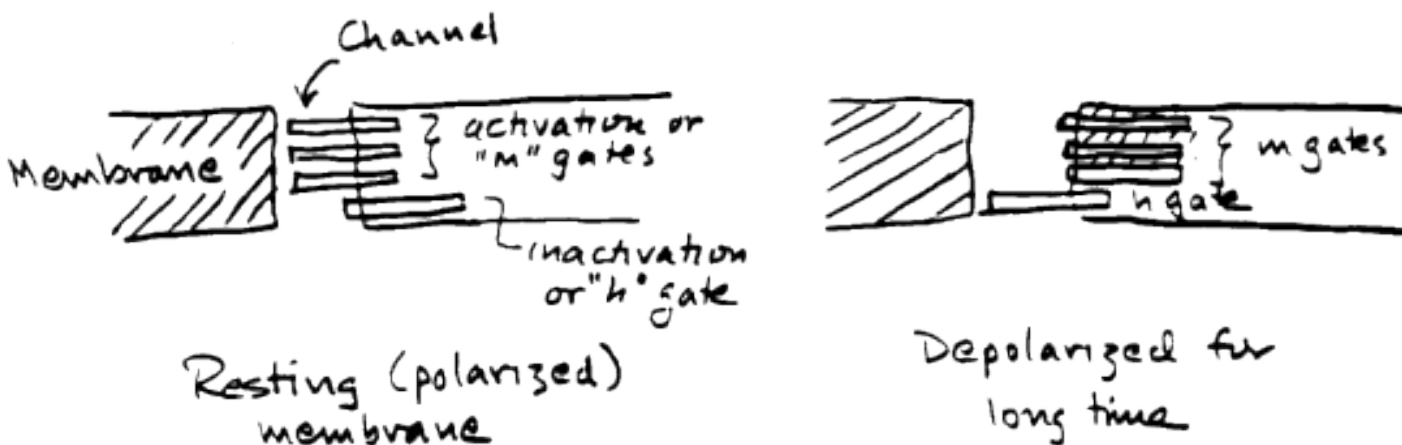
Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

- Затем они описали зависимость величин m и h от времени.
- В клетке в течение долгого времени поддерживали потенциал на некотором постоянном уровне.
- Затем уровень потенциала смещали ступенчатым образом и фиксировали на некотором другом уровне.
- При этом величины m и h переходили на другой стабильный уровень.



Инактивация натриевой проводимости мембраны (продолжение)

- **А. Ходжкин** и **А. Хаксли** предложили простую умозрительную физическую модель, которая в некоторой степени могла бы отражать реальность. Такая модель помогает продемонстрировать, как входящий Na^+ -ток зависит от времени и потенциала.
- Na^+ -ток изменялся таким образом, что если бы он имел двое ворот, т.е. два механизма, управляющих проводимостью. «**Активационные**» ворота быстро открываются, когда клетка деполяризована до порогового уровня их активации. «**Инактивационные**» ворота медленно закрываются, когда клетка деполяризована выше порога их активации.
- Допустим, что каждый Na^+ -канал имеет 3 активационных (m) и 1 инактивационные (h) ворота.

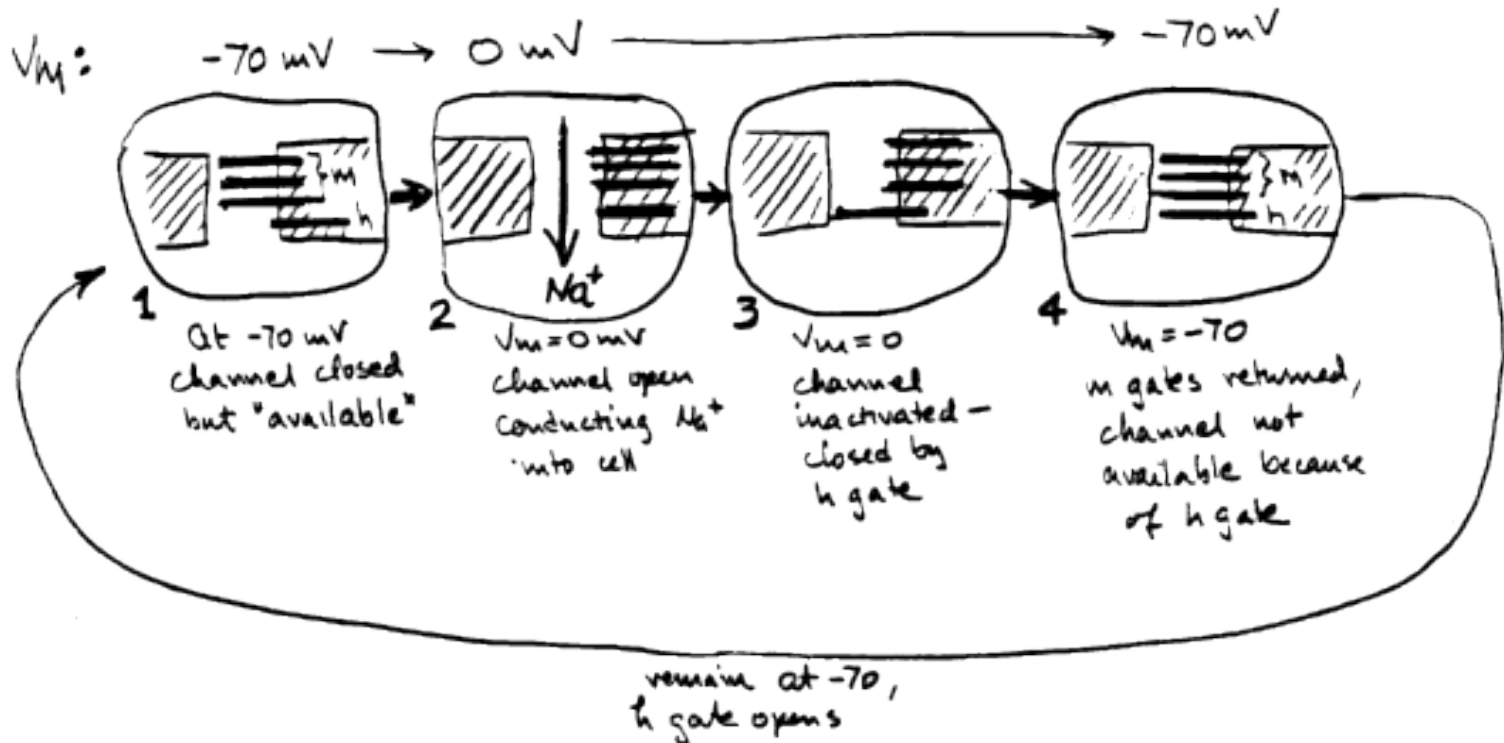


Инактивация натриевой проводимости мембраны (продолжение)

- Для отдельного канала переменная m отражает вероятность того, что одни m -ворота находятся в открытом состоянии. m^3 – вероятность того, что все трое m -ворот открыты.
- Для отдельного канала переменная h отражает вероятность того, что h -ворота находятся в открытом состоянии.
- Произведение m^3h отражает вероятность того, что все ворота (m и h) открыты, и канал может пропускать ионы.
- Проводимость Na^+ -канала описывается уравнением:
- $g_{\text{Na}} = m^3h * G_{\text{Na}}$
- g_{Na} отражает долю от общего числа потенциально открытых каналов (G_{Na}).

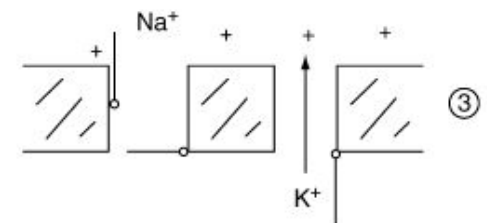
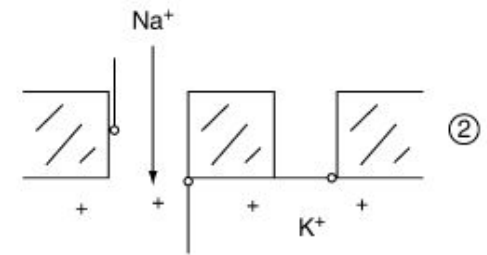
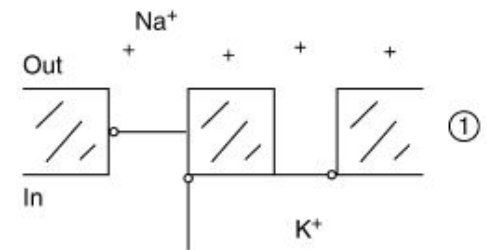
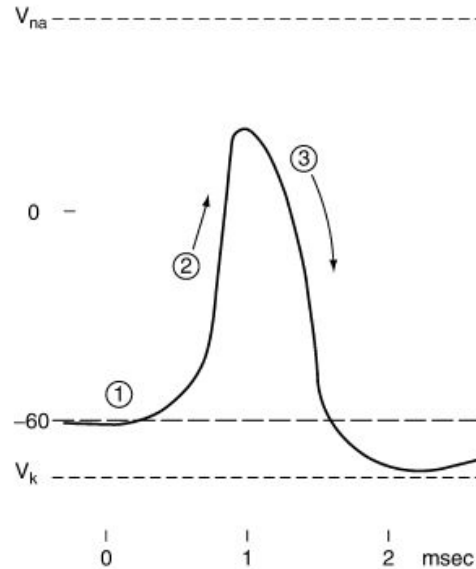
Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

- Схема чередования различных возможных состояний m и h -ворот во время разных фаз генерации ПД (цикл **А. Ходжкина**):



Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

- Фазы генерации ПД.
Числами отмечены фазы ПД: 1 – ПП, 2 – восходящая, 3 нисходящая фазы ПД.
- V_{na} и V_k - равновесные потенциалы для соответствующих ионов.



- Схематическое отображение цикла **А. Ходжкина**. Состояние активационных (для Na^+ и K^+) и инактивационных (для Na^+) ворот во время различных фаз генерации ПД. Числами отмечены фазы ПД.

Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

Схематическое отображение цикла **А. Ходжкина**. Состояние активационных (для Na^+ и K^+) и инактивационных (для Na^+) ворот во время различных фаз генерации ПД. Числами отмечены фазы ПД (1 - А, 2 - Б, 3 - В).

