Механизм генерации биопотенциалов. Потенциал покоя

Введение

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, например сердечной ткани, приводит к ряду серьезных заболеваний.

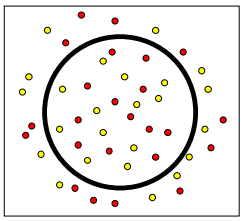
Изучение механизма возникновения клеточных биопотенциалов стало возможным прежде всего благодаря применению методов клеточной электрофизиологии, в развитии которых важную роль сыграли, во-первых, разработка техники микроэлектродных отведений, во-вторых, создание специальных усилителей биопотенциалов, обладающих высоким входным сопротивлением (до 10 м), малой постоянной времени (от 10 мс) и высокой чувствительностью (токи от 10^{-12} А) и, наконец, в-третьих, выбор удачных объектов исследования, начиная от гигантского аксона кальмара и гигантских нейронов пресноводных моллюсков и кончая разнообразными модельными мембранами.

Использование результатов электрофизиологических опытов в сочетании с физическим и математическим моделированием транспортных процессов лежит в основе современных теорий электрогенеза в клетках.

В покоящейся, нормально функционирующей живой клетке всегда имеется разность потенциалов между цитоплазмой и окружающей средой, называемая *потенциалом покоя.* Возникновение потенциала покоя связано с неравенством концентрации ионов внутри клетки и в окружающей среде и неодинаковой проницаемостью клеточных мембран для разных ионов. Причины этой неравномерности распределения ионов и ее влияние на потенциал покоя могут, однако, различаться у разных клеток.

Доннановское равновесие и потенциал Доннана

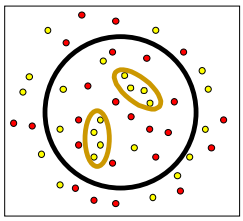
Происхождение потенциала Доннана



Равномерное распределение K^+ и Cl^- внутри и вне клетки. Соблюдается принцип электронейтральности: $[K+]_i = [Cl^-]_i$ и $[K+]_o = [Cl^-]_o$

Внутри

- 12 K^+
- 12 Cl^-



Неравномерное распределение K^+ и Cl^- внутри и вне клетки из-за того, что внутри клетки имеются фиксированные отрицательные заряды (белки и нуклеиновые кислоты). Принцип электронейтральности: $[K+]_i = [Cl^-]_i + n[P]_i$ и $[K+]_o = [Cl^-]_o$

Внутри 4 K^+ 2P

Доннановское равновесие устанавливается между клеткой и окружающей средой, если клеточная мембрана хорошо проницаема для неорганических ионов, но непроницаема для белков, нуклеиновых кислот и других крупных органических ионов. Наиболее характерно равновесие Доннана для мертвых клеток или для клеток с ослабленным метаболизмом.

В основе вывода уравнений, описывающих распределение ионов в доннановской системе, лежит условие электронейтральности, т. е. равенства суммарной концентрации анионов (в основном $C1^-$ и макромолекул P^-) и катионов K^+ как внутри клетки:

$$[K^+]_i = [Cl^-]_i + n[P^-]_i, \tag{8.1}$$

так и снаружи:

$$[K^+]_o = [Cl^-]_o + n[P^-]_o, \tag{8.2}$$

где n — число отрицательных зарядов на каждой белковой молекуле. В межклеточной жидкости содержание катионов значительно выше, чем макромолекул P^-; это позволяет вместо (8.2) написать:

$$[K^+]_0 = [Cl^-]_0 = c_0, \qquad (8.3)$$

где c_0— молярная концентрация электролитов во внеклеточной среде.

С другой стороны, между концентрацией проникающего иона и потенциалом имеется соотношение (см. уравнение 1.9):

$$\frac{[K^+]_i}{[K^+]_0} = \frac{[Cl^-]_0}{[Cl^-]_i} = e^{-\psi} = r, \qquad (8.4)$$

где ψ — безразмерный потенциал (уравнение 1.8), величина r — так называемое *отношение Доннана.*

Условие *доннановского равновесия* следует из уравнения (8.4):

$$[K^+]_i [Cl^-]_i = [K^+]_0 [Cl^-]_0 . \qquad (8.5)$$

В мышечных клетках неравномерное распределение калия между клеткой и средой, определяемое работой Na^+-K^+-АТФ-азы, создает мембранный потенциал $\psi_м$, который в свою очередь обеспечивает «доннановское» распределение хлора в соответствии с уравнением (8.4). В эритроцитах доннановское равновесие само создает мембранный потенциал. Величину этого потенциала можно получить из уравнений (8.3) и (8.4):

$$[K^+]_i = c_0 e^{-\psi}; \; [Cl^-]_i = c_0 e^{\psi}. \qquad (8.6)$$

Подставив полученные величины в уравнение (8.1), получаем:

$$e^{-\psi} - e^{\psi} = \frac{n[P^-]_i}{c_0}. \qquad (8.7)$$

Обычно концентрация белков в клетке имеет порядок величины 1 мМ, число зарядов n равно 10–20 на молекулу, а концентрация электролитов в окружающей среде около 150 мМ, т. е. $n[P^-]_i/c = 0{,}1$.

