

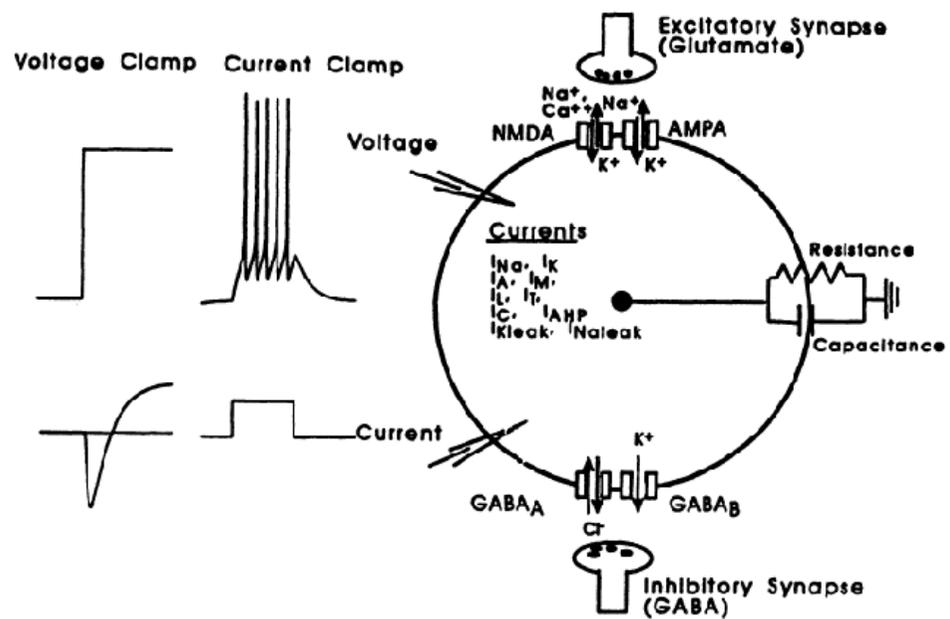
Задача малого практикума

по биофизике

№ 11

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

ВОЗБУДИМОЙ КЛЕТКИ



1. Потенциал покоя

Потенциалом покоя (ПП) называется разность электрохимических потенциалов между внутренней и наружной сторонами плазматической мембраны возбудимой клетки в состоянии покоя.

Многочисленные исследования, проведенные в Плимутской Биологической Лаборатории (Англия), выдающимися учеными – биофизиками, Аланом Ходжкиным, Эндрю Хаксли и Бернардом Катцом, впервые использовавшими особенности строения гигантского аксона кальмара (большой диаметр, приблизительно 1 мм), доказали, что формирование ПП и *потенциала действия (ПД)* возбудимой клетки зависит от концентраций основных ионов внутри клетки и в окружающей среде. Вторым фактором, определяющим значение МП, является проницаемость мембраны для потенциал образующих ионов. Проницаемость определяется наличием в мембране ионных каналов, избирательно пропускающих ионы, находящиеся в клетке и в наружной среде.

Для каждого типа клеток характерны свои постоянные значения потенциала покоя. ПП аксона кальмара составляет -65мВ, тогда как равновесный потенциал для K^+ равен -100мВ, а для Na^+ +41мВ. ПП представляет собой диффузионный потенциал ионов, пассивно перемещающихся через каналы в мембране по градиенту концентрации. При перемещении только ионов одного знака осуществляется перенос заряда на мембране и возникает разность потенциалов – мембранный потенциал (МП). Когда градиент электрохимического потенциала для данного иона на плазматической мембране достигает стационарного уровня (градиент концентрации и градиент потенциала уравновешивают друг друга), система приходит в состояние равновесия. Равновесный потенциал может быть вычислен с помощью *уравнения Нернста* или *уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца*.

Уравнение Нернста и уравнение постоянного поля Гольдмана-Ходжкина-Катца.

Если два раствора с различными концентрациями ионов разделены проницаемой для ионов мембраной, то ионы будут перемещаться по своему концентрационному градиенту. Транспорт ионов приводит к возникновению на мембране градиента потенциала. Возникшая разность потенциалов оказывает влияние на транспорт ионов. Напряжение на мембране, при котором прекращается движение ионов по концентрационному градиенту – равновесный потенциал – может быть рассчитан по *уравнению Нернста*:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right),$$

где R-газовая постоянная - 8.314 ВКл/Кмоль, F- постоянная Фарадея 9.648×10^4 Кл/моль, T- абсолютная температура в Кельвинах, z-заряд иона, $[X]_{in}, [X]_{out}$ – концентрации иона X внутри и снаружи клетки, соответственно.

Для случая тонких мембран, когда концентрация носителей зарядов в мембране мала, а толщина двойного электрического слоя (вблизи поверхности мембраны) велика, как это наблюдается у биологических мембран, для решения электродиффузионного уравнения используют приближение постоянного поля. Этот подход основан на предположении о линейности изменения электрического потенциала или постоянства напряженности поля по всей толщине мембраны.

Если мембрана проницаема более чем для одного иона и мы знаем относительные проницаемости ионов, то ПП мембраны можно рассчитать по *уравнению постоянного поля Гольдмана-Ходжкина-Катца (ГХК)*:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{p_K [K^+]_{out} + p_{Na} [Na^+]_{out}}{p_K [K^+]_{in} + p_{Na} [Na^+]_{in}} \right).$$

В состоянии покоя распределение Cl^- близко к равновесному и его концентрацию в уравнении ГХК можно не учитывать.

Отметим, что E зависит не только от концентраций K^+ и Na^+ внутри и снаружи клетки, но так же и от *относительной проницаемости* для этих ионов, p_K и p_{Na} . Данный параметр определяют как

$$p = \frac{u\beta RT}{aF},$$

где u-подвижность иона в мембране, β -коэффициент распределения иона между мембраной и водным раствором, a- толщина мембраны, R,T,F-постоянные. Для большинства мембран p_{Na} значительно меньше, чем p_K (~2-6%), и поэтому ПП мембраны близок к потенциалу Нернста для K^+ , E_K .

Отметим разницу между понятиями проницаемость и проводимость. *Проницаемость* - это способность мембраны пропускать ионы, является свойством мембраны и не зависит от содержания ионов в окружающих растворах. *Проводимость* характеризует изменение потоков ионов при небольших сдвигах мембранного потенциала и зависит и от проницаемости, и от содержания иона в среде. Например, мембрана, проницаемая для ионов K^+ , будет обладать очень низкой проводимостью по K^+ при отсутствии этих ионов в среде.

2. Потенциал действия

Основная функция нервной клетки заключается в обеспечении процесса генерации и распространения возбуждения в самой клетке и между разными клетками. Процесс возбуждения нервных и мышечных клеток связан с быстрым обратимым изменением мембранного потенциала и носит название *потенциала действия* (ПД).

Генерация потенциала действия происходит в том случае, если раздражение нанесенное на возбудимую клетку, снижает ее мембранный потенциал (по абсолютной величине) до

определенного, т.н. критического уровня. Такая реакция на изменение МП происходит благодаря тому, что натриевая проводимость мембраны зависит от МП. При МП на уровне ПП величина натриевой проводимости очень мала. При снижении МП – *деполяризации* – происходит увеличение натриевой проводимости, в результате чего натрий начинает поступать внутрь клетки, что способствует еще большему снижению уровня МП. Это в свою очередь ведет в еще большему увеличению проводимости для Na^+ . Теоретически при возбуждении МП должен достигнуть уровня равновесного потенциала для натрия, уравнивающего Na^+ - концентрационный градиент. Однако на практике этот уровень никогда не достигается. Нарастание проводимости мембраны для Na^+ идет быстро и достигает максимума при положительном МП, однако затем быстро снижается до нуля. Быстрое снижение Na^+ -тока связано с развитием процесса натриевой инактивации. Это явление связано с особенностями ионных каналов, обеспечивающих натриевую проводимость.

Ионный ток через возбудимые мембраны контролируется двумя факторами:

- 1) наличием ион-селективных каналов, через которые могут перемещаться только определенные ионы;
- 2) воротным механизмом, который открывает или закрывает пору. Включение тока, происходящее при открытии *активационных ворот* канала, называется *активацией*, а обратный процесс (закрытие активационных ворот каналов) - *деактивация*.