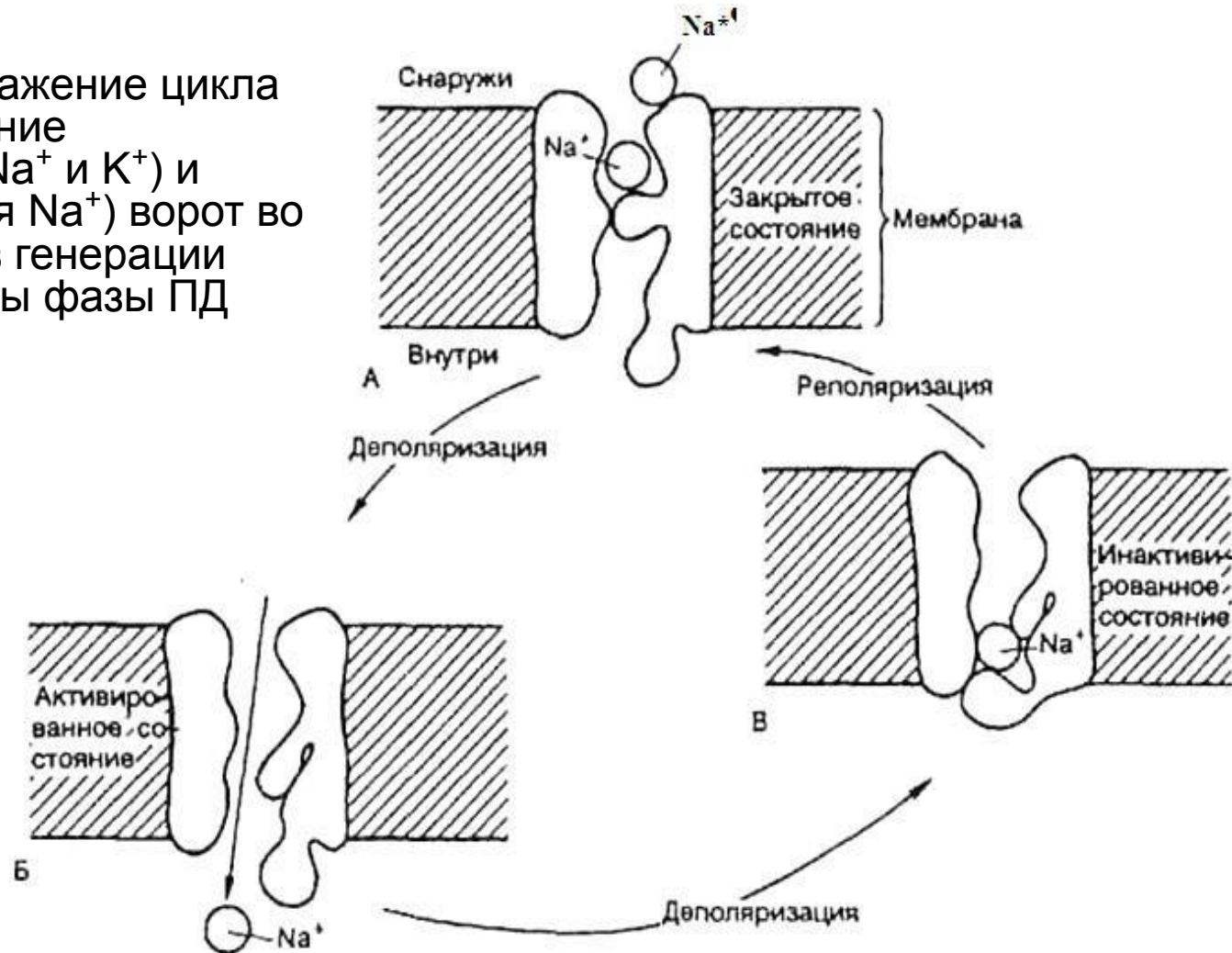
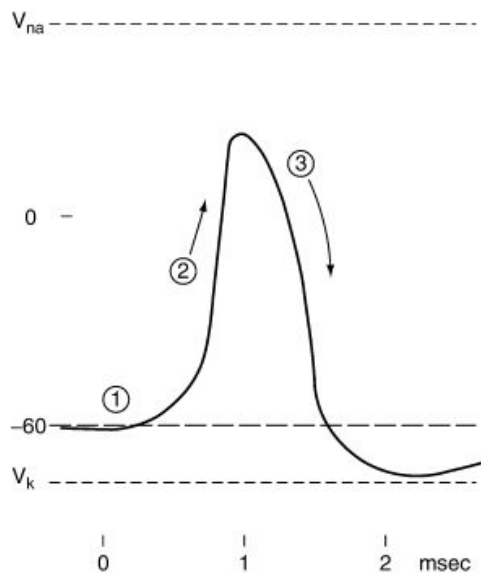
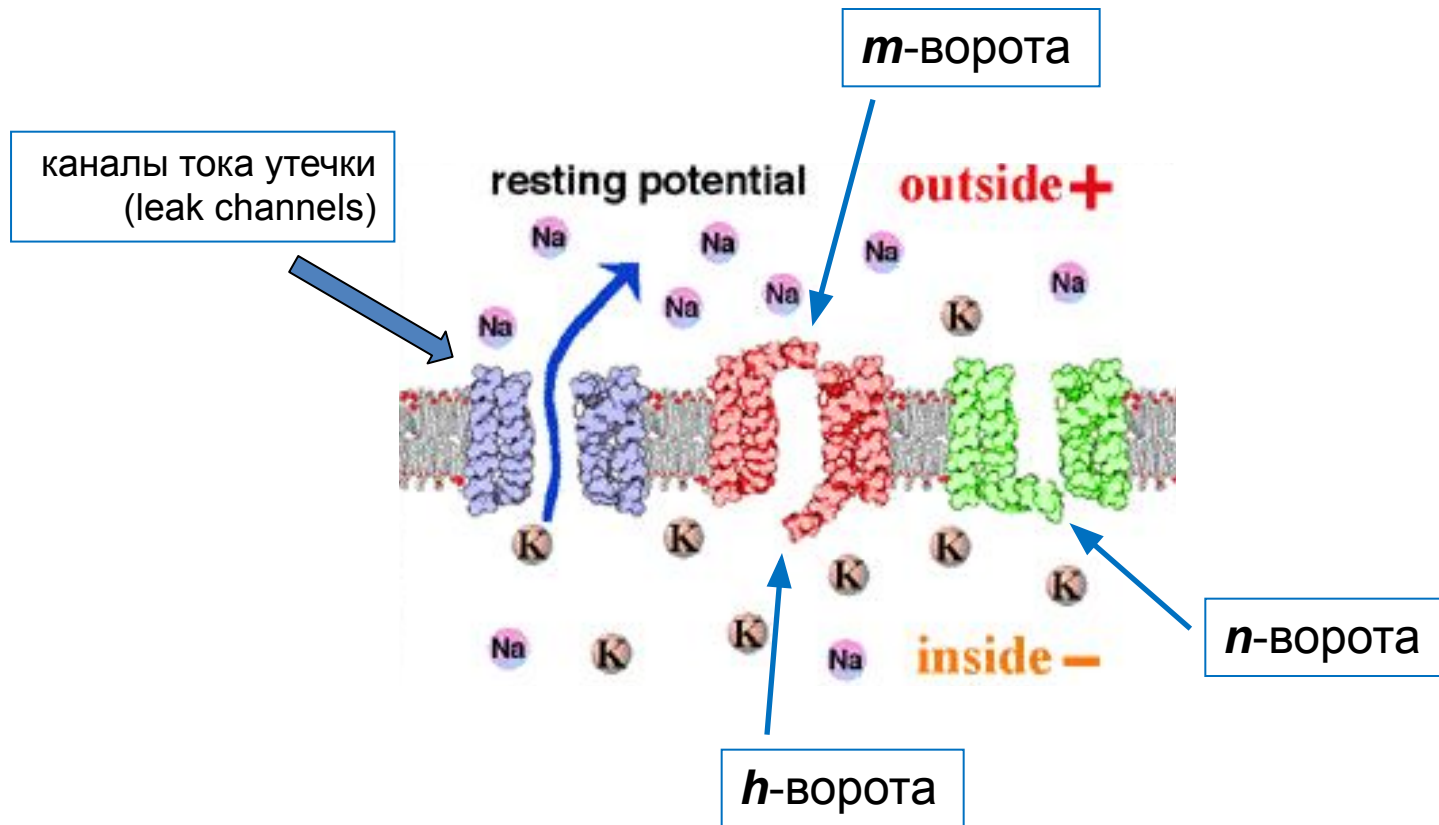


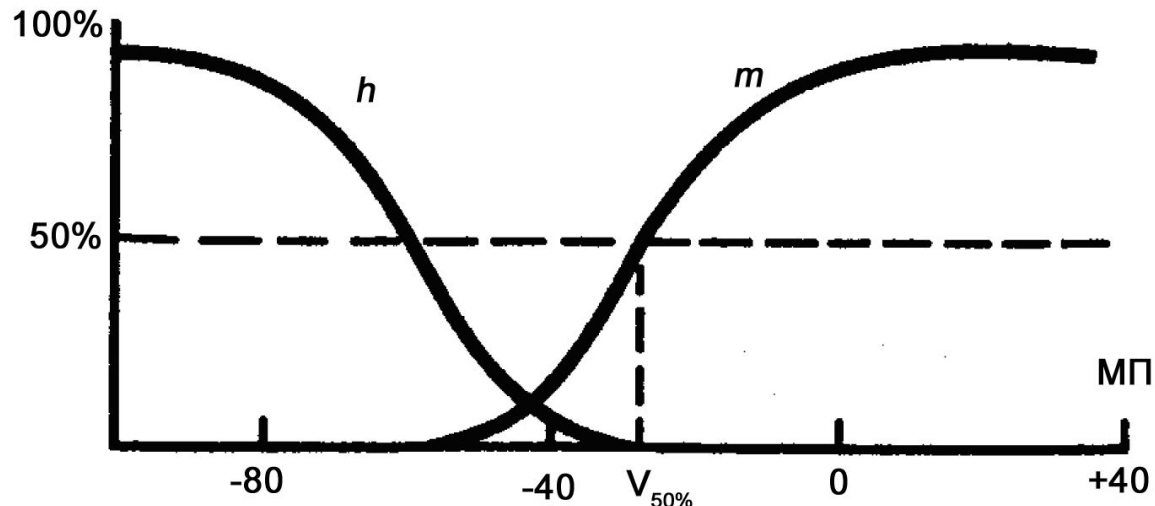
Схема чередования различных возможных состояний m , h и n -ворот во время разных фаз генерации ПД (цикл **А. Ходжкина**)



Активация и инактивация натриевой проводимости мембраны

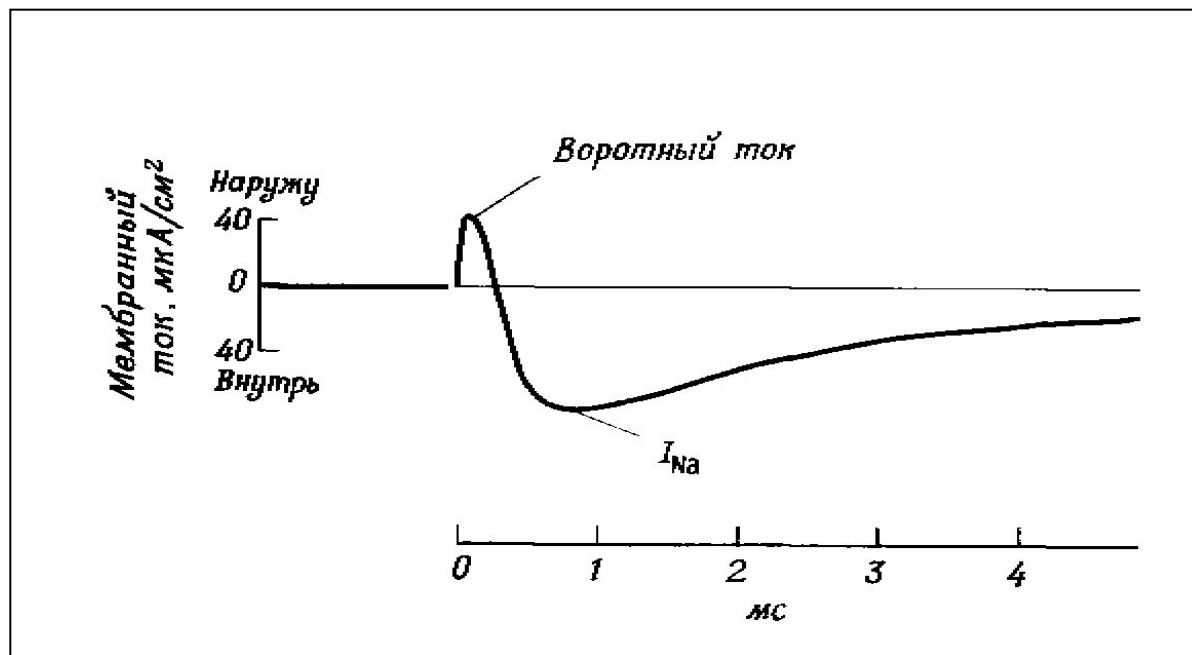
Зависимость состояния m - и h -ворот потенциал-зависимых Na^+ -каналов от мембранного потенциала (МП, мВ).

В цикле **А. Ходжкина** доли открытых m - и h -ворот реципрокно изменяются в зависимости от потенциала мембраны. При деполяризации примерно от -50 мВ и выше доля открытых m -ворот резко увеличивается, достигая уровня 50% при деполяризации около -26 мВ (отмечено пунктиром, $V_{50\%}$), однако в это время доля открытых инактивационных h -ворот уменьшается до 0. Модель объясняет кратковременный характер входящего Na^+ -тока.



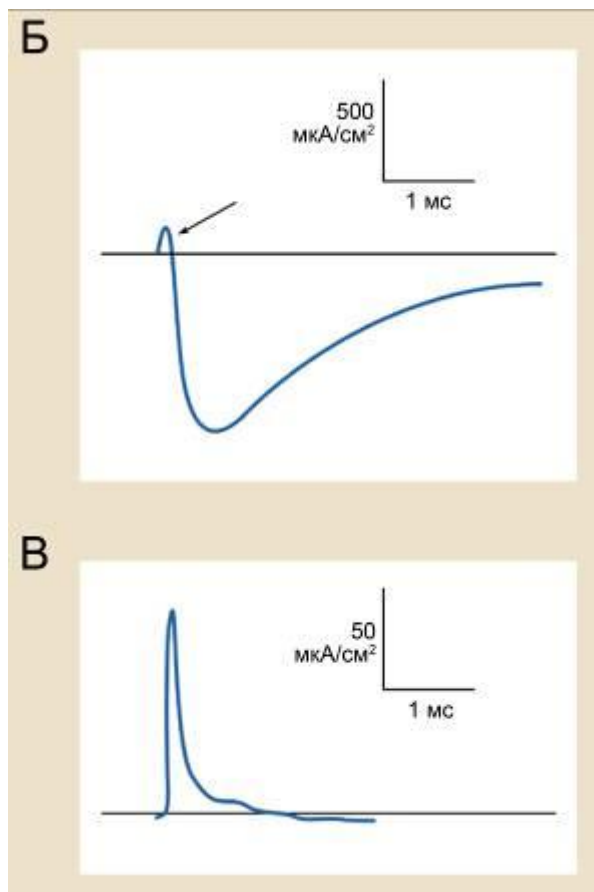
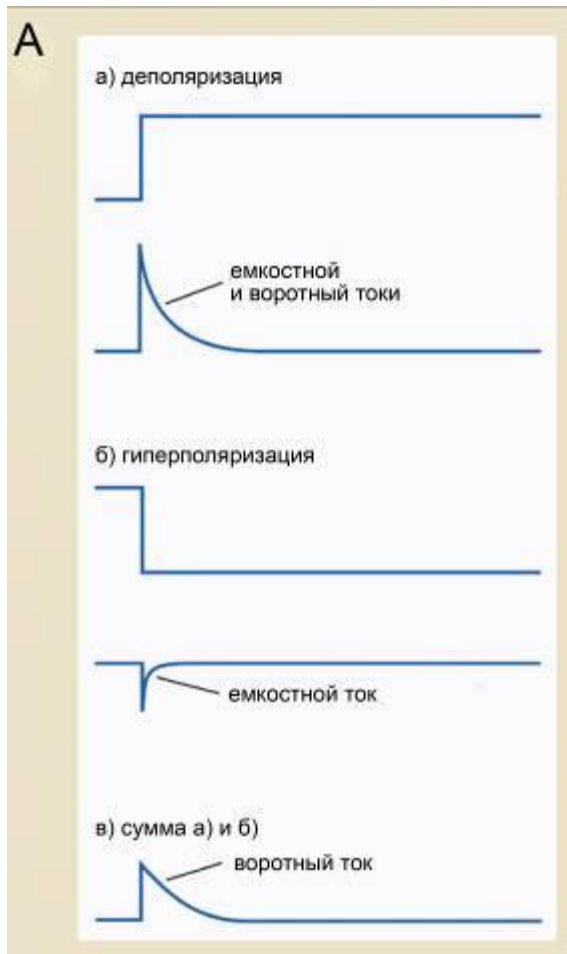
Воротные механизмы потенциал-зависимых Na^+ -каналов

А. Ходжкин и А. Хаксли предположили, что активация Na^+ -каналов связана с открытием специальных «ворот», представляющих собой заряженные частицы (диполи). Поворот диполя приводит к генерации воротного тока.