Из математики известно, что выражение ($e^x - e^{-x}$), если его величина <<1, приблизительно равно $2x$ (при $x = 0{,}1$ с точностью до 0,03%). Отсюда:

$$\psi = \frac{F}{RT}\varphi = -\frac{n[P^-]_i}{2c_0}. \qquad (8.8)$$

При 310 K φ(мВ) = $-13{,}36n[P^-]_i/c_0$. Таким образом, доннановский потенциал прямо пропорционален концентрации белков в клетке и обратно пропорционален концентрации окружающего электролита. Например, при $c_0 = 150$ мМ, $n = 15$ и $[P^-]_i = 1$ мМ, $\varphi = -1{,}4$ мВ. Мы видим, что доннановские потенциалы невелики; они ни в какой мере не могут объяснить высокие значения потенциалов покоя большинства живых клеток — минус 60 — минус 90 мВ в нервных и мышечных клетках.

Равновесный потенциал Нернста

Равновесный потенциал

Равновесный потенциал находим из условий равенства элетрохимических потенциалов проникающего иона внутри и снаружи, т.е по двум сторонам мембраны

$$\mu_i = \mu_o; RTln\frac{c_i}{c_o} = zF(\varphi_o - \varphi_i) \qquad (1)$$

Величина $1\varphi_m = \varphi_i - \varphi_o$ называется **мембранным потенциалом**. Мы будем называть **безразмерным** мембранным потенциалом величину:

$$\psi = \frac{F}{RT}\varphi \qquad (2)$$

Теперь уравнение равновесного потенциала (**уравнение Нернста**) может быть записано в довольно простом виде:

$$\varphi = \frac{zF}{RT}\ln\frac{c_i}{c_o} \quad \text{или еще проще} \quad \psi = z \times \ln\frac{c_i}{c_o} \qquad (3)$$

В 1902 г. Бернштейн выдвинул гипотезу, согласно которой потенциал покоя обусловлен тем, что цитоплазматическая мембрана проницаема для ионов K^+ и на ней создается потенциал, описываемый уравнением Нернста (1.7). Это предположение было подтверждено многими исследователями и на многих объектах. На рис. 57 приведена зависимость потенциала на мембране гигантского аксона кальмара от внеклеточной концентрации ионов K^+: видно, что между $\varphi_м$ и $\ln[K^+]_0$ при высоких $[K^+]_0$ имеется линейная зависимость, вытекающая из уравнения (1.7):

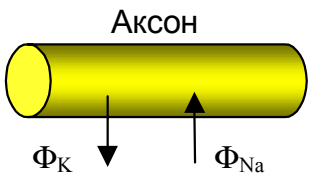
$$\varphi_м = \frac{RT}{F}\ln\left[K^+\right]_i - \frac{RT}{F}\ln\left[K^+\right]_0. \qquad (8.9)$$

Однако на этом же графике видно, что при низких концентрациях K^+ данные опытов расходятся с расчетными. Из данных табл. 5 можно видеть, что хотя равновесные калиевые потенциалы, рассчитанные по уравнению Нернста, близки к измеряемым потенциалам покоя в исследованных клетках, они все же от них отличаются. Это показывает, что «калиевая теория» потенциала покоя несовершенна и не полностью объясняет наблюдаемые факты.

Таблица 1 Содержание ионов K^+, Na^+, Cl^-, равновесные потенциалы, потенциалы покоя и действия некоторых клеток

Клетки	Отношение концентраций, внутренней к внешней, мМ			Равновесный нернстовский потенциал для разных ионов, мВ			Измеренные потенциалы, мВ	
	$\frac{[K^+]_i}{[K^+]_0}$	$\frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_0}$	$\frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_0}$	K^+	Na^+	Cl^-	Покоя	На максимуме спайка
Гигантский аксон каракатицы	$\frac{340}{10,4}$	$\frac{49}{463}$	$\frac{114}{592}$	-88	+57	-42	-60	+50
Аксон кальмара	$\frac{360}{10,0}$	$\frac{69}{425}$	$\frac{157}{496}$	-90	+46	-29	-60	+35
Мышечное волокно лягушки	(48:1)	(1:7)	(1:64)	-98	+49	-105	-88	+34
Моторный нейрон кошки	$\frac{150}{5,5}$	$\frac{15}{150}$	$\frac{9}{125}$	-90	+60	-70	-70	+30

Примечание. В скобках даны относительные концентрации ионов.



