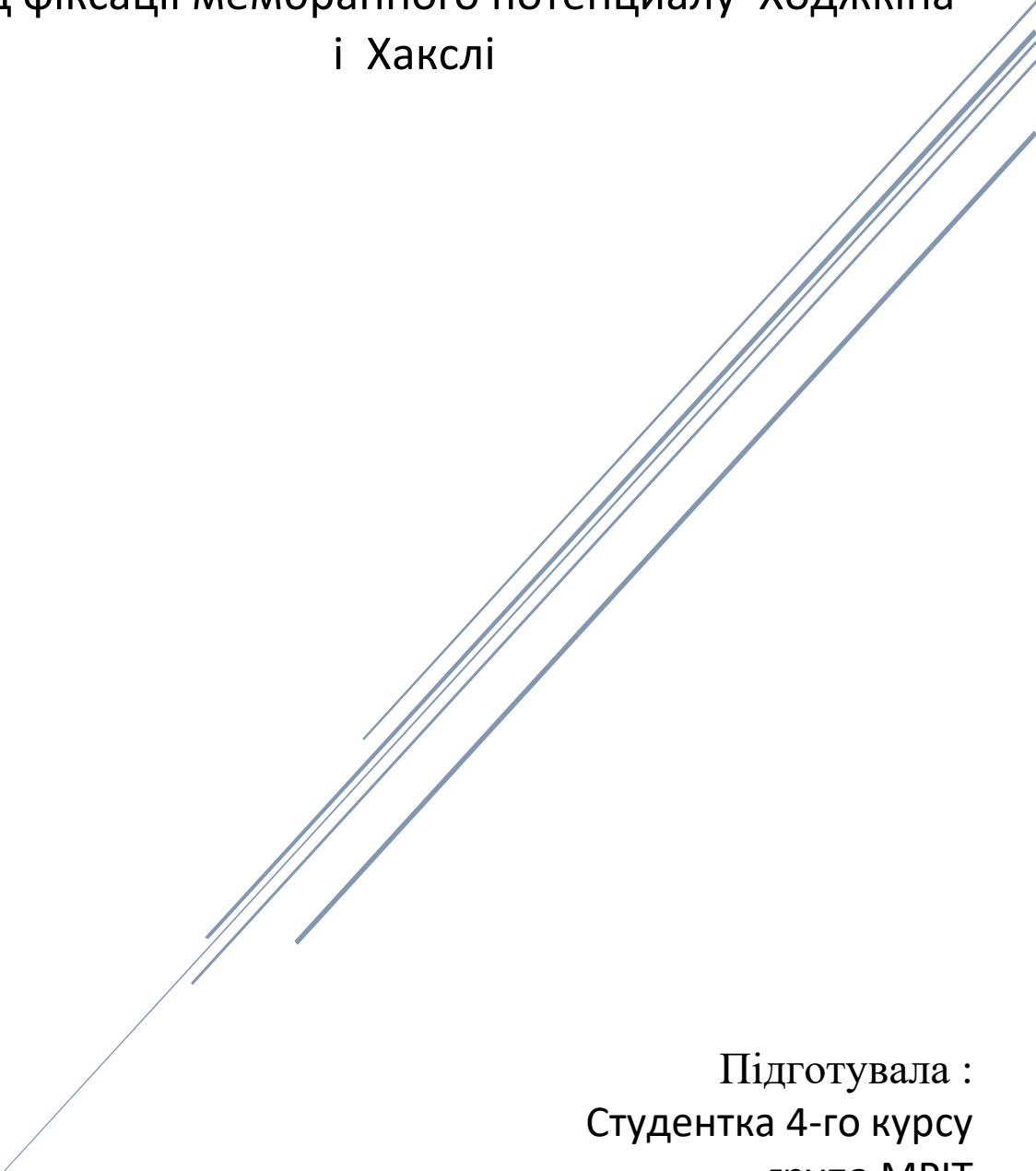


РЕФЕРАТ

Метод фіксації мембранного потенціалу Ходжкіна
і Хакслі



Підготувала :
Студентка 4-го курсу
група МРІТ
Лясота Вікторія

ЗМІСТ

1. Потенціал дії і його властивості	2
2. Рівняння Ходжкіна-Хакслі	5
3. Метод фіксації мембранного потенціалу. Іонні струми. Іонні канали	9

1. Потенціал дії і його властивості

Потенціалом дії називається електричний імпульс, обумовлений зміною іонної проникності мембрани і пов'язаний з поширенням по нервах і м'язам хвилі збудження. Досліди по дослідженню потенціалу дії проведені (в основному Ходжкіним і його співробітниками) на гігантських аксонах кальмара методом мікроелектродів з використанням високоомних вимірювачів напруги, а також методом мічених атомів. На рис. 1.1 а показана схема дослідів.