Асимметричный ток смещения

В условиях пониженной концентрации ионов Na^+ в ответ на **деполяризацию** регистрируется малый по амплитуде **выходящий ток**, отражающий заряд **мембранной емкости**. Однако, в ответ на **гиперполяризацию** этот емкостной ток меньше, чем в ответ на деполяризацию такой же амплитуды. Разность этих токов (**воротный ток**, или **асимметричный ток смещения**) соответствует перемещению зарядов, например, повороту **диполя**.

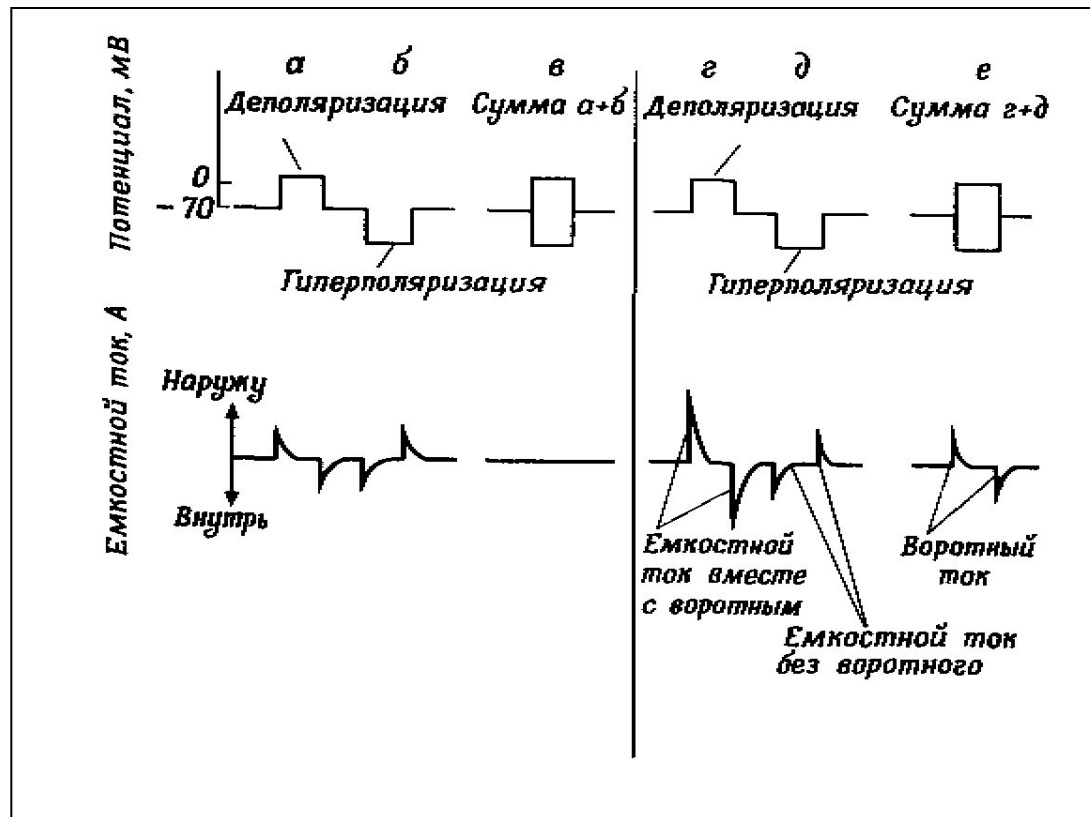


Воротный и Na^+ токи

+ ТТХ

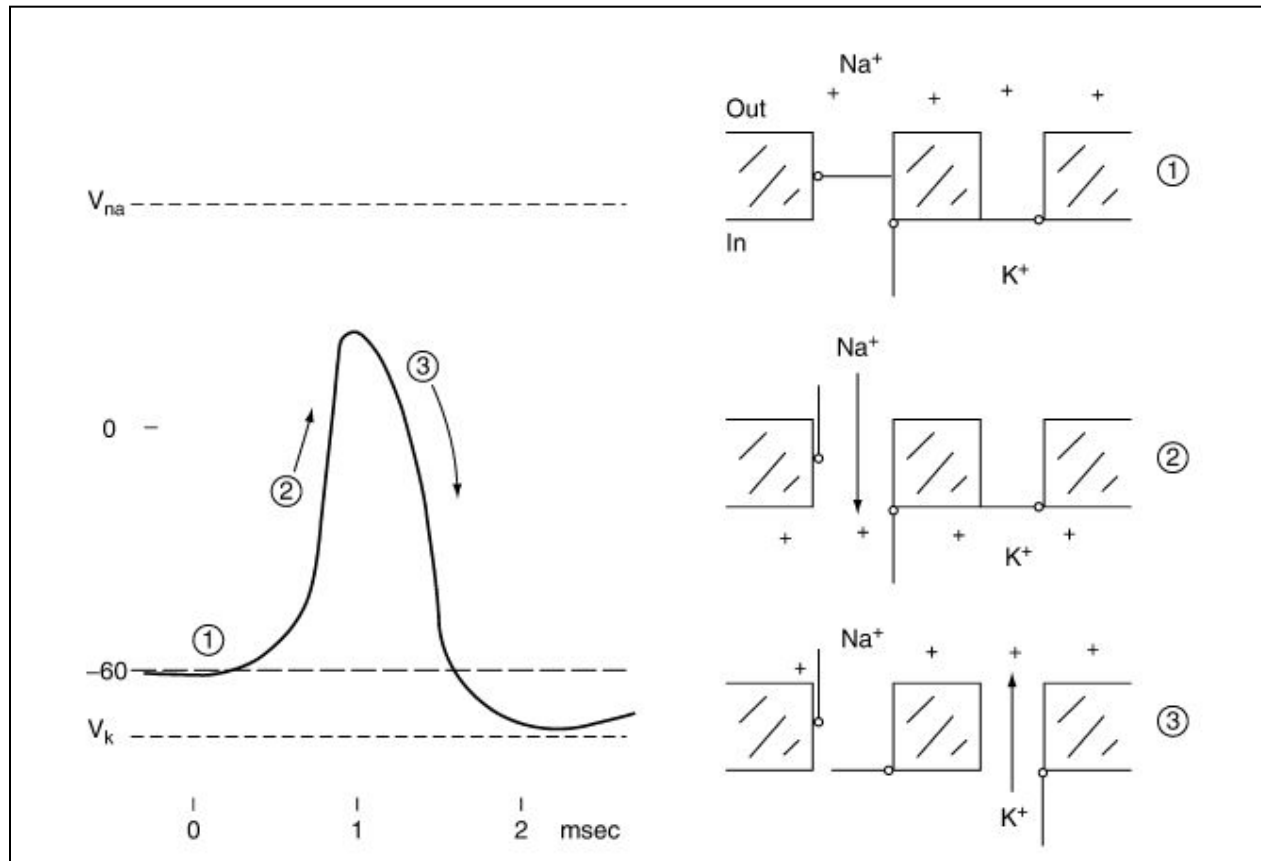
Асимметричный ток смещения

В условиях пониженной концентрации ионов Na^+ в ответ на **деполяризацию** регистрируется малый по амплитуде **выходящий ток**, отражающий заряд **мембранной емкости**. Однако, в ответ на **гиперполяризацию** этот емкостной ток меньше, чем в ответ на деполяризацию такой же амплитуды. Разность этих токов (**воротный ток**, или **асимметричный ток смещения**) соответствует перемещению зарядов, например, повороту **диполя**.



Асимметричный ток смещения

А. Ходжкин высказал предположение, что при деполяризации происходит поворот белковой воротной (**активационной**) частицы (**m**-ворота), и таким образом открывается ионный канал. При возрастании деполяризации в результате генерации ПД происходит поворот другой (**инактивационной**) частицы (**h**-ворота), и канал закрывается (**инактивируется**).



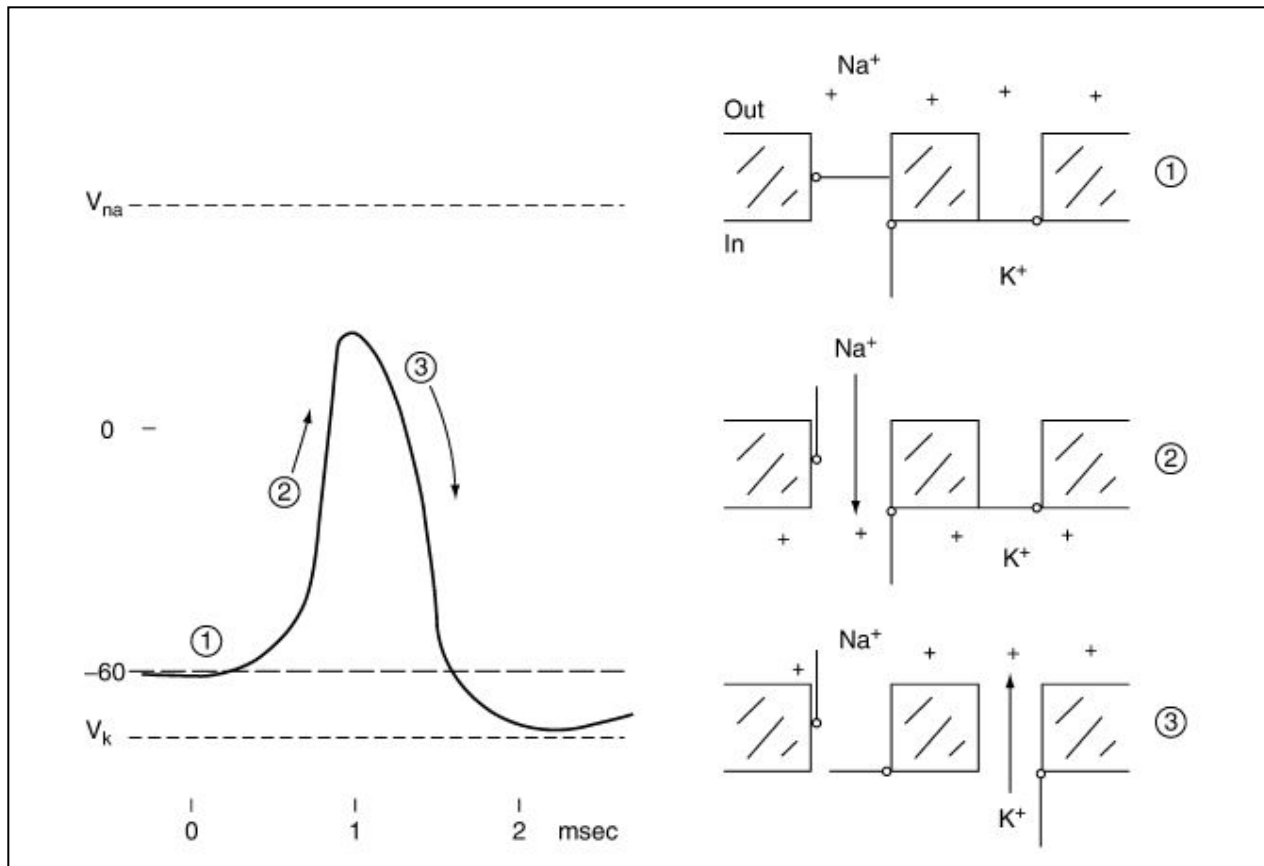
Основные состояния натриевых каналов (цикл Ходжкина)

В покое (деполяризована) канал не пропускает ионы Na^+ , поскольку мембрана m -ворот закрыта.

При деполяризации m -ворота (активационные), активируется (открывается) и канал, пропускающий ионы Na^+ .

При длительной деполяризации h -ворота (инактивационные), у внутренней стороны мембраны, и канал инактивируется (перестает пропускать ионы Na^+).