Стационарный потенциал Гольдмана-Ходжкина

Причина отклонения потенциала на мембране от потенциала Нернста — проницаемость мембраны не только для K^+, но и для других ионов.

Для количественного описания потенциала в условиях проницаемости мембраны для нескольких ионов Ходжкин и Катц использовали представление о том, что потенциал покоя не равновесный, а стационарный по своей природе, т. е. он отражает состояние системы, когда через мембрану непрерывно идут **встречные потоки** ионов K^+, Na^+, Cl^- и других. Суммарный поток положительно заряженных частиц через мембраны равен сумме потоков одновалентных катионов минус сумма потоков одновалентных анионов. Основной вклад в суммарный поток зарядов практически во всех клетках вносят ионы K^+, Na^+, Cl^-. Поэтому

$$\Phi = \Phi_{Na^+} + \Phi_{K^+} - \Phi_{Cl^-}. \qquad (8.10)$$

Будем считать, что величина Ф отрицательна, если поток направлен из клетки в окружающую среду, и положительна, если поток направлен в клетку.

Наличие суммарного потока приведет к изменению потенциала на мембране; скорость этого изменения зависит от емкости мембраны. Связь между плотностью тока j (А/м^2), удельной емкостью C (Ф/м^2) и потенциалом φ (В) известна из курса физики:

$$\frac{d\varphi}{dt} = \frac{j}{C}, \qquad (8.11)$$

где $d\varphi/dt$ — скорость изменения потенциала (В/с). При этом величина плотности тока j связана с плотностью потока одновалентных катионов Ф (моль/м^2·с), соотношением $j = \Phi F$, где F — число Фарадея.

Возникающий потенциал (поляризация мембраны) тормозит дальнейший перенос ионов, так что в конце концов суммарный ток через мембрану прекратится и система придет в состояние, когда $j = 0$ и $\Phi = 0$. При этом система не обязательно придет в равновесие, так как нулевое значение суммарного потока заряженных частиц еще не означает отсутствие составляющих его потоков отдельных ионов. И Φ_{Na}, и Φ_K, и Φ_{Cl} могут не быть равны нулю по отдельности, а тем не менее:

$$\Phi = \Phi_{Na^+} + \Phi_{K^+} - \Phi_{Cl^-} = 0. \qquad (8.12)$$

Для простоты дальнейших преобразований примем вначале, что поток хлора равен нулю, откуда:

$$\Phi_{Na^+} = -\Phi_{K^+}. \qquad (8.13)$$

Величина потоков Na^+ и K^+ зависит от градиента их концентрации на мембране и от мембранного потенциала в соответствии с уравнением (6.11):

$$-\Phi_{K^+} = P_K \psi \frac{[K^+]_i - [K^+]_0 e^{-\psi}}{1\text{-}e^{-\psi}}, \qquad (8.14)$$

$$-\Phi_{Na^+} = P_{Na} \psi \frac{[Na^+]_i - [Na^+]_0 e^{-\psi}}{1\text{-}e^{-\psi}}. \qquad (8.15)$$

(Для K^+ и Na^+ $z = 1$.)

Подставив (8.14) и (8.15) в уравнение (8.13) и проведя элементарные преобразования, получим:

$$e^{-\psi} = \frac{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i}{P_K[K^+]_0 + P_{Na}[Na^+]_0}. \qquad (8.16)$$

Найдем ψ по определению логарифма, а затем выразим мембранный потенциал не в безразмерных единицах (ψ), а в вольтах ($\varphi_м$) в соответствии с уравнением (1.8):

$$\varphi_м = \frac{RT}{F}\ln\frac{P_K[K^+]_0 + P_{Na}[Na^+]_0}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i}. \qquad (8.17)$$

Если ввести в рассмотрение также и ионы Cl^- [уравнение (8.12)], то, повторив предыдущие рассуждения, можно получить уравнение потенциала для трех ионов:

$$\varphi_м = \frac{RT}{F}\ln\frac{P_K[K^+]_0 + P_{Na}[Na^+]_0 + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_0}. \qquad (8.18)$$