Инактивация Na^+ - тока происходит на фоне продолжающейся деполяризации, в результате чего натриевая проводимость резко снижается и потенциал приближается к значению ПП. Сразу после ПД мембрана не способна реагировать на возбуждение и генерировать Na^+ -ток. Это связано с переходом Na^+ -каналов в инактивированное состояние, в котором они становятся нечувствительны к деполяризации. Инактивированное состояние натриевых каналов определяется *период абсолютной рефрактерности*, в течение которого мембрана не способна к генерации ПД. Продолжительность периода рефрактерности определяет максимальную частоту ПД. Обращение инактивации приводит к *деинактивации*. Инактивация и деинактивация происходят при открывании и закрывании *инактивационных ворот*. Для прохождения иона через канал необходимо, чтобы активационные и инактивационные ворота в данном канале были открыты. Некоторые ионные каналы, такие как K^+ -канал, не имеют инактивационных ворот, другие, наоборот, содержат оба типа ворот (Na^+ -канал, Ca^{++} -канал).

Быстрая *реполяризация* (восстановление ПП) связана не только со снижением проницаемости для Na^+ , но и с увеличением проницаемости для K^+ , также вызванным деполяризацией, однако в отличие от повышения натриевой проницаемости отсроченного во времени от момента активации Na^+ -тока. Вызванный деполяризацией калиевый ток нарастает медленно и не инактивируется. Повышение проницаемости для K^+ обуславливает наличие

следовой гиперполяризации, когда значение МП становится более отрицательным, чем при ПП и приближается к равновесному потенциалу для K^+ .

3. Нейрофизиологические свойства нейрона

Первые исследователи процессов возбуждения и торможения в мозге млекопитающих предполагали, что ЦНС состоит из сложной взаимосвязанной сети нейронов, каждый из которых обладает электрическими свойствами идентичными обнаруженным Ходжкиным и Хаксли у гигантского аксона кальмара. Генерация ПД осуществляется за счет тока Na внутрь клетки и тока K наружу, но электрофизиологический ответ должен быть более сложными как за счет взаимодействия нейронов друг с другом, так и за счет наличия возбуждающих и (или) тормозящих связей. Последующее изучение нейронов на всех уровнях развития нервной системы выявило разнообразные группы ионных каналов, которые в различных сочетаниях друг с другом создают для каждого типа возбудимых клеток свой особенный вариант процесса генерации и проведения ПД.

Возможна ли при функционировании нейронов активация большего числа ионных каналов? Используя изолированные нейроны морских брюхоногих моллюсков (таких как *Anisodora*) и микроэлектродные методы, апробированные Ходжкиным и Хаксли, Дж. Коннор и Чак Стивенс, выявили ионные токи аналогичные токам в гигантском аксоне кальмара. Однако, при этом был обнаружен и новый тип K^+ -тока.

K^+ -токи

A-ток. У нейронов беспозвоночных деполяризация мембраны активирует новый тип K^+ -канала, который, в отличие от K^+ -канала в аксоне, инактивируется со временем при продолжающейся деполяризации мембраны. Включение такого быстро инактивирующегося K^+ -тока в модель генерации ПД позволяет модифицировать скорость (или частоту ритмического возбуждения) генерации ПД. Такой K^+ -ток называют *A-ток*. Он быстро инактивируется и не активируется до тех пор, пока не произойдет кратковременная гиперполяризация мембраны. Активируется A-ток во время спада "обычного" калиевого тока, когда потенциал мембраны составляет ~ -75 мВ. A-ток предотвращает деполяризацию и т.о. снижает частоту импульсного разряда.

Приложение электрического тока к нервным клеткам симпатических ганглиев лягушки-быка приводит к генерации сложного вида ПД из-за активации большого количества разных каналов. Присутствует по крайней мере 4 различных K^+ -тока: помимо A-тока могут быть выделены также два тока, которые активируются при поступлении в клетку Ca^{++} во время ПД (I_C и $I_{\text{АРН}}$) и один, который активируется при деполяризации (I_M) мембраны.

C-ток. Реполяризация аксолеммы в процессе ПД обеспечивается как инактивацией Na -тока, так и активацией K -тока. Однако, для многих типов нервных клеток было показано, что

удаление внеклеточного Ca^{2+} или блокирование Ca^{2+} -каналов двухвалентными катионами (например Cd^{2+} , для которых мембрана непроницаема), приводит к удлинению фазы реполяризации и снижению уровня гиперполяризации мембраны после прохождения ПД. Эти результаты указывают на то, что Ca^{2+} может транспортироваться в клетку в течение ПД и в связи с этим происходит активация K^+ -тока (I_{C}), обеспечивающая реполяризацию мембраны.

АНР-ток. Для ряда нейронов выявлен другой тип Ca^{2+} -активируемого K^+ -тока. Например, внутриклеточная деполяризация пирамидальных нейронов неокортекса человека импульсом тока приводит к генерации серии ПД, сопровождающейся следовой гиперполяризацией клеточной мембраны. Такая следовая гиперполяризация - главным образом результат активации медленного K^+ -тока, $I_{\text{АНР}}$ (*after hyperpolarisation*), который генерируется за счет входа Ca^{2+} при проведении серии ПД.

При генерации ПД Ca^{2+} поступает в клетку через Ca^{2+} -каналы, активирующиеся при высоких напряжениях стимулирующего клетку импульса. Увеличение количества внутриклеточного Ca^{2+} активирует $I_{\text{АНР}}$, который затем гиперполяризует мембрану клетки и приводит к уменьшению частоты генерации ПД (процесс известен как «частотная адаптация»). Активация различных рецепторов, включая ацетилхолиновые (мускариновые) рецепторы, локализованных на мембране пирамидальных клеток коры, уменьшает $I_{\text{АНР}}$ и, соответственно, повышает частоту генерации ПД. Данное увеличение возбудимости пирамидальных клеток коры является важным фактором, обеспечивающим поддержание активности коры мозга во время бодрствования; и, наоборот, клетки коры становятся менее возбудимыми в состоянии сна без сновидений.

М-ток. Генерация разнообразных пачек ПД в нейроне осуществляется за счет взаимодействия различных ионных токов, которые могут меняться при действии нейромедиаторов. Одним из примеров такого типа нейромодуляции был обнаружен в клетках симпатических ганглиев лягушки-быка Д. Брауном и П. Адамсом. Эти исследователи выявили механизмы, с помощью которых высвобождение медиатора из окончаний предганглионарных нейронов спинного мозга (ацетилхолин) модулирует возбудимость ганглионарных клеток за счет активации мускариновых рецепторов. Амплитуда медленного возбуждения (деполяризации) обусловлена активацией мускариновых рецепторов при высвобождении ацетилхолина и зависит от МП клетки. Браун и Адамс продемонстрировали, что потенциалозависимость медленного холинэргического возбуждения обусловлена инактивацией ацетилхолином потенциалозависимого K^+ -тока (*М-ток*), который блокирует мускариновые рецепторы.

Таким образом, М-ток - это K^+ -ток, активирующийся при деполяризации клетки за время порядка десятка миллисекунд. Например, если мы с помощью метода фиксации потенциала изменим МП клетки с -65 мВ на -45 мВ, то М-ток постепенно включится. Стимуляция предганглионарного нерва при действии ацетилхолина приводит к значительному подавлению

этого медленно активирующегося K^+ -тока. Активация М-тока при деполяризации мембраны приводит к снижению клеточной возбудимости настолько, что прикладываемый к нерву деполяризующий импульс тока способен генерировать не пачку, а лишь один ПД. Однако, при блокировании М-тока в момент выхода из нейрона ацетилхолина, аналогичный по величине деполяризующий импульс приводит к генерации пачки ПД.

Ca^{2+} -токи.

При исследовании состояния нейронов мозга спящих животных было обнаружено, что многие клетки (даже во время фазы медленного сна) не находятся в состоянии покоя, а генерируют серии ПД, а не отдельные ПД (типично для бодрствующих животных). Действительно, внутриклеточная регистрация МП во время фазы медленного сна для таламических клеток, которые осуществляют передачу сигналов от сетчатки к зрительной коре, выявила наличие медленных ПД, обеспечивающих серии импульсов в спящем мозге. Переход к бодрствованию или быстрому сну был связан с деполяризацией мембраны и более регулярной генерацией ПД в отличие от спайков или серии ПД. Дальнейшие исследования доказали наличие изменений ионных токов нейронов при переходе животного от состояния сна к бодрствованию. С помощью микроэлектродных исследований, выполненных на таламических клетках, были выявлены два основных способа генерации ПД. В случае, когда мембрана гиперполяризована, внутриклеточное введение в клетку деполяризующего импульса тока (до значений <-60 мВ) приводило к активации низкопорогового Ca^{2+} -зависимого ПД, что стимулировало серию (пачку) из 3-5 ПД. Однако, если клеточный МП составлял -63 мВ, внутриклеточное приложение такого же импульса тока приводит только к пассивному ответу клетки, который определяется емкостью и сопротивлением ее мембраны. Если плазматическая мембрана клетки затем деполяризуется до -53 мВ, то аналогичный импульс приводит к генерации обычной серии ПД, при этом частота, в отличие от пирамидальных клеток коры, со временем не уменьшается. Таким образом, даже на уровне отдельных нейронов проявляются изменения активности в отношении цикла сна и бодрствования.