Реполаризация мембраны до уровня покоя вновь приводит к открытию h -ворот и закрытию m -ворот.

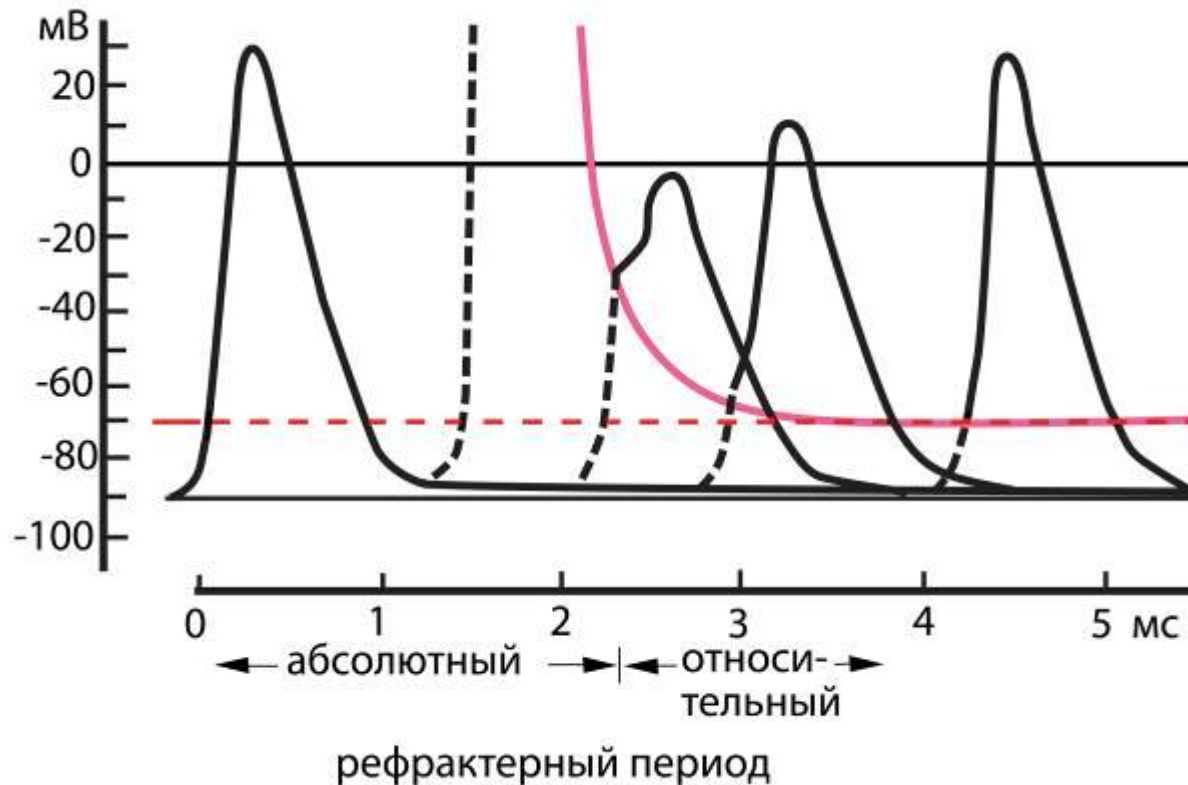


Фазы рефрактерности потенциала действия

Повторная стимуляция в период фазы **абсолютной рефрактерности** не вызывает генерации потенциала действия.

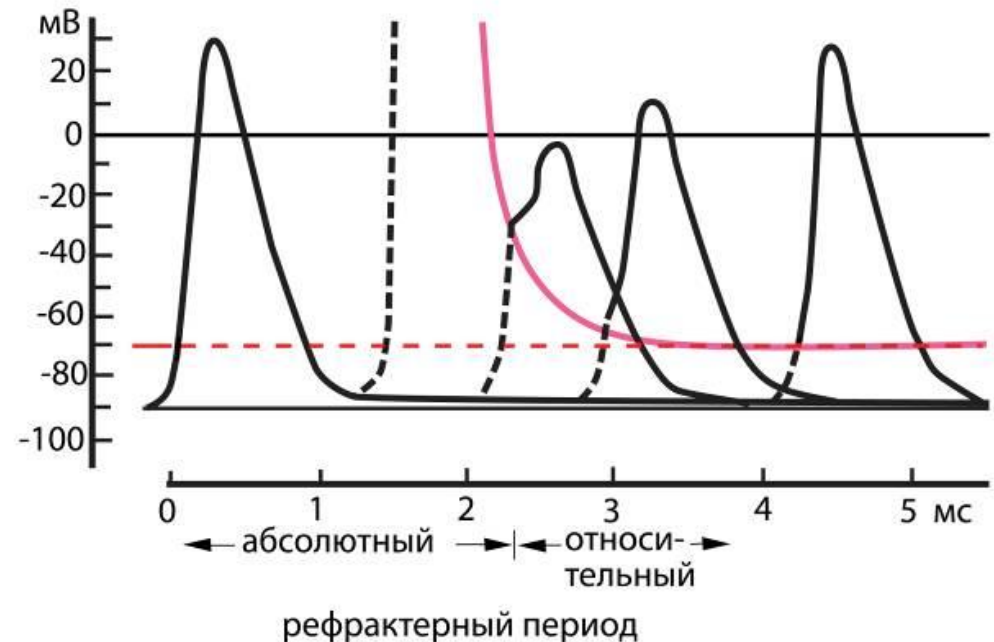
Красным обозначена **величина порога** активации мембраны.

Повторная стимуляция в период фазы **относительной рефрактерности** вызывает потенциал действия меньшей амплитуды.



Фазы рефрактерности потенциала действия

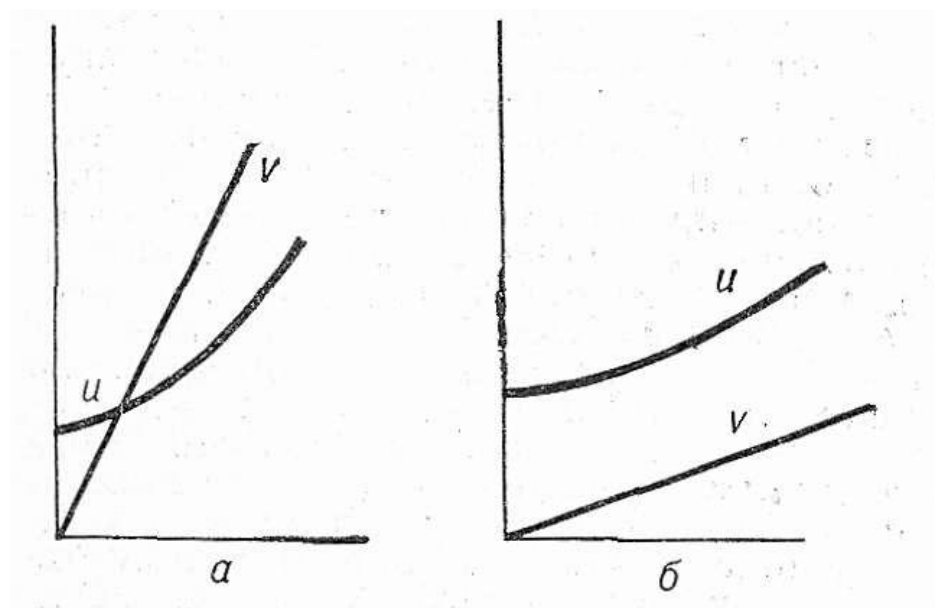
- Протеолитические ферменты (например, *проназа* или *папаин*), введенные внутриклеточно, ослабляют или даже устраняют Na^+ -инактивацию, что приводит к аномально продолжительной Na^+ -активации и, соответственно, к продолжительной деполяризации.
- Абсолютный рефракторный период ограничивает максимальную частоту генерации ПД в нейронах и волокнах, тем самым препятствуя нарушению ионного баланса между клеткой и внеклеточной средой.



Фазы рефрактерности потенциала действия

- Воздействие деполяризации мембраны на процессы активации и инактивации Na^+ -проводимости имеет важное физиологическое значение:
- 1) **Ограничивает частоту ПД.** Поскольку после развития ПД следует период абсолютной рефрактерности, существует некий минимальный временной интервал, по истечении которого может генерироваться следующий ПД. Следовательно, этот интервал ограничивает максимальную частоту ПД, генерируемых нейроном.
- 2) **Приводит к аккомодации.** Когда нервное волокно слабо деполяризуется медленно нарастающим потенциалом (в отличие от ступенчатой деполяризации), Na^+ -инактивация развивается параллельно с Na^+ -активацией. Такая постепенно нарастающая инактивация Na^+ -каналов препятствует генерации ПД вообще.
- 3) Имеет отношение к различным **клиническим проявлениям.** Например, процесс аккомодации вызывает нервный, мышечный и кишечный паралич, который обусловлен длительной деполяризацией (деполяризационный блок).

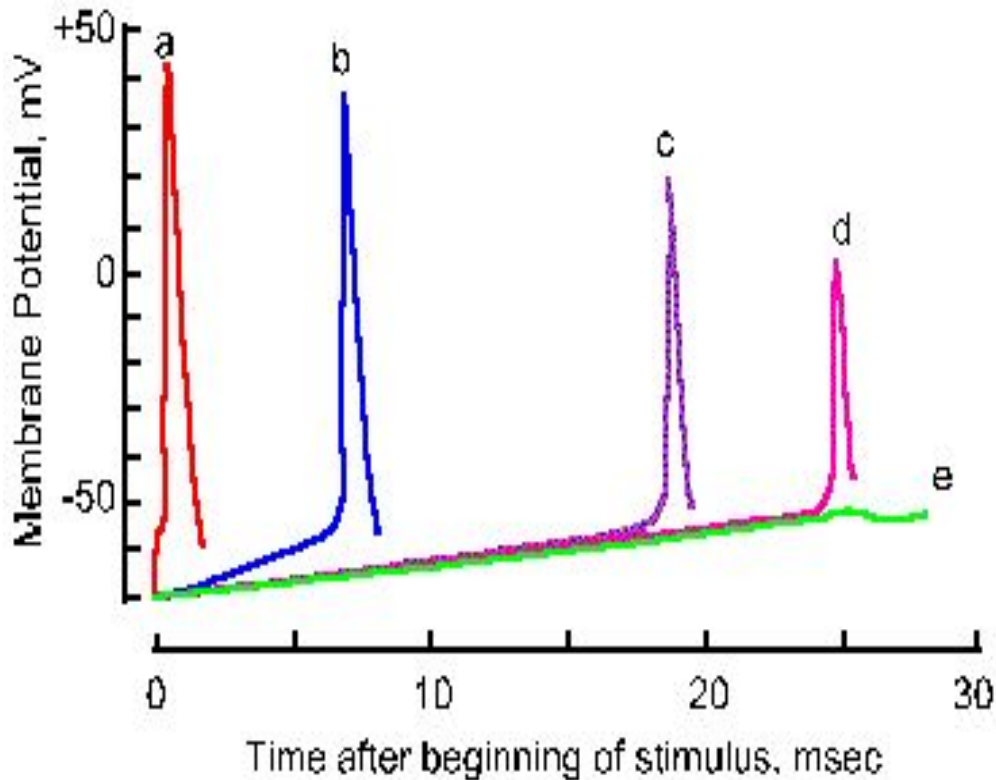
Механизм аккомодации



а – быстрое нарастание раздражающего стимула;
б – медленное нарастание раздражающего стимула;
v – потенциал; u – уровень порога

Если крутизна нарастания тока меньше некоторой **критической величины**, то возбуждение вообще не возникает, независимо от того, до какой величины доводится сила тока.

Механизм аккомодации



Accommodation of the nerve membrane. Five superimposed traces show the membrane response to linearly varying electrical stimuli with rates of rise decreasing from a to e. Note that the critical firing level changes from a 21-mV hypopolarization in a to a 28-mV hypopolarization in d, and no spike occurs in e. Note also that the amplitude of the spike falls with decreasing rate of rise (Frankenhaeuser and Vallbo, *Acta Physiol Scand* 63:1-20, 1965)

В мембране перехвата Ранвье

!!! у млекопитающих (А) K^+ токи не регистрируются
у земноводных (В) K^+ токи регистрируются.