Уравнение (8.18) называется уравнением стационарного потенциала Гольдмана–Ходжкина–Каца или (проще) *уравнение Гольдмана.*

Всякое равновесие можно рассматривать как частный случай стационарного состояния. Уравнение Нернста — это частный случай уравнения Гольдмана: (8.18) переходит в (1.7), если проницаемость для одного из ионов гораздо выше, чем для других. Например, в гигантском аксоне кальмара $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0{,}04 : 0{,}45$, т. е. проницаемость для K^+ заметно выше, чем для других ионов. Таким образом, $P_к >> P_{Na}$ и $P_K >> P_{Cl}$ поэтому числитель и знаменатель в уравнении (8.18) приблизительно равны соответственно $P_к[K^+]_0$ и $P_K[K^+]_i$, благодаря чему уравнение (8.18) превращается в уравнение Нернста для K^+.

Важно подчеркнуть, что мембранный потенциал определяется не абсолютными, а относительными величинами проницаемости для ионов. Мы можем, например, ввести такие обозначения: $\rho_{Na} = P_{Na}/P_K$; $\rho_{Cl} = P_{Cl}/P_K$. Тогда, разделив в уравнении Гольдмана числитель и знаменатель на P_K, получаем:

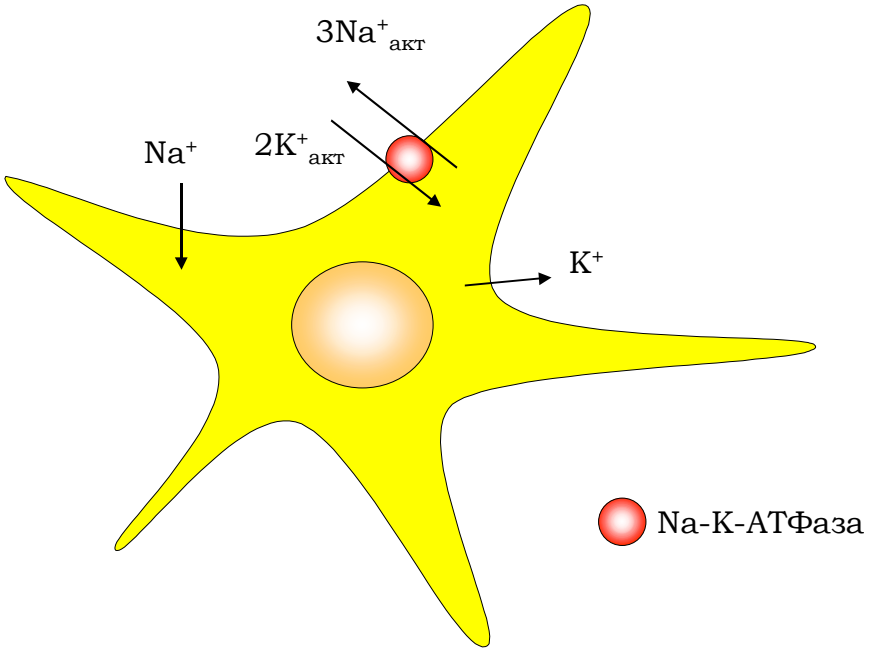
$$\varphi_м = \frac{RT}{F}\ln\frac{[K^+]_0 + \rho_{Na}[Na^+]_0 + \rho_{Cl}[Cl^-]_i}{[K^+]_i + \rho_{Na}[Na^+]_i + \rho_{Cl}[Cl^-]_0}. \qquad (8.19)$$

Практически во всех изученных к настоящему времени случаях потенциалы на клеточной мембране могут быть описаны уравнением Гольдмана, если относительные проницаемости ρ_{Na} и ρ_{Cl} выбраны правильно.

На рис. 57 видно, что рассчитанный по уравнению Гольдмана потенциал гигантского аксона кальмара (сплошная кривая) совпадает с экспериментально найденными точками (о) при всех внешних концентрациях KCl. Это говорит о правильности значений ρ_{Na} и ρ_{Cl}, использованных при расчетах ($\rho_{Na} = 0{,}04$; $\rho_{Cl} = 0{,}45$).

Потенциал при работе электрогенной помпы

Поток ионов, создаваемый мембранным насосом Na^+–K^+-АТФазой, также может участвовать в формировании стационарного потенциала. Это происходит потому, что при каждом цикле работы этого фермента в большинстве клеток (см. с. 132) ионов Na^+ (3) выводится больше, чем ионов K^+ (2). Суммарный поток положительных зарядов, направленных из клетки в окружающую среду, приводит к увеличению (по абсолютной величине) отрицательного потенциала внутри клетки. (Напомним, что потенциал среды принимается за нуль.)