Наличие у таламических клеток механизма генерирующего пачки ПД во время медленного сна обусловлено свойствами особого типа Ca^{2+} -тока, известного как низкопороговый, или быстрый, Ca^{2+} -ток, обозначаемый также как Т-ток. Медленный ПД возникает при входе Ca^{2+} в клетку. Как и Na^+ -ток, участвующий в генерации ПД, Т-ток способен к инактивации, однако он инактивируется уже при деполяризации до ~ -60 мВ, и длительная деполяризация клетки приводит к полной его инактивации и исчезновению медленных спайков. Эта особенность Т-тока обеспечивает способность таламических нейронов переходить от состояния генерации всплеск ПД во время сна к нормальной генерации ПД при состоянии бодрствования.

Высокопороговый Ca^{2+} -ток (L-ток), активируемый только при значениях более МП ~ -30 мВ и медленно инактивируемый при деполяризации, участвует в активации Ca^{2+} -активируемого K^+ -тока.

4. Синаптические потенциалы

Передача возбуждения от клетки к клетке в нервной системе осуществляется при помощи специальной структуры, называемой синапсом. Особый интерес представляет механизм химической синаптической передачи. На нервно-мышечных препаратах лягушки было показано, что ПД распространяется по аксону только до последнего миелинизированного сегмента. Конечные немиелинизированные терминалы возбуждаются благодаря пассивному электротоническому распространению потенциала. Такая пассивная деполяризация приводит к открыванию натриевых и кальциевых каналов терминалы. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция ведет к слиянию пузырьков, содержащих медиатор, с пресинаптической мембраной и высвобождению медиатора в синаптическую щель. Молекулы медиатора диффундируют через синаптическую щель и взаимодействуют со специфическими рецепторами, расположенными на постсинаптической мембране. Взаимодействие медиатора с рецептором приводит к открыванию ионного канала и изменению потенциала на постсинаптической мембране.

Наряду с процессами возбуждения в ЦНС развивается также и противоположный процесс, называемый торможением. При внутриклеточной регистрации с двигательных нейронов спинного мозга Дж. Экклс обнаружил как *возбуждающие постсинаптические потенциалы* (ВПСП), так и *ингибирующие (тормозные) постсинаптические потенциалы* (ИПСП, или ТПСР). Различие между ними состоит в том, что при возбуждении увеличивается способность генерации ПД, а при торможении она подавляется. Наиболее широко в нервной системе представлены такие возбуждающие нейромедиаторы, как *ацетилхолин*, *норадреналин*, *глутамат* и другие. Основным тормозным нейромедиатором является *γ-аминомасляная кислота* (ГАМК).

Если проводить афферентную электрическую стимуляцию клеток гиппокампа или пирамидальных клеток коры человека, на постсинаптической мембране наблюдается быстрый ВПСП, за которым следует двухфазное изменение уровня МП (ИПСП). Известно, что возбуждение нейрона (в частности ВПСП) осуществляется благодаря высвобождению *глутамата* при стимуляции афферентных окончаний, тогда как последующее торможение (ИПСП) осуществляется благодаря высвобождению *ГАМК* ГАМК-эргическими интернейронами. ГАМК активирует два типа рецепторов на постсинаптической мембране. *ГАМК_A-рецептор* является хлорным каналом. *ГАМК_B-рецепторы* являются медленными метаботропными рецепторами, ассоциированными с калиевыми каналами посредством G-белка. ГАМК-эргические нейроны в свою очередь возбуждаются глутамат-эргическими афферентными окончаниями и способны генерировать несколько импульсов в ответ на короткую стимуляцию.

После блокады торможения путем блокирования ГАМК-рецепторов ВПСП увеличивается. В реальных нейронных сетях такое возрастание амплитуды ВПСП после блокирования ГАМК-

рецепторов может привести к «блуждающему» возбуждению между вставочными возбуждающими нейронами и далее к эпилептическому припадку. При фармакологическом лечении эпилепсии основной задачей является обеспечение баланса между развитием процессов возбуждения и торможения.

При действии возбуждающего медиатора глутамата ВПСП может возникать при активации двух типов постсинаптических рецепторов, которые селективно активируются агонистами AMPA и NMDA. Вклад NMDA-рецепторов в ВПСП ответ нейрона обладает сложной зависимостью от потенциала: он становится больше при деполяризации, особенно при приближении к потенциалу реверсии. Изменяя внеклеточную концентрацию различных ионов, можно убедиться, что $[Mg^{++}]_o$ играет важную роль в формировании зависимости ВПСП от потенциала. В результате удаления экстраклеточного Mg^{++} амплитуда ВПСП увеличивается. *NMDA* и *AMPA-глутаматные* рецепторы являются одновременно ионными каналами, при активации они наряду с одновалентными катионами пропускают внутрь клетки также ионы кальция. NMDA-рецепторы также могут обладать выраженной потенциалозависимостью при гиперполяризации мембраны нейрона, когда отрицательный заряд цитоплазматической поверхности клеточной мембраны способствует проникновению внутрь Mg^{++} . Связавшись с участком NMDA-канала, ионы Mg фиксируются и, соответственно, блокируют прохождение через него других ионов. Однако при деполяризации мембраны сродство Mg^{++} к участку NMDA-каналов значительно снижается и каналы становятся открытыми для прохождения других ионов.

Краткое описание работы модели

Настоящая модель создана исходя из предположений впервые предложенных и формализованных А.Ходжкиным и А.Хаксли в 1952. В данном случае используется одна из модифицированных систем, известная как однокомпарментная. В отличие от реальных клеток в данной модели все ионные потоки пересекают мембрану в одном участке и не рассматриваются активные или пассивные процессы переноса ионов вдоль клетки или диффузии из рассматриваемого компартмента. Хотя эта модель представляет собой довольно грубое упрощение реального процесса функционирования нейронов, поведение выбранной однокомпарментной модели все же напоминает функционирование нервной клетки, а также значительно быстрее анализируется, что важно для понимания элементарных процессов нейрофизиологии.

Для успешного моделирования ионных токов в нейронах необходимо знать следующее:

1. Потенциал реверсии
2. Зависимость активации и инактивации от потенциала
3. Кинетика активации и инактивации при различном значении МП
4. Максимальная проводимость клетки (какой будет общая проводимость при всех открытых каналах)

Активирующий ток. Для простоты рассмотрим ток, который не инактивируется. Примерами неинактивирующихся токов является М-ток и реполяризирующий K^+ -ток, I_K . Ходжкин и Хаксли моделировали I_K с помощью следующего соотношения:

$$I_K = n^4 g_K (E - E_K), \quad (1)$$

где n -активационная переменная, g_K - максимальная проводимость, E - равновесный потенциал для K^+ (напомним, что по закону Ома $V=IR$ или $I=VG$, т.к. $G=1/R$. Здесь $I=I_K$, $G=g_K$, V соответствует силе, действующей на K^+ , т.е. $E-E_K$). n - переменная, зависящая от времени и потенциала, которая подчиняется кинетическому уравнению первого порядка:

$$1-n \leftrightarrow n \quad (2)$$

Таким образом, состояние « n » является пропускающим (т.е. канал открыт или активирован) для тока, идущего через мембрану. Поскольку все каналы находятся или в открытом, или в закрытом состоянии в сумме эти две составляющие дают 1. Процесс перехода из состояния $1-n$ к состоянию n - активация тока, наоборот - дезактивация. Скорость перехода от закрытого состояния к открытому определяется переменной α , обратный процесс - β . Скорость изменения n можно записать следующим дифференциальным уравнением:

$$dn/dt = \alpha(1-n) - \beta n \quad (3)$$

Другими словами, величина тока, текущего через мембрану, определяется числом каналов, переходящих в открытое состояние, минус число каналов, перешедших в закрытое состояние. Если предположить, что МП остается постоянным, и n не меняется ($dn/dt=0$ (обозначим $n=const$ n_E), то

$$\alpha \times (1-n_E) - \beta \times n_E = 0 \quad (4)$$

тогда

$$n_E = \alpha / (\alpha + \beta) \quad (5)$$

Общее решение уравнения 3 будет

$$n = n_E \times [1 - \exp(-t/\tau)], \quad (6)$$

где t - время, τ - временная константа, определяемая как

$$\tau = 1 / (\alpha + \beta) \quad (7)$$

Решая уравнения 5 и 7 для α и β находим, что

$$\alpha = n_E / \tau \quad (8)$$

$$\beta = (1-n_E) / \tau \quad (9)$$

Подставив уравнения 8 и 9 в уравнение 3, получим соотношение

$$dn/dt = (n_E - n) / \tau \quad (10)$$

Обычно три переменные определяются через экспоненциальное соотношение с МП: активационная переменная n_E , которая является частью тока при данном МП при постоянных условиях (в отсутствие инактивации); $\tau_{\text{активации}}$ - константа времени активации тока и