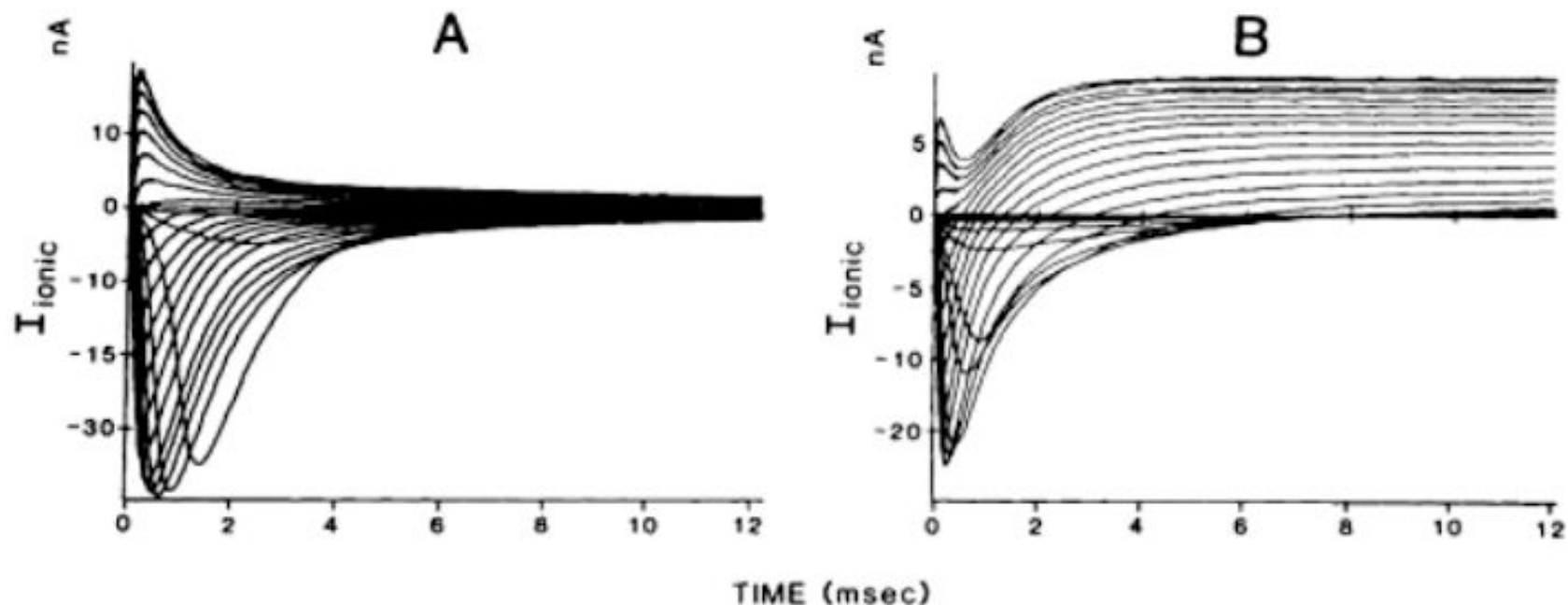
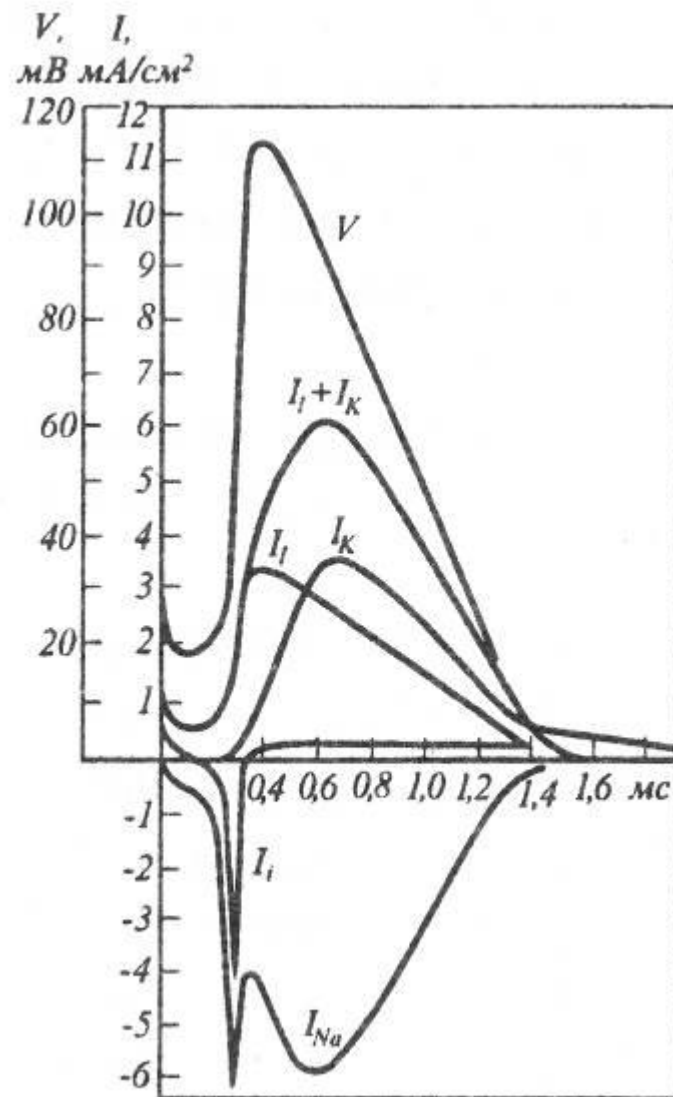
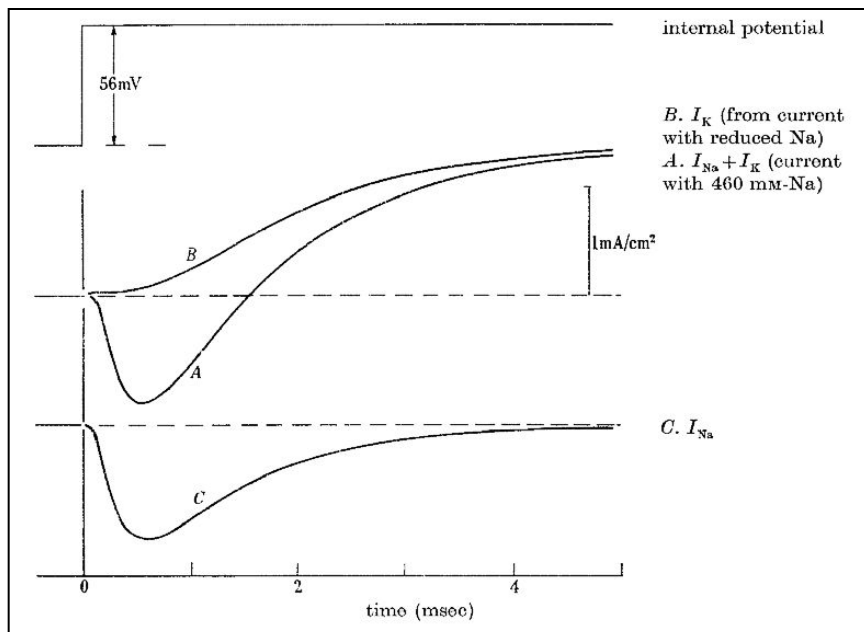


FIG. 7. Ionic currents: comparison of rabbit and frog myelinated nerve fibers (15°C). (A) Rabbit node of Ranvier. This family of 24 superimposed ionic current traces were elicited by application of 12-msec depolarizing test pulses ranging in size from 0 to 160 mv. A hyperpolarizing prepulse of -48 mV lasting for 40 msec preceded the test pulses. (B) Frog node of Ranvier. A family of ionic currents corresponding to those shown in (A). Although early inward transient Na^+ currents are similar for frog and rabbit, the delayed outward K^+ currents present in the frog node are not seen in rabbit node. For both records, fibers had cut ends bathed in isotonic KCl and currents were recorded through a low-pass filter digitized every $10 \mu\text{sec}$. Passive leak and capacity currents have been subtracted.

Ионные токи во время генерации ПД в мембране миелинизированного волокна (перехвата Ранвье)

В мембране перехвата Ранвье миелинизированного волокна кроме «классических» Na^+ и K^+ -токов выявлен значительный по величине ток «утечки», обеспечивающий K^+ -ток в покое.

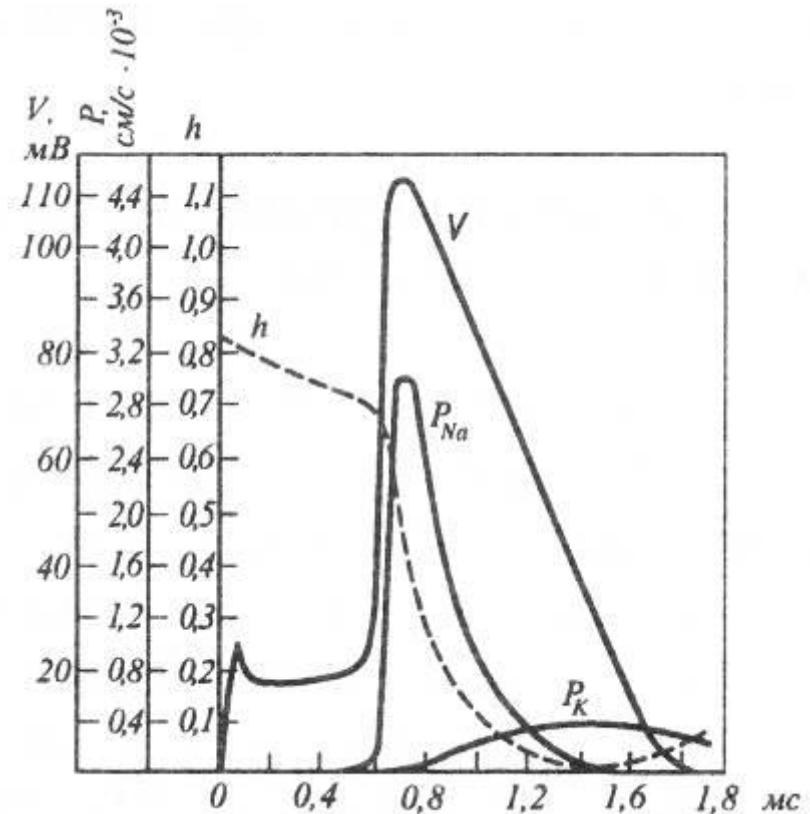
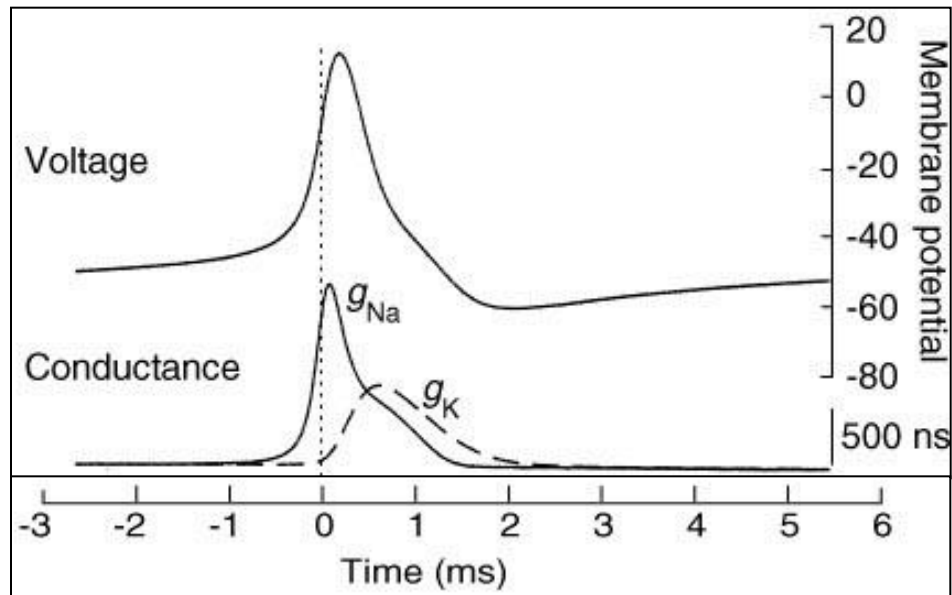
Для сравнения приведены токи мембраны аксона кальмара.



Проводимость во время генерации ПД в мембране миелинизированного волокна (перехвата Ранвье)

В мембране перехвата Ранвье миелинизированного волокна проводимость для K^+ значительно меньше, чем в аксоне кальмара, и значительный вклад в реполяризацию обеспечивает ток «утечки».

Для сравнения приведены проводимости ионов в мембране аксона кальмара.