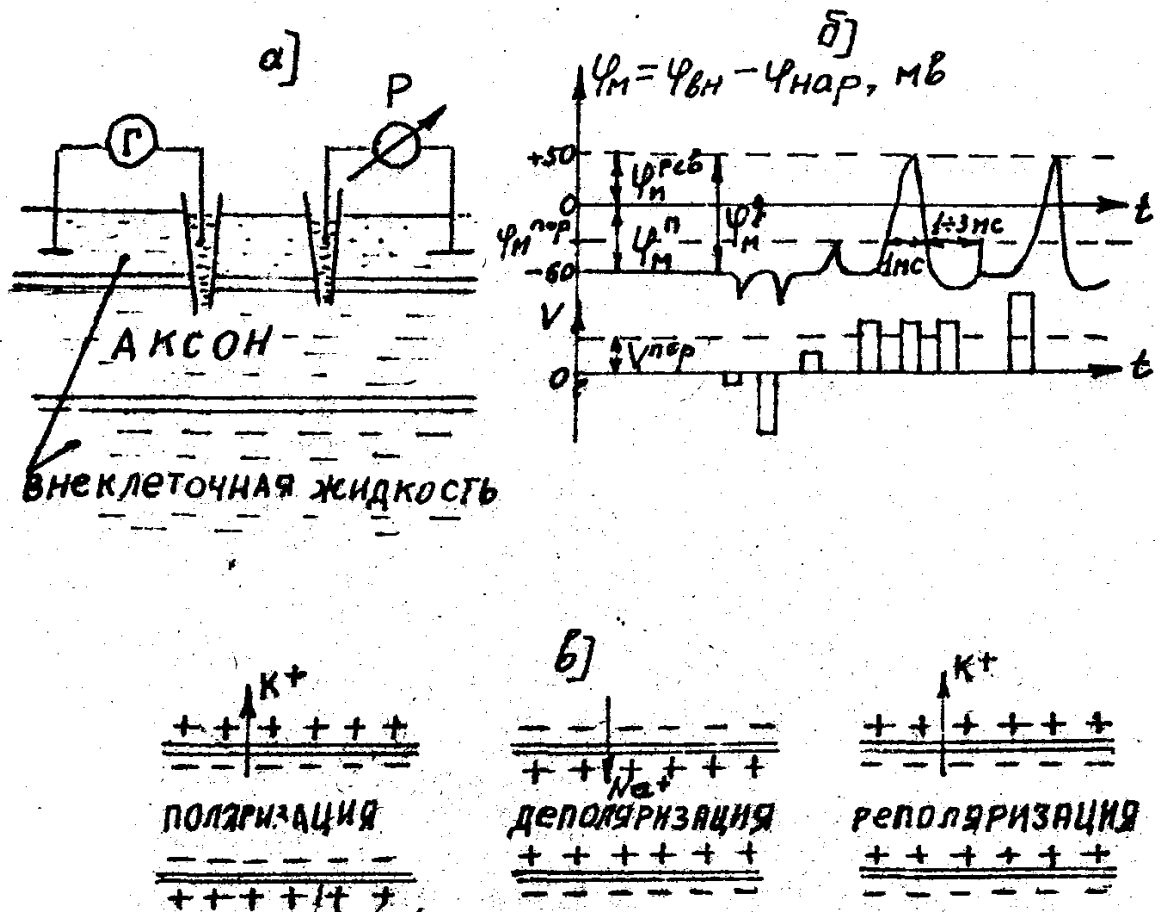


Рис. 1.1. Дослідження потенціалу дії -а; б - потенціал дії; в - поляризація, деполяризація і реполяризація мембрани

У дослідженнях потенціалу дії використовували два мікроелектрода, введених в аксон. На перший мікроелектрод подається імпульс від генератора Г прямокутних імпульсів, який змінює мембранний потенціал φ_m . Мембранний потенціал вимірюється за допомогою другого мікроелектрода, високоомним реєстратором напруги Р (рис. 1.1 а), V – амплітуда прямокутного імпульсу від генератора (рис. 1.1 б). Збудливий імпульс викликає лише на короткий час зміщення мембранного потенціалу, яке швидко зникає і відновлюється потенціал спокою, в тому випадку, коли збудливий імпульс негативний і призводить до зміни мембранного потенціалу ще далі в негативну сторону - тобто збудливий імпульс гіперполяризує. Також не формується потенціал дії, коли збудливий імпульс позитивний (деполяризує), але його амплітуда V менше порогового значення $V < V_{\text{пор}}$. Однак, якщо амплітуда позитивного, деполяризує імпульсу виявиться більше $V_{\text{пор}}$, в мембрані розвивається процес, в результаті якого відбувається різке підвищення мембранного потенціалу і мембранний потенціал φ_m навіть змінює свій знак - стає позитивним ($\varphi_{\text{вн}} > \varphi_{\text{нар}}$) (рис. 1.1 б).

Досягнувши деякого максимального значення - потенціалу реверсії $\varphi_m^{\text{рев}}$, мембранний потенціал повертається до значення потенціалу спокою $\varphi_m^{\text{п}}$, зробивши близько цього значення щось на зразок затухаючого коливання. У нервових волокнах і скелетних м'язах тривалість потенціалу дії близько 1 мілісекунди (а в серцевому м'язі близько 300 мс). Після зняття збудження ще протягом 1-3 мс спостерігаються деякі залишкові явища, під час яких мембрана рефрактерна (не збуджена).