Рассмотрим этот вопрос количественно. Если в клетке установилось стационарное состояние, активные потоки Na^+ и K^+ через мембраны ($\Phi_{Na^+,акт.}$ и $\Phi_{K^+,акт.}$) в точности компенсируются пассивными потоками («утечками»), обусловленными проницаемостью мембраны:

$$\Phi_{K^+,акт.} = -\Phi_{K^+.} \text{ и } -\Phi_{Na^+,акт.} = \Phi_{Na^+}. \qquad (8.20)$$

Как уже говорилось, при работе АТФ-азы имеется определенная стехиометрия между активно перенесенными Na^+ и K^+:

$$\frac{-\Phi_{Na^+,акт.}}{\Phi_{K^+,акт.}} = \chi, \qquad (8.21)$$

причем χ для большинства АТФ-аз равен 3:2. [Знак «минус» в уравнениях (8.20–8.21) указывает на противоположную направленность потоков.] Путем подстановки (8.20) в (8.21) получаем:

$$\Phi_{Na^+} = -\chi\Phi_{K^+}. \qquad (8.22)$$

Таким образом, в ситуации, когда утечка ионов через мембрану компенсируется работой помпы [т. е. соблюдаются уравнения (8.20) и (8.21)], пассивные потоки при $\chi \neq 1$ связаны уравнением, отличным от (8.13). Потоки ионов описываются уравнениями (8.14) и (8.15). Подставив эти выражения в уравнение (8.22) и проведя преобразования, аналогичные изложенным в разделе 8.3. получаем выражение для потенциала:

$$\varphi_м = \frac{RT}{F}\ln\frac{\chi P_K[K^+]_0 + P_{Na}[Na^+]_0}{\chi P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i}. \qquad (8.23)$$

Это уравнение, полученное в 1972 г. Томасом, как и уравнение Гольдмана, превращается в уравнение Нернста при $P_K >> P_{NA}$. Однако если это не так, $\varphi_м$ будет разным при наличии помпы и в ее отсутствие, как легко видеть, сопоставив выражения (8.23) и (8.17). Как же бу-

дут различаться потенциалы в этих случаях? Для ответа на этот вопрос остановимся на анализе уравнений (1.7), (8.17) и (8.23).

1. Поскольку в мембранах покоящихся клеток $P_K > P_{NA}$, а $\chi > 1$, то заведомо $\chi P_K > \chi P_{NA}$; по этой причине мембранный потенциал покоя ближе к равновесному потенциалу для K^+, чем для Na^+, и имеет отрицательный знак (см. табл. 5).

2. Равновесный потенциал для Na^+, рассчитанный по уравнению Нернста, положителен (см. табл. 5), поэтому рост проницаемости мембран для ионов натрия уменьшает абсолютную величину отрицательного мембранного потенциала в клетках, а рост проницаемости для ионов калия увеличивает эту величину. В целом потенциал, рассчитанный по уравнениям (8.17) и (8.23), по абсолютной величине ниже нернстовского калиевого потенциала (1.7) (см. табл. 5).

3. Поскольку $\chi > 1$ (обычно $\chi = 3:2$), то влияние этого множителя в уравнении (8.27) эквивалентно увеличению P_K. В свете сказанного в предыдущем пункте это означает, что потенциал, рассчитанный по уравнению (8.23), по абсолютной величине выше обычного гольдмановского потенциала (8.17).

Величина потенциала покоя, различная у разных клеток, может изменяться при изменении условий их жизнедеятельности. Для неповрежденных нервных клеток характерны высокие значения потенциала покоя, обусловленные низкой общей проницаемостью мембран и значительным различием проницаемости для K^+ и Na^+ [уравнение (8.23)]. Нарушение биоэнергетических потенциалов в клетке, сопровождающееся падением внутриклеточного уровня макроэргических соединений, прежде всего исключает компоненту потенциала покоя, связанную с работой Na^+–K^+-АТФ-азы [потенциал описывается теперь уравнением (8.17)]. Повреждение клетки приводит обычно к неспецифическому повышению проницаемости клеточных мембран, в результате чего различие в коэффициентах проницаемости для ионов калия и натрия уменьшается; потенциал покоя при этом также снижается [это ясно из уравнения (8.17)]. В пределе у сильно поврежденных клеток он может снизиться до уровня доннановского потенциала, когда происходит перераспределение ионов, определяемое уже не работой ионных насосов, а содержанием полианионов в клетке (уравнение 8.8).