Генерация ПД в нейронах

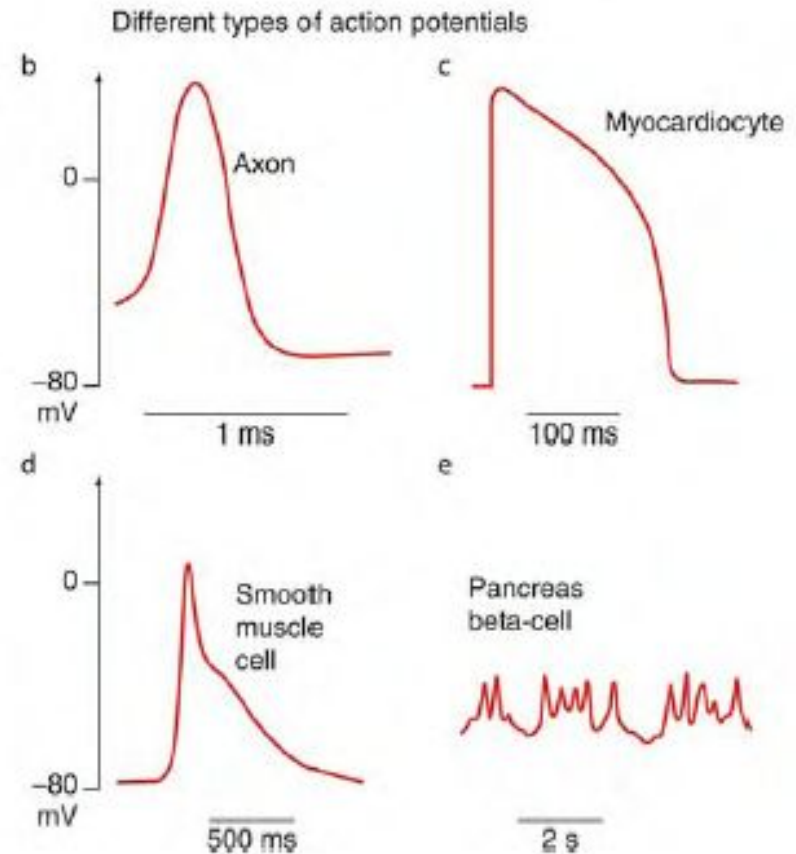
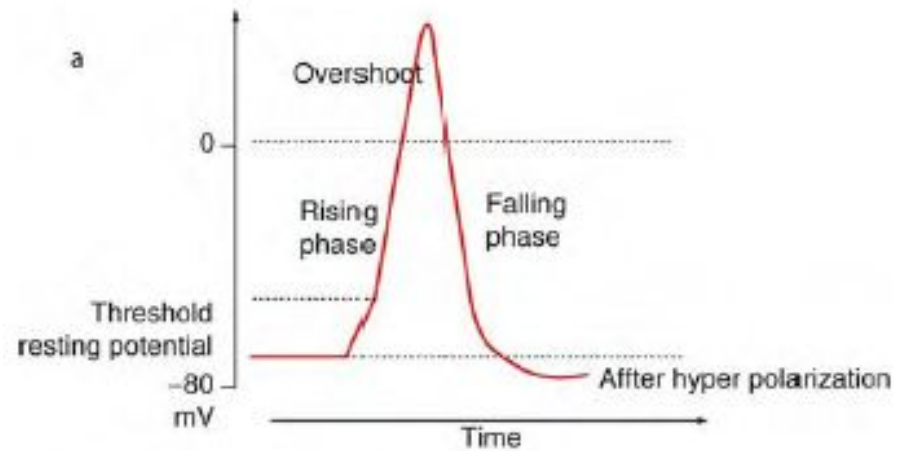
- **Аксоны** представляют собой относительно простое мембранное образование, обеспечивающее проведение ПД по нервному волокну, и для выполнения этой функции двух основных проводимостей (Na^+ и K^+) вполне достаточно.
- **Нейроны** выполняют в значительной степени больше разнообразных функций, связанных с обработкой нервных сигналов, и поэтому характеризуются сложной конфигурацией ионных каналов, обеспечивающих им *избыточные* вариации импульсной активности.

В мембранах нейронов кроме известных в мембранах аксонов

- потенциал-зависимых Na^+ - и K^+ -каналов найдены
 - потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы,
 - Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы,
 - каналы, активируемые гиперполяризацией,
 - ион-неселективные катионные токи
 - и некоторые другие.
-
- Разнообразные конфигурации ионных каналов в мембранах нейронов позволяют изменять форму ПД и паттерны импульсных разрядов. Такие модуляции импульсной активности, в частности, важны в пресинаптических аксонных терминалях, где через вход Ca^{2+} регулируется выброс медиатора.

- **Разнообразие форм ПД**

- а – схематичное представление ПД с его фазами развития.
- б – ПД гигантского аксона кальмара. Этот ПД примерно в 100 раз короче, чем ПД в клетках сердечной мышцы (с) или гладкой мускулатуры (д).
- Короткая восходящая фаза обеспечивается Na^+ -проводимостью, а продолжительная фаза деполяризации – Ca^{2+} -проводимостью.
- Бета-клетки поджелудочной железы также генерируют ПД (е), обусловленные Ca^{2+} -проводимостью, и тем самым запускают экзоцитоз инсулина.



Метод внутриклеточного диализа

Метод разработан в Институте физиологии АН УССР (г. Киев) в начале 1960-х г.г. под руководством академика АН СССР (РАН)

П.Г. Костюка (1924-2010).



Ann. Rev. Neurosci. 1982. 5:107-20
Copyright © 1982 by Annual Reviews Inc. All rights reserved

INTRACELLULAR PERFUSION

P. G. Kostyuk

Department of General Physiology of the Nervous System, A. A. Bogomoletz
Institute of Physiology, Kiev, Ukrainian SSR, 252601 GSP, USSR

INTRODUCTION

Intracellular perfusion is of great importance for effective elucidation of membrane mechanisms underlying cell excitability, since it allows the control and change at will of the physico-chemical conditions near the internal surface of the cell membrane. Until quite recently, application of this method was confined to squid giant axons, which are very suitable for mechanical extrusion of the axoplasm and for its replacement by an artificial saline solution of desirable composition (Oikawa et al 1961, Baker et al 1962). Fundamental data dealing with the nature of excitability obtained from giant squid axons are well known. The search for methods of controlled substitution of intracellular medium applicable to a greater variety of cells, especially to nerve cells, has led to substantial discoveries about the mechanisms underlying the basic physiological processes occurring in cells.

PRINCIPLES OF INTRACELLULAR PERFUSION

A method for controlled substitution of the ionic composition of the nerve cell cytoplasm was first suggested by Krishtal & Pidoplichko (1975). Its main idea is to use isolated cells and to make a hole several tens of micrometers diameter in their surface membrane. The isolated cell is placed in saline solution corresponding to the extracellular medium, whereas the hole in the membrane is brought in contact with the solution representing the desirable intracellular ionic medium. The replacement of intracellular ions through the hole by ions of this solution can be completed in several tens of seconds. As a matter of fact, this process can be regarded as intracellular dialysis.

To perform this method successfully the following measures should be undertaken: (a) a reliable separation of the working part of the cell mem-

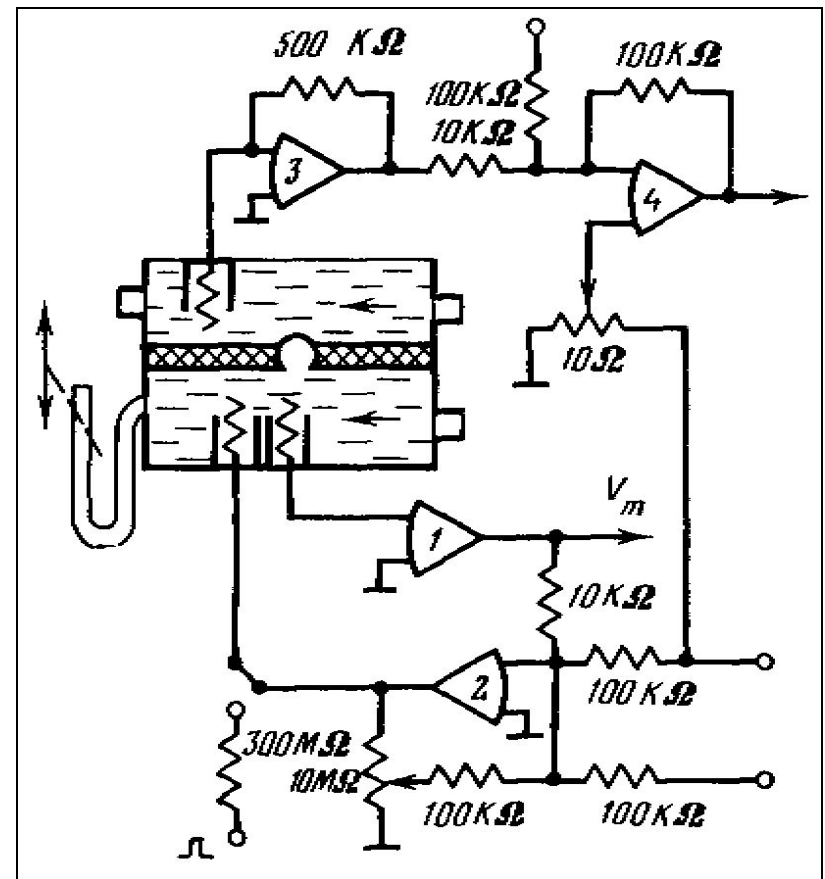
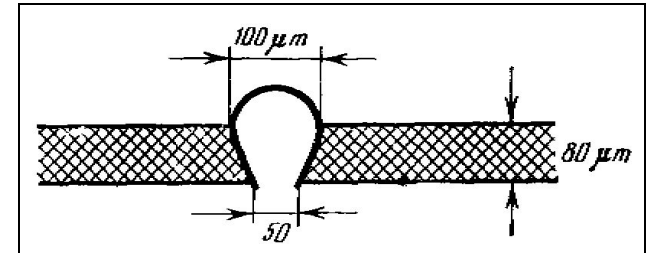
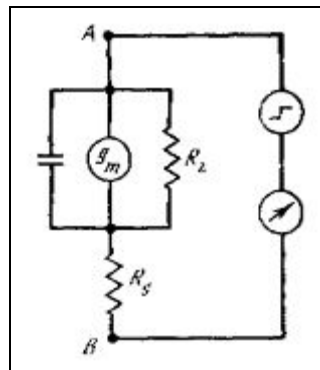
Метод внутриклеточного диализа

Метод разработан в [Институте физиологии АН УССР](#) в начале 60-х г.г. под руководством академика АН СССР [П.Г. Костюка](#).

Изолированная нервная клетка помещается в [пору](#), отсека с независимыми контурами перфузии.

Данная методика позволяет регистрировать электрические процессы на мембране, внутренняя и внешняя стороны которой находятся в контакте, соответственно, с вне- и внутриклеточными растворами.

Недостаток метода – большое последовательное сопротивление, создаваемое порой.



Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells

Nature Vol. 257 October 23 1975

P. G. KOSTYUK
O. A. KRISHTAL
V. I. PIDOPLICHKO

*Bogomoletz Institute of Physiology,
Ukrainian Academy of Sciences,
Kiev 24, 252601 GSP, USSR*

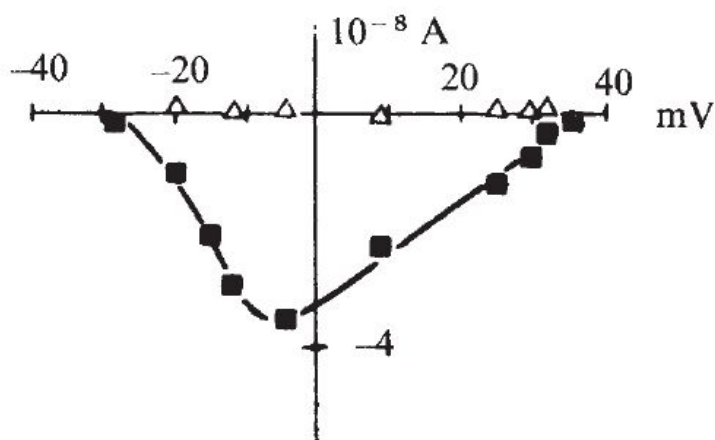
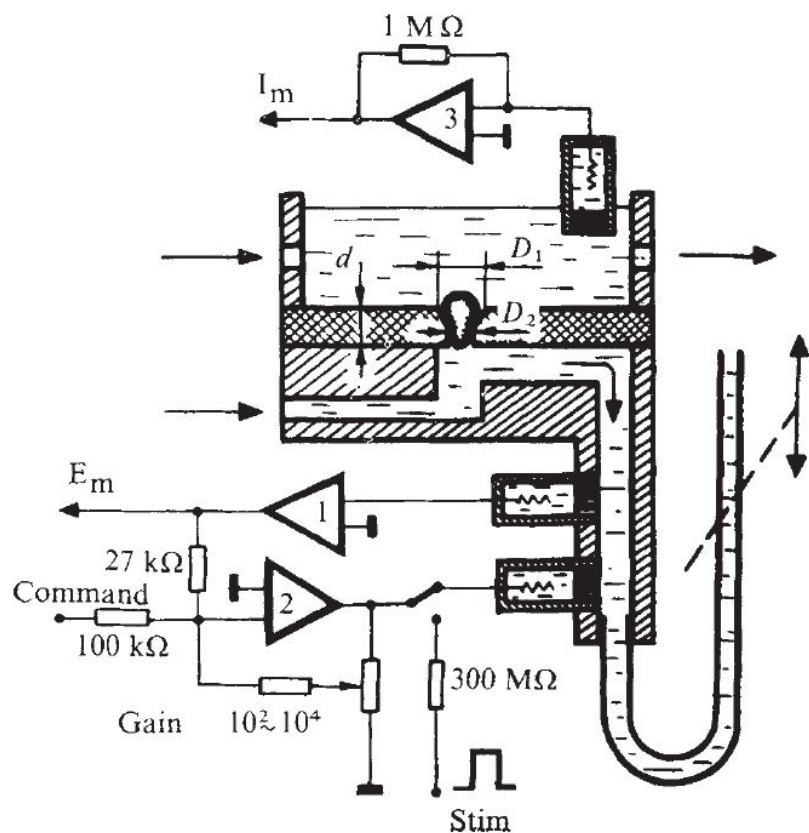


Fig. 4 Currents and $I-E$ relationship for the peak inward current in the cell containing fluoride anions. Lower compartment: 100 mM Tris-HF, pH 7.3, 20 mM sucrose. Upper compartment: normal Ringer (a, ■); Na-free solution (b, △). Leakage was compensated for. Holding potential was -40 mV. Calibrations: 3×10^{-8} A; 20 ms.