$\tau_{\text{деактивации}}$ - константа времени дезактивации тока. Константа времени τ Ходжкина и Хаксли определяется через $\tau_{\text{акт}}$ и $\tau_{\text{дезакт}}$. Фактически, функция τ выбрана для оптимального определения взаимосвязей, описываемых $\tau_{\text{акт}}$ и $\tau_{\text{дезакт}}$. Поскольку активация и дезактивация - противоположные процессы, эта функция имеет вид колоколообразной кривой, в одной части которой определяющую роль играет $\tau_{\text{дезакт}}$, в другой - $\tau_{\text{акт}}$. Дав точное описание активации при постоянных условиях (n_E) и кинетики активации (τ), можно использовать полученные уравнения для моделирования поведения токов в аксоне или нейроне.

Инактивирующиеся токи. Многие токи инактивируются после активации при приложении постоянной разности потенциалов. Процесс инактивации может быть описан таким же образом, что и активация. Примерами подобных токов являются I_{Na} , I_T , I_A . Быстрый Na^+ -ток, лежащий в основе генерации ПД, был описан Ходжкиным и Хаксли с помощью следующего уравнения:

$$I_{Na} = m^3 \times h \times g_{Na} \times (E - E_{Na}), \quad (11)$$

где m - активационная переменная, h -инактивационная. Как и m , h может находиться в состоянии, пропускающем и непр пропускающем ток (канал инактивирован или дезактивирован). Простые переходы первого порядка между этими двумя состояниями могут быть представлены, так же как и для n :

$$1-h \leftrightarrow h, \quad (12)$$

отсюда получаются все уравнения, представленные ранее. Переход из пропускающего (открытого) состояния « h » в непр пропускающее « $1-h$ » соответствует инактивации тока, а переход в обратном направлении - снятию инактивации, или дезактивации. Напомним, что для прохождения тока через канал все ворота должны быть открыты. Таким образом, для Na -канала должны быть открыты три активационных ворот (m) и один инактивационный (h). Именно подобная зависимость проводимости канала от состояния ворот наделяет Na - каналы их довольно таки сложным механизмом открывания и закрывания и поэтому общий ток через мембрану активируется с некоторой задержкой, а затем инактивируется.

Компьютерная обработка модели

Метод фиксации потенциала. При выполнении экспериментов по фиксации потенциала на настоящих нейронах величина тока, прикладываемого с помощью электродов, устанавливается таким образом, чтобы напряжение на плазматической мембране нейрона оставалось постоянным. Этот прием используется при описании различных потенциалозависимых и кинетических характеристик мембранного тока. Результаты предсказанные моделью хорошо описывают поведение нейрона в «реальной жизни». В нашем случае компьютерная модель в условиях фиксации потенциала на мембране нейрона предполагает наличие абсолютной фиксации на всем протяжении нейрона и одинаковый ответ всех участках мембраны клетки (однокомпарментная модель). В данной модели нейрональные токи уравновешены за период, предшествующий

приложению разности потенциалов, что может наблюдаться и в «реальном» нейроне, если МП будет удерживаться на определенном уровне в течение периода времени, большего, чем скорость активации, дезактивации, инактивации или дезинактивации тока в канале. При приложении фиксированной разности потенциалов кинетика неинактивирующегося тока может быть представлен как:

$$I_x(t) = g_x \times (E - E_x) \times [n_E - (n_E - n_{t-1}) \times e^{-(\Delta t/\tau)}], \quad (13)$$

где X - некоторый ток, n_E - значение n при стационарных условиях, $n_{(t-1)}$ - значение n в предыдущий момент времени, Δt - шаг времени, использующийся в модели. Расчет временного хода тока зависит от шага времени, размер которого определяется числом заданных точек. После каждого шага общий ионный ток через мембрану, определяется как арифметическая сумма отдельных токов. И наконец, ток через мембрану и напряжение после расчета их значений для каждого промежутка времени отображаются на экране в виде графика.

Метод фиксации тока. В этом методе к клетке прикладывается импульс постоянного тока и наблюдается соответствующее изменение МП. Моделирование фиксации тока обеспечивается за счет очень маленького шага времени (~5мксек), численного решения изменений всех токов методом интегрирования, расчета изменения МП, основанного на этих изменениях токов и работы уже с новым значением МП на следующем шаге. В методе фиксации тока изменение МП в единицу времени описывается как:

$$\Delta V/\Delta t = (I_{\text{ПРИКЛАДЫВАЕМЫЙ}} + I_{\text{Na}} + I_{\text{K}} + I_{\text{A}} + I_{\text{T}} + I_{\text{L}} + I_{\text{C}} + I_{\text{АНР}} + I_{\text{M}} + I_{\text{KLEAK}} + I_{\text{NALEAK}}) / C_n, \quad (14)$$

где C_n - общая емкость мембраны (в представленной модели 0.29 нФ). Величина каждого ионного тока в каждый промежуток времени рассчитывается согласно уравнениям 1-13.

Литература для самостоятельной подготовки:

1. Рубин А.Б., Биофизика: в 2-х томах, М.: "Университет", 2000. Т.2, гл.19, гл.23, п. 1,2,3.
2. Физиология человека: в 3-х томах под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса, М.: Мир, 1996. Т.1, гл.1, с.13-14, гл.2, п.2.1, 2.2, 2.6, гл.3, п.3.1.

Методические указания к задаче

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИМОЙ КЛЕТКИ .

Раздел 1: Потенциал покоя

Для проведения модельных экспериментов в данной задаче используются компьютерные программы C-CLAMP и V-CLAMP (Huguenard J., McCormik D.A. *Electrophysiology of neuron. Interactive Tutorial. Oxford, N-Y., 1994*), в основе которых лежит математическая модель, описанная в предыдущих разделах. Для запуска программы напечатайте C-CLAMP в командной строке C:\NEURON> в DOS и нажмите Enter. После этого на мониторе появится таблица. Далее

используйте клавишу «O» для открытия файла параметров и откройте файл REST.CCS. Теперь вы готовы к проведению модельных экспериментов, которые запускаются нажатием клавиши «B».

Опыт 1: Равновесный потенциал

Первый эксперимент демонстрирует динамику развития ПП на мембране гигантского аксона кальмара. В предлагаемой модели мембрана проницаема для двух ионов - Na^+ и K^+ . Известно, что проницаемость этих ионов (p_{Kleak} и p_{NaLeak}) определяет параметры ПП клеточной мембраны, который можно рассчитать по уравнению ГХК. Термин «утечка» (leak) отражает тот факт, что проницаемость мембраны для этих ионов не меняется при варьировании МП, хотя и вносит существенный вклад в величину ПП. Для того, чтобы промоделировать влияние проницаемости по K^+ и Na^+ на ПП, нужно нажать клавишу «R» (Return) и вернуться в меню (это необходимо делать после каждой операции моделирования). Далее переместите курсор к $p_{\text{NaLeak}}=0.06$, а потом замените фиксированное значение на другое (скажем 0) и нажмите «B» (begin, для начала моделирования). Обратите внимание, что МП быстро меняет свое значение с -65 мВ на -100 мВ, что соответствует равновесному потенциалу для K^+ . На самом деле, содержание K^+ гораздо больше внутри клетки, чем снаружи и в ходе моделирования изменений ПП при фиксации МП на уровне -65 мВ, ионы перемещаются по градиенту концентрации (выходят из клетки). Важно отметить, что в данном случае, наблюдается перемещение ионов через мембрану при МП далеких от равновесного потенциала. Число переносимых ионов в действительности очень мало в сравнении с их концентрацией в клетке или омывающей среде и поэтому изменения концентраций иона с обеих сторон мембраны незначительны.