Метод внутриклеточного диализа

a.

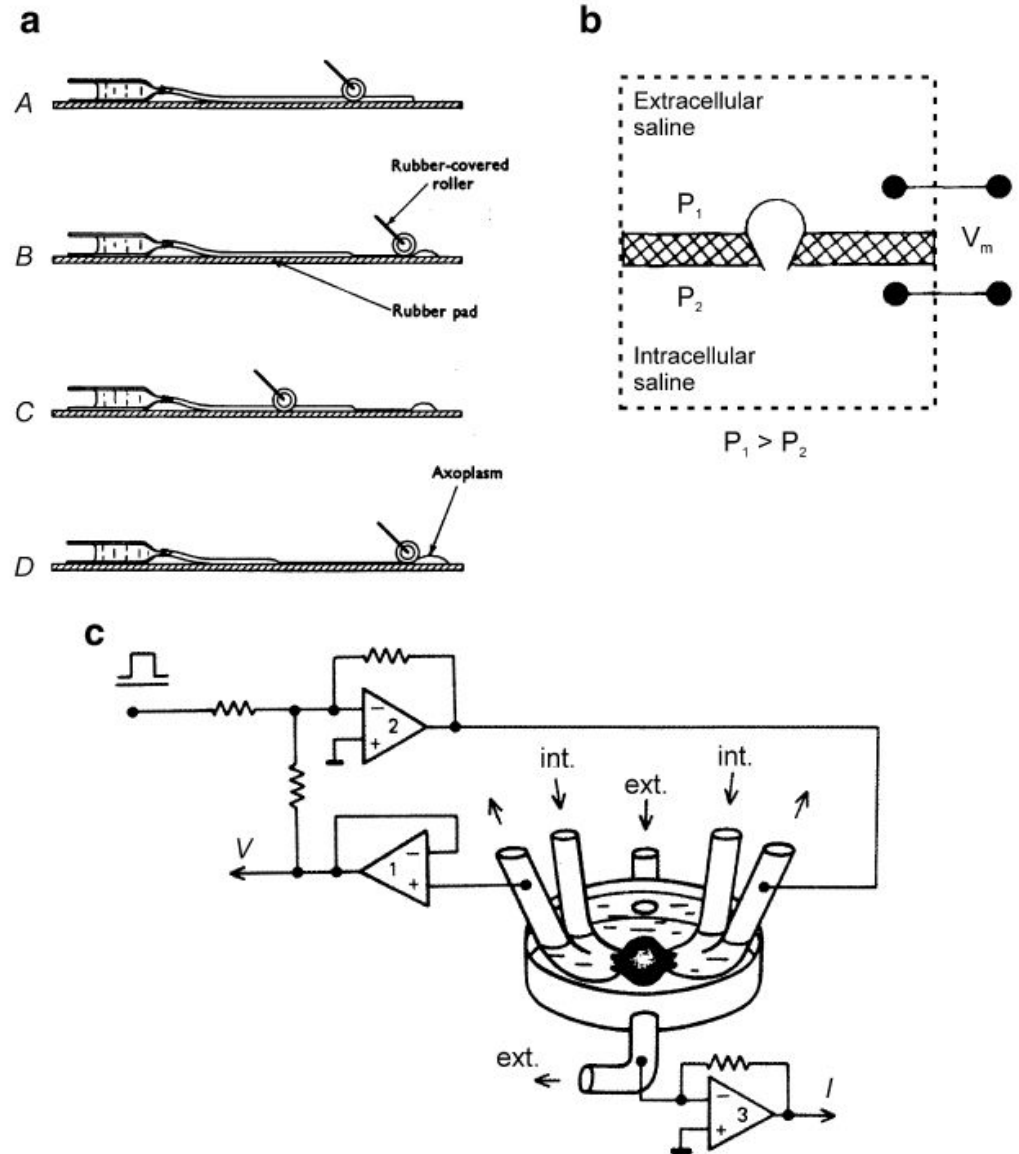
Baker PF, Hodgkin AL, Shaw TI (1962)
Replacement of the axoplasm of giant nerve
fibres with artificial solutions.

J Physiol 164:330–354

b,c.

Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI
(1981) Intracellular perfusion.

J Neurosci Methods 4:201–210

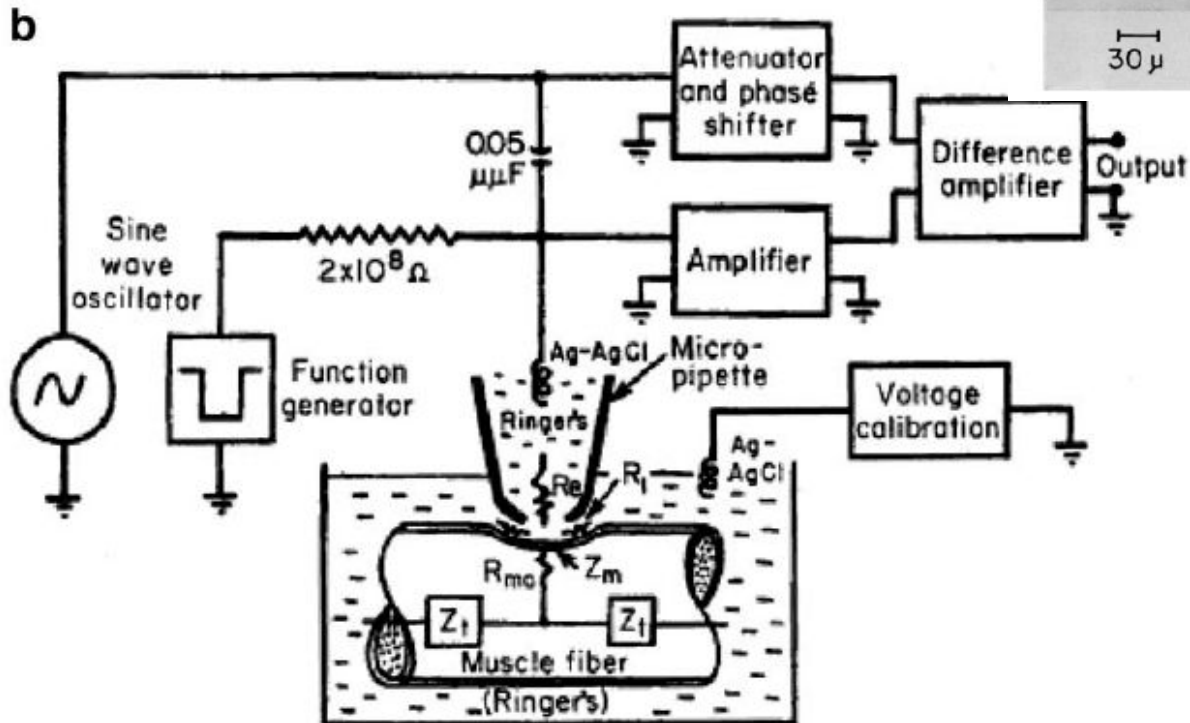
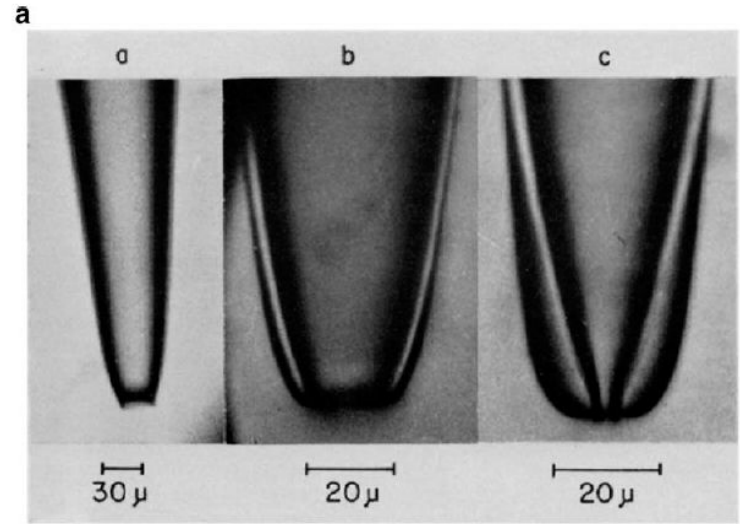


Модификация метода внутриклеточного диализа

Strickholm A (1962)

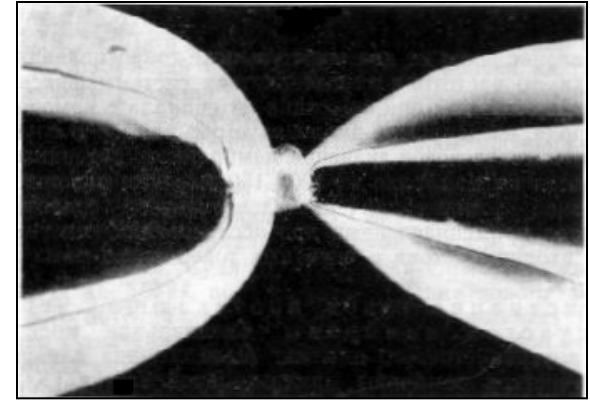
Excitation currents and impedance of a small electrically isolated area of the muscle cell surface.