Опыт 2: Влияние изменения концентраций ионов на ПП

Нажмите клавишу «R» и измените внеклеточные концентрации K^+ , $[\text{K}^+]_o$. Например, замените исходное значение концентрации ионов калия на 135мМ, так чтобы $[\text{K}^+]_o$ стала равной $[\text{K}^+]_i$. Используйте клавишу Y (overlay), чтобы добиться сопоставления картины этой и предыдущей модели. Отметим, что теперь величина МП становится равной 0мВ, поскольку отсутствует трансмембранный градиент концентрации для K^+ . Чтобы изучить вклад в формирование МП проводимости мембраны только для Na^+ , нажмите «O» (open) и перезагрузите REST.CCS файл. Нажмите клавишу «B» для повторения эксперимента при контрольных условиях (т.е. при нормальных величинах проницаемости Na^+ и K^+ в состоянии покоя). Теперь выбрав $p_{\text{Kleak}}=1$ и, изменив фиксированное значение на 0, вы можете нивелировать вклад K^+ в МП. Нажав Y, Вы обнаружите, что величина МП устанавливается на уровне равновесного потенциала для Na^+ (+41 мВ). В случае, когда через плазматическую мембрану возбудимой клетки проникает более одного иона, МП становится пропорционален сумме равновесных потенциалов и относительных проницаемостей мембраны для каждого из этих ионов. Это можно проверить, меняя p_{NaLeak} и p_{Kleak} . Выберите $p_{\text{Kleak}}=0$ и измените это значение на 10. Нажав «B» Вы

обнаружите, что МП теперь гораздо ближе к E_k (-100 мВ), чем при $rK_{leak}=1$. Известно, что в норме ПП определяется главным образом распределением K^+ , т.к. мембрана более проницаема для K^+ , чем для Na^+ .

Опыт 3: Пассивные свойства мембраны

В реальном эксперименте с помощью специальных электронных усилителей с обратной связью можно не только регистрировать изменения МП в аксонах или нейронах, но и непосредственно менять МП клетки, вводя в «клетку» определенный электрический ток. В результате электрический ответ клетки сопровождается либо изменениями пассивных электрических свойств плазматической мембраны, либо генерацией ПД, обусловленной активацией мембранных ионных каналов.

Используя клавиши «О» и «В», запустите файл PASSIVE.CCS. В данной модельной ситуации будет показано, что при приложении прямоугольного импульса тока малой величины у мембраны обнаруживается только вклад пассивных свойств мембраны, обусловленных ее сопротивлением и емкостью. Действительно, замедление возрастания или снижения МП при включении (или выключении) прикладываемого электрического импульса обусловлено тем, что мембрана ведет себя как электрическая схема при параллельном соединении емкости и сопротивления. Известно, что соотношение между напряжением, силой тока и сопротивлением проводника описывается законом Ома, согласно которому $V=IR$, где V - напряжение в вольтах, R - сопротивление в омах, I - сила тока в амперах. Проводимость – это величина, обратная сопротивлению (измеряется в сименсах и обозначается g), $g=1/R$. С учетом этого закон Ома можно записать в виде $V=Ig$. В практике часто используют эти соотношения для характеристики проводимости клетки (измеряя отклонения V от стационарного уровня при приложении импульса постоянного тока известной силы). Напомним, что сила тока - это мера скорости потока зарядов по проводнику, так что 1А эквивалентен 1 Кл/сек. Поскольку 1 Кл = 6.25×10^{18} электронов, 1А = $6.25 \cdot 10^{18}$ е⁻/сек. Напряжение 1В соответствует произведению 1А и 1Ом или 1А/1См. Отметим, что проводимость биологических мембран непосредственно связана с проницаемостью для соответствующих ионов.

Вопросы:

- 1.Какие два фактора влияют на транспорт ионов через мембрану?
- 2.Что обозначают термином «равновесный потенциал» для отдельного иона?
- 3.Почему равновесный потенциал для K^+ -100 мВ, а для Na^+ +41 мВ, хотя оба являются положительно заряженными ионами?

4.При нормальных условиях МП= -65 мВ. Каким он будет, если установить обратные концентрации K^+ и Na^+ по разные стороны мембраны? Запустите REST.CCS и измените концентрации одновременно Na^+ и K^+ на обратные, проверьте правильность своего ответа.

5.Запустите PASSIVE.CCS и выясните, что произойдет с МП в ответ на деполяризующий импульс, если удвоить и rK_{leak} , и rNa_{leak} ? Проверьте правильность ответа. Объясните результат.

Раздел 2: Потенциал действия

Опыт 4: Активные свойства мембраны

При приложении к мембране нервной клетки импульса электрического тока Вы можете превысить порог возбуждения и вызвать генерацию ПД. Данный процесс моделируется в файле параметров PASSIVE.CCS, при изменении величины Injected current (nA) с 1.5 на 2.0. Для проведения эксперимента нажмите клавишу «В». Действительно, увеличение амплитуды прикладываемого импульса деполяризует мембрану аксона до величины, превышающей пороговое значение необходимое для генерации ПД. Отметим, что пик ПД превышает 0 мВ, свидетельствуя о том, что ПД генерируется не только за счет простого увеличения суммарного тока мембраны, но является комплексным процессом активации различных проводимостей мембраны.

Опыт 5: Влияние различных ионов на генерацию импульсов

Чтобы изучить, вклад различных ионов в процесс генерации ПД, Вы можете изменить их концентрации в экстраклеточной среде (искусственная «морская вода») и наблюдать за кинетикой процесса генерации ПД. Как Вы знаете, в морской воде (раствор близкий по составу экстраклеточной среде аксона) в значительных количествах содержатся ионы Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} и Cl^- . Например, попробуйте изменить концентрацию $[Mg^{++}]_o$ до значения 0.1. Снова приложите электрический импульс к клетке и сравните с результатом последнего эксперимента («Y»). С помощью проведенного эксперимента можно доказать, что уменьшение концентрации Mg в омывающей среде не оказывает заметного влияния ни на ПП, ни на ПД. Повторите этот эксперимент, меняя концентрации $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$, $[Cl^-]_o$ и $[Ca^{++}]_o$ до низких значений (0.1 мМ). Нажатием клавиши «В» Вы сможете получить новый вариант модели после каждого внесенного изменения. Помните, всегда можно восстановить исходные значения, загружая файл PASSIVE.CCS клавишей «О».

Серией проведенных экспериментов покажет, что особую роль в генерации ПД играют исключительно ионы Na^+ и K^+ . Если уменьшить внеклеточную концентрацию ионов Na до 0.1, то можно обнаружить два эффекта. Во- первых, МП становится гораздо более отрицательным. Этот факт связан с тем, что в норме пассивный ток ионов Na в клетку увеличивает ПП мембраны, вызывая ее деполяризацию до -65 мВ, а в отсутствие этого тока мембрана гиперполяризуется. Для

того, чтобы скомпенсировать эффект гиперполяризации, к клетке можно приложить импульс, который вновь изменит МП до значения -65 мВ. Для выполнения такого эксперимента выберите Base current (nA) = 0 и замените 0 на 2.25, а затем нажмите на клавишу «В». Видно, что ПД так же заблокирован, что указывает на важность внеклеточного Na для генерации ПД. Даже если увеличить прикладываемый импульс до 4 нА, то плазматическая мембрана возбудимой клетки все равно не будет способна генерировать ПД.

Далее рассмотрим роль ионов К в процессе генерации ПД. Снова перезагрузите PASSIVE.CCS с помощью «О» и запустите этот файл с помощью клавиши «В». Далее уменьшим $[K^+]_o$ до значения 0.1 мМ и нажмем клавишу «Y». Докажем, что подобная манипуляция приводит к гиперполяризации мембраны (согласно уравнению Нернста и ГХК), а значит, утечка ионов К через мембрану действительно определяет величину ПП мембраны.

Для компенсации вызванных изменений потенциала мембраны, приложим к клетке импульс постоянного тока (изменив значение Base current (nA) на 0.8 мА и запустив программу нажатием клавиши «В»). Теперь мы видим, что, в отличие от $[Na^+]_o$, уменьшение $[K^+]_o$ не препятствует генерации ПД, хотя фаза гиперполяризации ПД становится более выраженной, чем изначально. Этот процесс можно легко наблюдать непосредственно на экране вашего компьютера, перезагрузив PASSIVE.CCS («О») (амплитуда возбуждающего импульса 2 нА) и нажав «Y».