J Cell Comp Physiol 60:149–167

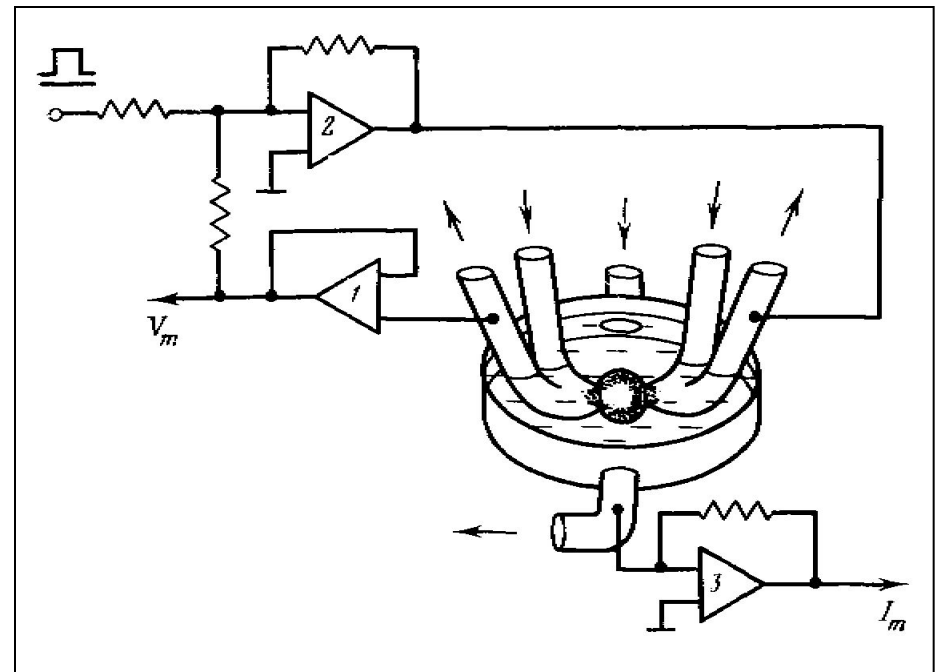


Модификация метода внутриклеточного диализа

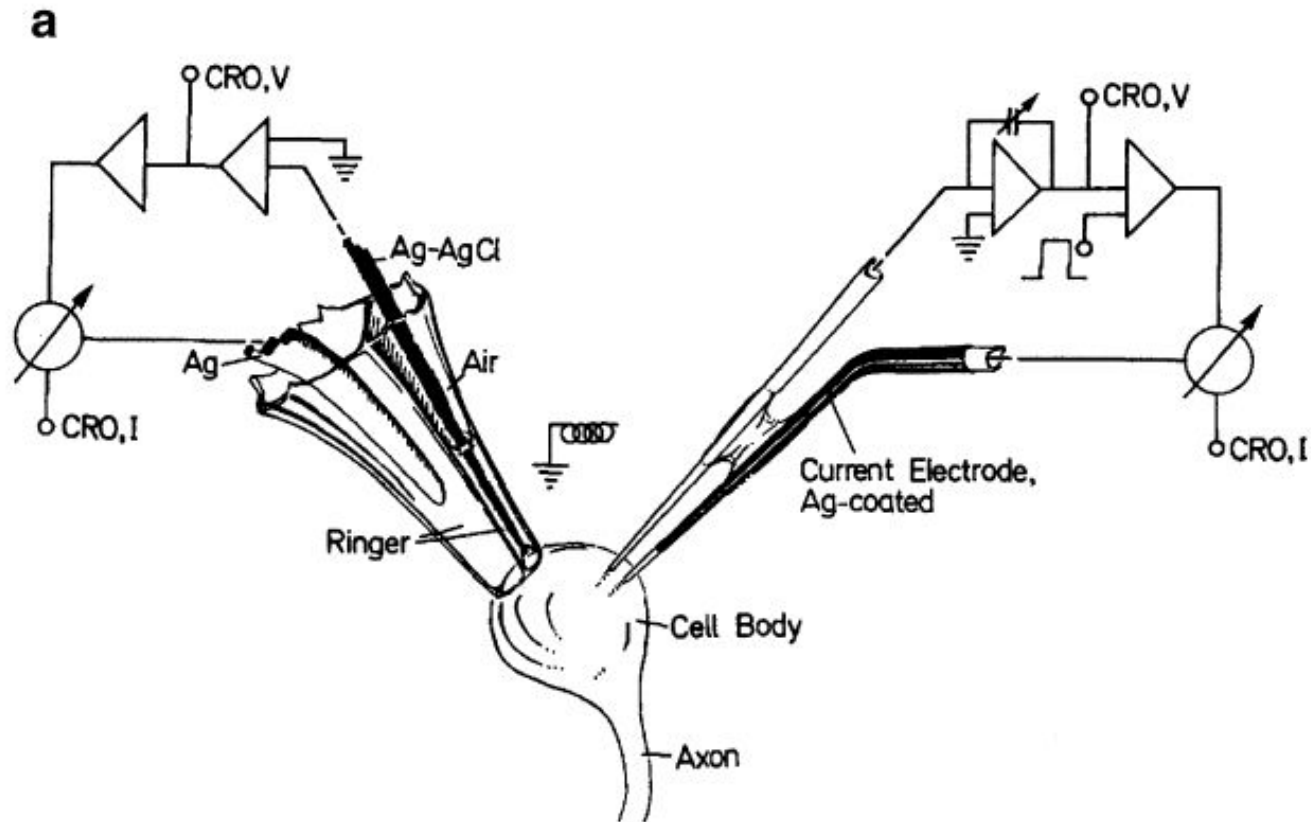
Вместо поры на плоской мембране использовали **пластиковую пипетку с порой** на ее кончике. Клетку погружали во внешний раствор, а через две пипетки осуществляли перфузию внутриклеточного раствора.



Одну пипетку использовали для **регистрации** мембранного потенциала, а через другую подавали **ток обратной связи**.



Мультиионная природа токов в мембранах нейронов МОЛЛЮСКОВ

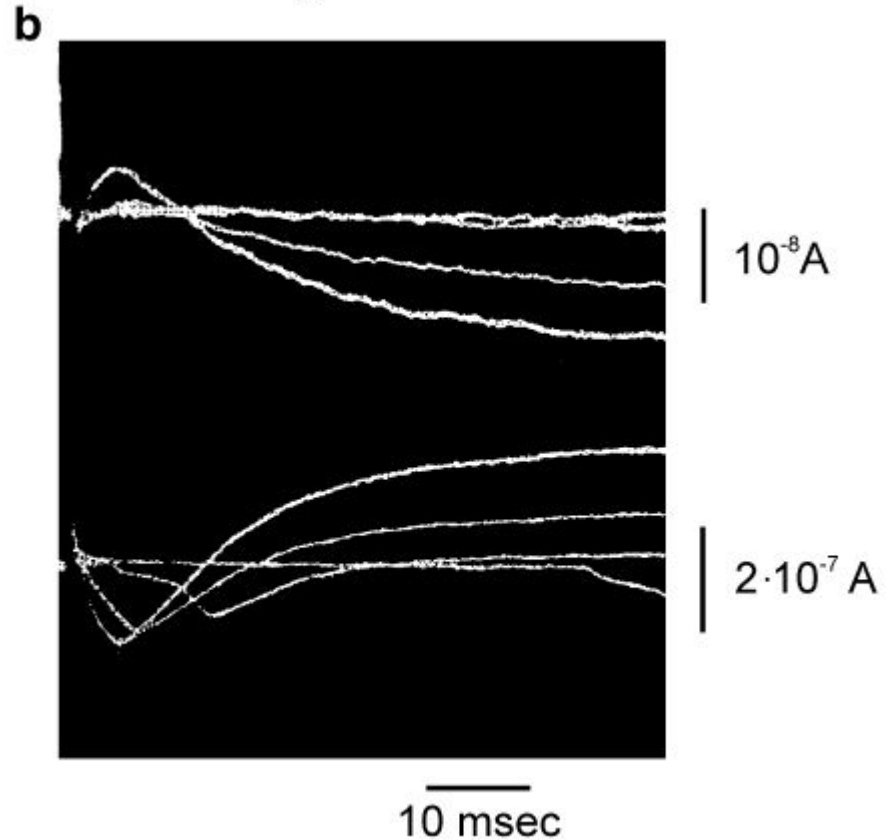


Neher E, Lux HD (1969)

Voltage clamp on *Helix pomatia* neuronal membrane; current measurement over a limited area of the soma surface.

Pflügers Arch 311:272–277

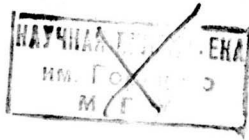
Мультиионная природа токов в мембранах нейронов МОЛЛЮСКОВ



Neher E, Lux HD (1969)

Voltage clamp on *Helix pomatia* neuronal membrane; current measurement over a limited area of the soma surface.

Pflugers Arch 311:272–277



УДК 612.822 : 612.816.7]-019 : 594.38

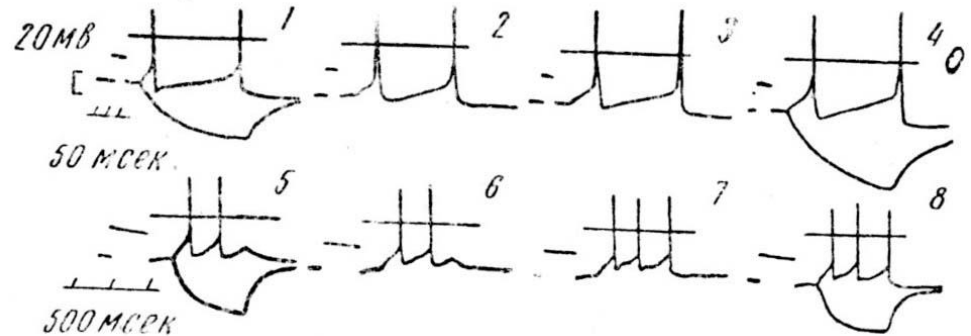
ВОЗБУДИМОСТЬ ГИГАНТСКИХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ (*HELIX POMATIA*, *LIMNEA STAGNALIS*, *PLANORBIS CORNEUS*) В РАСТВОРАХ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ ИОНОВ НАТРИЯ

В. Д. Герасимов, П. Г. Костюк, В. А. Майский

Лаборатория общей физиологии Института физиологии им. А. А. Богомольца АН
УССР, Киев

(Поступила в редакцию 24/II 1964 г. Представлена действ. членом АМН СССР В. В. 1

Характерной особенностью гигантских нервных клеток виноградной улитки является их способность сохранять нормальную возбудимость в безнатриевых растворах [1]. Мы обнаружили, что большинство клеток продолжало давать потенциалы действия в изотонических растворах хлористого кальция или бария. Более точная зависимость амплитуды потенциалов действия гигантских нейронов находилась в линейной зависимости от логарифма наружной концентрации этих ионов. Поэтому был сделан вывод о том, что роль ионов натрия при возбуждении берут на себя в этих условиях ионы двухвалентные катионы. Известно, что концентрация ионов кальция в гемолимфе виноградных улиток достигает в некоторые периоды жизни этих животных критической величины [3].

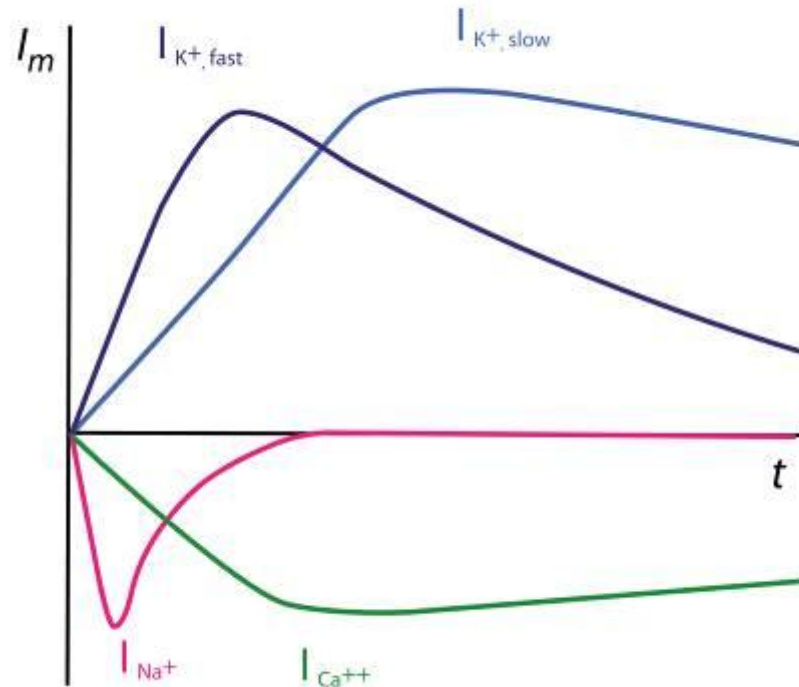


(Поступила в редакцию 24/II 1964 г.)

Герасимов В.Д., Костюк П.Г., Майский В.А. Возбудимость гигантских нервных клеток различных представителей легочных моллюсков в растворах, не содержащих ионов натрия // Бюлл. эксперим. биологии. 1964. - Т. 58, № 9. - С. 3-7.

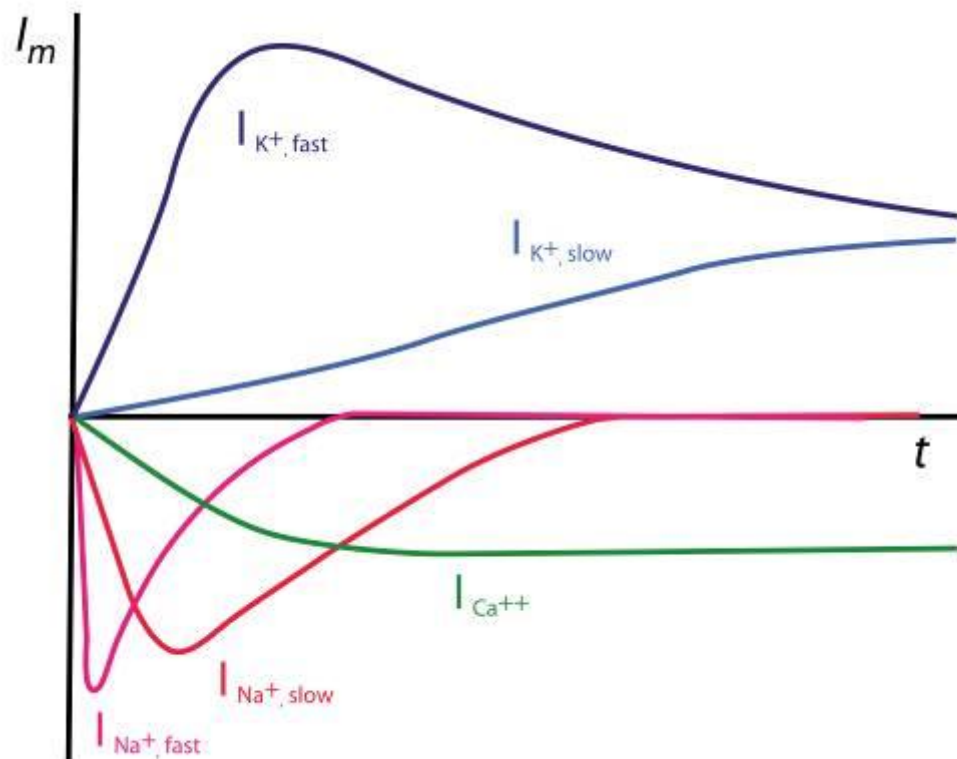
Мультиионная природа токов в мембранах нейронов моллюсков

В 1964 г. (Герасимов и др., 1964) нейроны виноградной улитки выделены два входящих (Na⁺ ток, быстрый Ca²⁺-медленный,) и два выходящих тока (быстрый и задержанный K⁺-токи В 1968 результаты были воспроизведены на морском моллюске *Arctica* - США



Мультиионная природа токов в мембранах нейронов позвоночных

Кроме токов, обнаруженных в нейронах моллюсков, зарегистрирован дополнительный Na^+ -ток, который не блокировался ТТХ и обнаружен у 10-15% изученных нейронов. По кинетике этот ток напоминал медленный Ca^{2+} -ток



Ионные токи в клетках Пуркинье мозжечка

В дендритах зарегистрированы ПД (а-в), обусловленные Ca^{2+} -проводимостью через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. Эти дендритные ПД достигают сомы нейрона, прерывая тоническую последовательность соматических Na^+/K^+ ПД (г).

Соматические ПД не распространяются по всему дендритному дереву и лишь электротонически проникают на небольшие расстояния от сомы (в). «0» на оси амплитуды соответствует уровню ПП.