Опыт 6: « эксперимент с зубной пастой»

Известно, что Бакер, Ходжкин и Шоу (1962), используя большой диаметр гигантского аксона кальмара, смогли выдавить аксоплазму (как зубную пасту из тюбика) и заполнили аксон средой с различными концентрациями ионов. Чтобы воспроизвести этот эксперимент (с «зубной пастой»), нажмите «О», выберите REST.CCS и запустите («В»). Вы можете уменьшить $[K^+]_i$, изменив фиксированное значение до 0.1 мМ. Затем нажмите «В» и Вы увидите, что МП принял значение большее, чем значение равновесного потенциала для Na^+ (+41 мВ) (Какое? Почему?). Для компенсации этого эффекта измените Base current (nA) на -3 нА и снова нажмите «В». Значение МП вернулось к исходному уровню.

Для того, чтобы выяснить, как $[K^+]_i$ влияет на генерацию ПД откройте файл PASSIVE.CCS и установите значение Injected current (nA) = 2 для получения ПД. Затем подставьте значения $[K^+]_i$ = 0,1 и Base current (nA) = -3 нА для компенсации МП. Теперь, когда аксон генерирует ПД, реполяризации не происходит. Полученный результат доказывает, что выход ионов K^+ наружу имеет решающее значение для процесса реполяризации при развитии ПД.

Опыт 7: Метод фиксации потенциала для анализа токов Na^+ и K^+

Для воспроизведения эксперимента Ходжкина и Хаксли по фиксации мембранного потенциала клетки, выйдем из программы C-CLAMP (нажмите «Q» (quit) в меню). Для

выполнения экспериментов выберите файл V-CLAMP в командной строке DOS. Нажмите клавишу «О» и загрузите Na_K.VCS (далее нажмите «В»). В этом модельном опыте Вы меняете МП от -100 мВ до 0 мВ, определяя силу тока, которую нужно приложить к аксону для фиксации стационарной величины МП. В такой ситуации регистрируемый ток эквивалентен току через ионные каналы. Отметим, что в ходе эксперимента сначала наблюдается ток, направленный внутрь (ток положительно заряженных ионов в клетку), а затем - наружу.

Опыт 8: Влияние изменения концентрации ионов на ионные токи

Заменим внеклеточную концентрацию Na^+ , приравняв ее к внутриклеточной (введите $[Na^+]_o=30$). Поскольку в этом эксперименте концентрации ионов Na по обе стороны мембраны выравнены, то равновесный потенциал для этого иона стал равным 0 мВ и при заблокированном токе Na^+ можно будет наблюдать только ток K^+ . Теперь восстановим исходное значение для $[Na^+]_o=145$ и заменим $[K^+]_i$ с 135 мМ до 3.1 мМ (блок K^+ -тока). Нажатием клавиши «В» Вы наглядно убедитесь в генерации в этих условиях только Na^+ -тока. Обратите внимание, что Na^+ и K^+ токи отличаются по ряду признаков: Na-ток активируется быстрее и инактивируется при постоянном МП, в то время как K-ток не инактивируется. Это доказывает то, что Na-ток является инактивирующимся, а K-ток неинактивирующимся. Данный факт обусловлен различиями в строении этих потенциалозависимых каналов.

Опыт 9 : Зависимость Na - и K- токов от потенциала

Далее рассмотрим зависимость проницаемости этих двух ионных токов от МП более детально. При выполнении этого модельного эксперимента будем последовательно прикладывать к мембране различный потенциал и оценивать изменения кинетики величины тока. Нажмите «О» и загрузите файл Na_K_IV.VCS. Далее используйте клавишу «I» (individual steps) каждый раз после проведенной симуляции. Каждое нажатие клавиши увеличит МП аксона на 10 мВ, что позволит Вам воспроизвести данные, полученные на перехвате Ранвье аксонов Б. Хиллом.

Для проведения следующего исследования воспользуемся рядом фармакологических препаратов (ингибиторный анализ), которые селективно блокируют Na и K - токи. Известно, что тетродотоксин (TTX), выделенный из рыбы фугу, высокоэффективно и селективно блокирует Na-токи. С помощью модели можно воспроизвести блокирование каналов, снижая максимальную проводимость для Na^+ (g_{Na} (mS)) до 0. После блока Na-тока несколько раз нажмите «I» и обратите внимание на изменения амплитуды и длительность K-тока. Затем снова установите $g_{Na}=10$.

Теперь рассмотрим следующий фармакологический препарат тетраэтиламмоний (ТЭА), который является блокатором K-каналов. Его действие на аксон можно моделировать, установив $g_K=0$. Опять несколько раз нажмите «I» и обратите внимание на амплитудную и временную зависимость изолированного Na-тока.

Опыт 10: Анализ амплитуды и кинетики индивидуальных токов

Далее воспользуемся данной моделью для оценки изменений амплитуды и кинетики токов и ионных проводимостей, выполняющих существенную роль в генерации ПД. Для этого выйдем из программы V-CLAMP (нажмите «Q» на экране меню) и запустим файл C-CLAMP, а затем загрузим и запустим файл GNA_K.CCS с помощью клавиши «O» и «B». На мониторе Вы увидите кинетику генерации ПД, а также изменения амплитуды и кинетики Na- и K- проводимостей.

Обратите внимание на то, что по мере увеличения Na-проводимости мембрана все более и более деполяризуется. Вход ионов Na в клетку приводит к деполяризации мембраны и, соответственно, активации все большего числа Na-каналов. Таким образом, в данном случае клетка быстро деполяризуется за счет механизма положительной обратной связи. Далее МП увеличивается и превышает 0 мВ, пытаясь достичь значения равновесного потенциала для ионов Na⁺ (+41 мВ). Однако в тоже время, но с меньшей скоростью, возрастает проводимость мембраны для K⁺, что обеспечивает выход K⁺ из клетки, компенсируя изменения МП связанные с входом Na⁺. Этот выходящий ток K⁺ не позволяет изменениям МП при ПД достичь значения равновесного потенциала для натрия. Инактивация Na-проводимости и активация K-проводимости обеспечивают начало фазы реполяризации ПД.

Теперь проведем исследование динамики развития токов Na⁺ и K⁺ при генерации ПД. Для этого загрузим файл ACTN_POT.CCS с помощью клавиш «O» и «B». Внизу на экране монитора Вы обнаружите ход процессов активации и инактивации Na-тока при генерации ПД. Обратите внимание, что степень активации Na-тока (на графике обозначено как mNa) достигает максимального уровня, хотя одновременно возрастает степень инактивации.

Вопросы:

1. Какой ион играет определяющую роль в развитии фазы деполяризации при генерации ПД, а какой - в развитии фазы реполяризации? Как движутся эти ионы - внутрь или наружу?

2. Что означают термины активация и дезактивация? Инактивация и дезинактивация? Насколько это важно при рассмотрении Na-тока при генерации ПД?

3. Сравните скорости активации Na- и K- токов. (Можно воспользоваться V-CLAMP Na_K.VCS). Какой ток, Na- или K-ток, активируется при более отрицательных значениях МП? (V-CLAMP Na_K_IV.VCS). Почему это важно для процесса генерации ПД?

4. Почему величина ПД не достигает значений равновесного потенциала для Na⁺? (внимательно изучите ионные токи в ACTN_POT.CCS)

5. Какие четыре фактора определяют амплитуду ионных токов в любой момент времени?

Раздел 3: Нейрофизиологические свойства нейрона

Опыт 11: Свойства быстрого K⁺-тока (A-ток)

Рассмотрим A-ток, исследуя его влияние на спонтанную ритмическую активность нервной клетки. Из программы C-CLAMP загрузите и запустите IA.CCS (клавиши «O» и «B»). На мониторе Вы увидите, что генерация ПД замедлена, а A-ток сначала возрастает и затем уменьшается.

В эксперименте амплитуда A-тока может быть достаточно снижена при действии блокатора K-канала - 4-аминопиридина. В модельных экспериментах Вы заблокируете A-ток, уменьшая его максимальную проводимость (gA) до 0. После снижения gA с 1 до 0 нажмите «Y» и сравните характер спонтанного ритмического ответа с A-током и без него. Очевидно, что активация A-тока во время деполяризации клетки приводит к замедлению частоты генерации ПД, но не сказывается существенным образом на форме ПД.

Далее выйдем из программы C-CLAMP и запустим V-CLAMP. Загрузите файл IA.VCS клавишей «O» и несколько раз нажмите «J». Деполяризация клетки электрическим током приводит к активации и затем инактивации A-тока, направленного наружу, а возрастание уровня деполяризации - к усилению тока. Важно, что к росту амплитуды приводит как активация тока, так и увеличение «движущей силы» транспорта K⁺, поскольку мы сдвигаем МП к Ек. Попробуем увеличить внеклеточную концентрацию K⁺: изменим [K⁺]_o с 3.1 мМ до 25 мМ (таким образом меняется равновесный потенциал для K⁺ с -100 мВ на -60 мВ). Используя «I» и меняя напряжение, Вы обнаружите, что теперь A-ток не всегда направлен наружу.

Сначала активируются токи, направленные внутрь клетки, так как ток активируется при МП, более отрицательном по отношению к потенциалу реверсии для K⁺, следовательно, ионы K⁺ движутся в клетку, а не из нее.

Опыт 12: I_c и I_h – Ca²⁺-активируемый K⁺-ток и высокопороговый Ca²⁺-ток

Для моделирования Ca²⁺-зависимого K⁺-тока мы должны учитывать не только сам K⁺-ток, но и Ca²⁺-ток, возникающий при генерации ПД. К предыдущей модели добавим высокопороговый (активируемый только при значениях более МП ~ -30 мВ) Ca²⁺-ток (обозначим который как I_h) и Ca²⁺-зависимый K⁺-ток (обозначим который как I_c).

Для проведения исследований запустите программу C-CLAMP и затем загрузите файл IC.CCS. При реализации программы Вы убедитесь, что во время генерации ПД внутриклеточный уровень Ca²⁺ возрастает. Такое увеличение [Ca²⁺]_i приводит к активации направленного наружу тока K⁺ (I_c), что и приводит к реполяризации мембраны.

Чтобы поверить данное предположение, передвиньте курсор на [Ca²⁺]_o и уменьшите исходное значение до концентрации 0.1 мМ. Потом нажмите клавишу «Y». Отметим, что I_c в данный момент активирован минимально, а амплитуда следовой (остаточной) гиперполяризации снизилась. Однако видно, что по форме ПД не растянулся во времени, как мы могли бы

предполагать, основываясь на том, что ток I_C почти полностью блокирован. Этот факт объясняется тем, что другой K^+ -ток (I_K) становится больше за счет некоторого увеличения длительности и амплитуды ПД, и частичной компенсации отсутствующего тока I_C . Важно подчеркнуть, что при функционировании нейрона ионные токи взаимодействуют довольно сложным образом.

Опыт 13: $I_{АНР}$ -медленный Ca^{2+} -зависимый K^+ -ток - регулятор клеточного возбуждения

Для ряда нейронов выявлен другой тип Ca^{2+} -активируемого K^+ -тока. Например, внутриклеточная деполяризация пирамидальных нейронов неокортекса человека импульсом тока (тонкий срез ткани мозга, полученный при нейрохирургическом лечении эпилепсии и сохраненный в специальной камере *in vitro*) приводит к генерации серии ПД, сопровождающейся следовой гиперполяризацией клеточной мембраны. Такая следовая гиперполяризация - главным образом результат активации медленного K^+ -тока, $I_{АНР}$, который генерируется за счет входа Ca^{2+} при проведении серии ПД.

При генерации ПД Ca^{2+} поступает в клетку через Ca^{2+} -каналы, активирующиеся при высоких напряжениях стимулирующего клетку импульса. Увеличение количества внутриклеточного Ca^{2+} активирует $I_{АНР}$, который затем гиперполяризует мембрану клетки и приводит к уменьшению частоты генерации ПД (процесс известен как «частотная адаптация»). Активация различных рецепторов, включая ацетилхолиновые (мускариновые) рецепторы, локализованных на мембране пирамидальных клеток коры, уменьшает $I_{АНР}$ и, соответственно, повышает частоту генерации ПД. Данное увеличение возбудимости пирамидальных клеток коры является важным фактором, обеспечивающим поддержание активности коры мозга во время бодрствования и в состоянии усиления внимания, а также во время сна со сновидениями; и, наоборот, клетки коры становятся менее возбудимыми в состоянии дремоты, расслабленности и во время сна без сновидений.

Для рассмотрения модели тока $I_{АНР}$ в программе C-CLAMP запустите файл IАНР.CCS клавишами «О» и «В». Обратите внимание, что во время генерации серии ПД частота импульсов уменьшается и наблюдается явление следовой гиперполяризации.

Исследование поступления Ca^{2+} в клетку и кинетики изменения амплитуды $I_{АНР}$ с помощью компьютерной модели позволяет предположить, что увеличение внутриклеточного Ca^{2+} приводит к активации этого тока. Для имитации блокады $I_{АНР}$ в пирамидальных клетках коры человека при действии ацетилхолина, уменьшив значение $g_{АНР}$ до 0 и нажмем «Y».

Отметим, что в данном случае нейрон генерирует серии ПД с большей частотой, а эффект частотной адаптации не обнаруживается. Вы сами можете оценить зависимость величины этого тока от экстраклеточной концентрации Ca^{2+} , уменьшив $[Ca^{++}]_o$ до 0.1 мМ и вернув $g_{АНР}$ значение 0.06 nS.

Опыт 14: Моделирование состояния сна и бодрствование на примере отдельного нейрона: I_T - быстрый, низкопороговый Ca^{++} -ток

Чтобы изучить свойства этого тока, загрузите и запустите IT.CCS из C-CLAMP с помощью клавиш «О» и «В». Обратите внимание, что при деполяризации клетки наблюдается генерация пачки ПД и это соответствует пику медленного Ca^{2+} -спайка. Кинетику изменения амплитуды тока, обуславливающего этот медленный спайк, Т-ток, можно увидеть на экране дисплея. Теперь деполяризуем мембрану нейрона до -60 мВ, изменив Base current (nA) на 0.18 и Starting Vm (mV) на -60 мВ, нажмите «В». Сейчас мембрана клетки способна генерировать серии ПД с постоянным интервалом без формирования каких-либо пачек ПД! Отсутствие пачек при генерации серии ПД указывает на то, что обеспечивающий данный процесс ток, в сильной степени является потенциалозависимым и инактивируется при деполяризации.

Проверим данное предположение и отделим медленный спайк от генерации серии ПД с помощью блокатора Na-канала, ТТХ. Загрузите файл IT.CCS и измените значение $g_{Na}=15$ на 0, моделируя блокирование потенциалозависимой Na-проводимости. Теперь нажмите «В» для повторного приложения импульса тока и отметьте появление медленного ПД на вершине пассивного ответа мембраны. Скорость тока, обеспечивающего данный ПД, значительно ниже по сравнению со скоростью тока генерирующего ПД, что вызывает длительную деполяризацию клетки. Далее проведем исследование зависимости данного эффекта от концентрации ионов в омывающем растворе. Докажите, что уменьшение $[Ca^{++}]_o$ до 0.1 мМ блокирует ПД. Этот факт может свидетельствовать о том, что медленный ПД запускается входом Ca^{2+} в клетку. Этот Ca^{2+} -ток обозначают как Т-ток и называют быстрым.

Опыт 15: I_m - медленно активирующийся K^+ -ток

Загрузим файл IM.CCS в программе C-CLAMP. Сначала проведем исследование возбудимости нервной клетки до аппликации ацетилхолина, а потом промоделируем эффект высвобождения ацетилхолина, уменьшая g_m до 0.

Отметим, что возбудимость нейрона значительно возросла, так что нейрон генерирует пачки ПД, а не один ПД. Возможно, что это осуществляется за счет Ca^{2+} -активируемого K^+ -тока. Вы можете это доказать (после перезагрузки IM.CCS), уменьшая $[Ca^{2+}]_o$ до 0.1 мМ и наблюдая отсутствие изменений в процессе генерации ПД.

Вопросы:

1. В чем заключается главное отличие между А-током и K^+ -током, реполяризующим мембрану после развития ПД?
2. Насколько Ca^{2+} -зависимый K^+ -ток важен для генерации ПД?

3. Какой ток позволяет клетке генерировать пачки ПД при одном МП и серии ПД при другом? Почему?

4. Чем М-ток отличается от K^+ -тока, реполяризующего мембрану? Какое воздействие оказывает М-ток на ответ клетки при ее деполяризации?

5. При блокировании какого ионного тока нейромедиаторы (ацетилхолин), повышают возбудимость и частоту ритмического возбуждения нейронов?

6. Составьте таблицу, в которой будут указаны следующие параметры для токов, описанных в данной задаче: название тока; условия, при которых происходит активация тока (указать значения потенциала); наличие и условия инактивации; роль тока в генерации ПД. Указанные параметры приведены в теоретической части, потенциалы активации токов можно определить, используя `Na_K_IV.VCS`, `IA.VCS`.

Раздел 4: Синаптические потенциалы

Опыт 16: Возбуждающий постсинаптический потенциал

Для исследования последовательности активации постсинаптических потенциалов, загрузите файл `EP_IPSP.CCS` из программы `C-CLAMP` и запустите моделирование (кнопка `B`) постсинаптического потенциала. Вы обнаружите, что он состоит из ВПСП от двухфазного ИПСП. Выделим ВПСП, используя блокатор ГАМК-рецепторов. Для этого необходимо изменить `gIPSP` до 0, а затем, нажав клавишу «Y», сравнить СП до и после блокады торможения. Отметим, что ВПСП значительно увеличивается.

AMPA- и NMDA- рецепторы являются каналами, пропускающими основные потенциалобразующие катионы Na^+ и K^+ . Их активация приводит к изменению мембранного потенциала до величины около 0 мВ. Это можно проверить, изменив `Base current` (nA) на 1.78 и `Starting Vm` (mV) на 20. Нажмем клавишу «Y» и заметим, что ВПСП теперь приводит к гиперполяризации.

Для того, чтобы выявить вклад NMDA в ВПСП, выделим NMDA компоненту, заблокировав AMPA -рецептор.

1. Загрузите и запустите файл `NMDA.CCS`. Теперь активация афферентного нейрона приводит только к NMDA-рецептор-опосредуемому ВПСП. Гиперполяризуем мембрану нейрона, меняя `Base current` (nA) с 0 на -0.52 nA, `Starting Vm` на -90 мВ. Нажмите «Y». Заметьте, что NMDA-рецепторопосредуемый ВПСП очень мал при данном МП. Изменим `Base current` (nA) на 0.525 и `Starting Vm` на -30 мВ. Нажмите «Y». Обратите внимание на то, что при таком МП ВПСП становится больше, чем в предыдущем случае.

2. Измените `Base current` на -0.52, `Starting Vm` на -90; нажмите «B» и измените $[Mg^{++}]_o = 1.2$ mM на 0.01 (нажмите «Y»). В результате моделирования (удаление экстраклеточного Mg^{++}) амплитуда ВПСП стала гораздо больше. Для того, чтобы проверить, выполняется ли то же самое,

когда мембрана деполяризована, измените `Base current` на 0.525 и `Starting Vm` на -30 мВ; нажмите «Y». Теперь ионы Mg^{2+} оказывают на NMDA-рецепторопосредуемый ВПСП гораздо меньшее воздействие.

3. Оценку зависимости от напряжения NMDA-рецептор-опосредуемого ответа обычно проводят в условиях фиксации потенциала. Выйдем из программы `C-CLAMP` («Q») и введем программу `V-CLAMP`, а затем и загрузим файл `NMDA.VCS`. В данном опыте можно активировать NMDA-рецепторопосредуемый синапс при разном фиксированном уровне МП (нажать `I`). Регистрируя максимальный ток через NMDA-канал при различных МП, получают график зависимости NMDA-тока от напряжения. Вы можете увидеть этот график, нажав «Enter» в конце моделирования. Обратите внимание, что по мере деполяризации мембраны от -100 мВ до -30 мВ NMDA-ток возрастает, а при дальнейшей деполяризации он уменьшается и даже меняет полярность при 0 мВ. Если уменьшить экстраклеточный $[Mg^{2+}]_o$ до 0.001 mM и снова запустить программу (нажмите «Enter» после заключительного шага потенциала), то можно показать, что NMDA-рецепторопосредуемый ток не имеет двухфазной зависимости от потенциала.

Вы можете провести подобный эксперимент и с AMPA-рецепторопосредуемым ВПСП (повторить пункты 1-3 загрузив файлы `AMPA.CCS` или `AMPA.VCS`). В этом случае Вы обнаружите, что AMPA-рецепторы являются не потенциалонезависимыми и не зависят от $[Mg^{++}]_o$.

Опыт 17: Ингибиторный постсинаптический потенциал

Задача следующей серии модельных экспериментов заключается в исследовании ИПСП путем блокирования ВПСП рецепторов. Это можно сделать как с помощью специальных фармакологических препаратов, так и непосредственно за счет стимуляции тормозящих нейронов. Итак, в программе `C-CLAMP` загрузите и запустите файл `IPSPS.CCS`. Обратите внимание, что представленная модель отражает двухфазный ИПСП. С помощью воздействия ряда фармакологических препаратов, являющихся блокаторами определенных рецепторов, можно доказать, что первая фаза развития ИПСП связана с активацией ГАМК_A-рецепторов, а вторая - ГАМК_B-рецепторов.

Далее попытаемся изучить ионные механизмы генерации ИПСП, меняя МП и внеклеточные концентрации ионов. Изменим `Base current` на -0.38, `Starting Vm` на -85 мВ и нажмем клавишу «Y». Отметим, что в данный момент первая фаза ИПСП деполяризована, тогда как вторая еще не изменилась и остается гиперполяризованной, что свидетельствует о ионной селективности развития каждой фазы.

Далее рассмотрим зависимость фаз ИПСП от внеклеточной концентрации ионов. Сначала загрузим и запустим файл `IPSPS.CCS`. Предыдущий эксперимент показал, что ИПСП практически обращается при равновесном потенциале для Cl^- ($E_{cl} = -75$ мВ). Уменьшим величину $[Cl^-]_o$ с 120 до

7 мМ и нажмем клавишу «Y». Обратите внимание, что ГАМК_A – зависимый ИПСП теперь становится деполяризованным. Это указывает на то, что изменение равновесного потенциала для иона Cl до положительных значений МП, изменяет направление Cl-тока. Если исходно Cl-ток направлен внутрь клетки, то теперь он направлен наружу. Перезагрузите и перезапустите файл IPSPS.CCS, затем измените внеклеточную концентрацию K⁺ с 3.1 до 25 мМ (Base current установите на -0.5). Теперь Вы можете сами убедиться, что второй ГАМК_B-зависимый ИПСП деполяризуется, что свидетельствует о росте K⁺-проводимости.

Если постсинаптическая мембрана гиперполяризована ниже E_{Cl}, то как ВПСП, так и ИПСП приводят к ее деполяризации. Является ли при этом ИПСП возбуждающим потенциалом? Конечно нет. Причина этого заключается в том, что даже если ИПСП деполяризует мембрану, его равновесный потенциал все равно остается -75 мВ (на 20 мВ ниже порогового значения для генерации ПД, в данном случае -55 мВ). Для того, чтобы проиллюстрировать высказанное предположение, загрузим файл IP_EPSP.CCS. На мониторе мы видим ВПСП, который активируется при -85 мВ и вызывает генерацию ПД. Теперь изменим gEPSP с 0.15 на 0, что позволит моделировать отключение ВПСП и изменим значение gIPSP на 0.2, что запустит ИПСП (в данном случае только ГАМК_A –зависимый ИПСП). Нажмем клавишу «B» и обнаружим, что ИПСП становится деполяризованным. Затем изменим gEPSP обратно на 0.15 nS, нажмем «Y» и обнаружим, что теперь ВПСП не способен вызвать генерацию ПД, поскольку ИПСП сдвигает максимум ВПСП к E_{Cl} (-75 мВ) и, следовательно, меняет пороговое значение для генерации ПД. Отметим, что ИПСП, возникающие при увеличении проводимости мембраны, имеют потенциал реверсии ниже порогового для генерации ПД (в данном случае -55 мВ), и блокируют возбуждение, даже при деполяризации плазматической мембраны.

Вопросы:

1. Какое воздействие на клетку оказывают глутамат и ГАМК?
2. Если [Cl]_i=[Cl]_o, то какой будет тип активации ГАМК_A-рецепторов: возбуждающей или тормозной? Почему? (Это можно проверить с помощью IPSPS.CCS, сделав [Cl]_i=[Cl]_o).
3. Какие три главных фактора определяют амплитуду NMDA-рецепторопосредуемого ВПСП?
4. Почему NMDA- и AMPA- рецепторопосредуемые токи изменяют направление (наружу и внутрь) при 0 мВ?
5. Чем отличаются NMDA и AMPA-глутаматные рецепторы? ГАМК_A и ГАМК_B – рецепторы?