Новий деполяризує потенціал $V > V_{\text{пор}}$ може викликати утворення нового потенціалу дії тільки після повного повернення мембрани в стан спокою. Причому амплітуда потенціалу дії не залежить від амплітуди деполяризує потенціалу $\varphi_m^{\text{д}}$, якщо тільки $V > V_{\text{пор}}$.

Якщо в стані спокою мембрана поляризована (потенціал цитоплазми негативний по відношенню до позаклітинного середовища), при збудженні відбувається деполяризація мембрани - потенціал всередині клітини позитивний і після зняття збудження відбувається реполяризація (відновлення поляризації) мембрани (рис. 1.1 в).

Характерні властивості потенціалу дії:

- 1) наявність порогового значення деполяризуючого потенціалу;
- 2) закон «все або нічого», тобто, якщо деполяризуючий потенціал більше порогового, розвивається потенціал дії, амплітуда якого не залежить від амплітуди збудливого імпульсу і не виникає потенціалу дії, якщо амплітуда деполяризуючого потенціалу менше порогової;
- 3) є період рефрактерності (не збудженості мембрани), під час розвитку потенціалу дії і залишкових явищ після зняття збудження;
- 4) в момент збудження різко зменшується опір мембрани (у аксона кальмара опір мембрани на одиницю площі змінюється від $0,1 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ в стані спокою до $0,0025 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ при збудженні).

2. Рівняння Ходжкіна-Хакслі

Якщо подивитись на значення рівноважних нернстовських потенціалів, створених різними іонами (таблиця 1), можна припустити, що позитивний потенціал реверсії має натрієву природу, оскільки саме дифузія натрію створює позитивну різницю потенціалів між внутрішньою і зовнішньою поверхнями мембрани.

Можна змінювати амплітуду імпульсу потенціалу дії, змінюючи концентрацію натрію в зовнішньому середовищі (рис. 2.1). При зменшенні зовнішньої концентрації натрію амплітуда потенціалу дії зменшується, так як змінюється потенціал реверсії. Якщо з навколишнього середовища клітини повністю виключити натрій, потенціал дії взагалі не виникне.

Таблиця 1 Вміст іонів рівноважного потенціалу і потенціалів спокою деяких клітин

Об'єкт	концентрація ммоль/л						мВ по формулі Нернста			φ _м , мВ експ
	[K ⁺]		[Na ⁺]		[Cl ⁻]					
	вн	нар	вн	нар	вн	нар	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	
Гігантський аксон кальмара	360	10	70	420	160	500	-90	50	-30	-60
М'яз жаби	125	2,5	15	125	11	120	-98	60	-87	-94

Досліди, проведені з радіоактивним ізотопом натрію, дозволили встановити, що при порушенні проникності для натрію різко зростає. Якщо в стані спокою співвідношення коефіцієнтів проникності мембрани аксона кальмара для різних іонів $P_K:P_{Na}:P_{Cl} = 1:0,04:0,45$, то в стані збудження:

$P_K:P_{Na}:P_{Cl} = 1:20:0,45$, тобто в порівнянні з незбудженим станом при порушенні коефіцієнт проникності для натрію зростає в 500 разів.

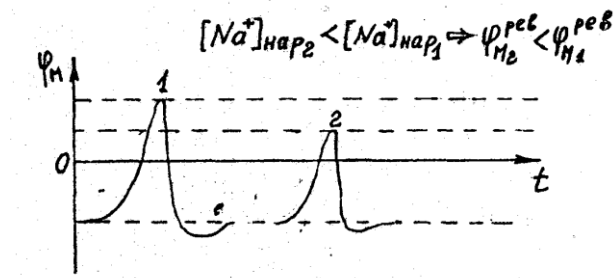


Рис.2.1. Зменшення амплітуди потенціалу дії при зменшенні зовнішньої концентрації натрію.

Розрахунки за рівнянням Гольдмана, якщо в нього підставити значення проникності мембрани для збудженого стану, збігаються з експериментальними даними.

Збудження мембрани описується рівняннями Ходжкіна-Хакслі. У спрощеному вигляді одне з рівнянь Ходжкіна-Хакслі має вигляд:

$$I_M = C_M \frac{d\varphi_M}{dt} + \sum_i I_{\text{ион}i}$$

де I_M - струм через мембрану, C_M - ємність мембрани, $\sum_i I_{\text{ион}i}$ - сума іонних струмів через мембрану.

Електричний струм через мембрану складається з іонних струмів: іонів калію - I_K , натрію - I_{Na} і інших іонів (в тому числі Cl^-), так званого струму витоку $I_{\text{ут}}$, а також ємнісного струму I_c

. Ємнісний струм обумовлений перезарядженням конденсатора, (який являє собою мембрана, перетіканням зарядів з однієї її поверхні на іншу). Його величина визначається кількістю заряду, що перетікає з однієї обкладки на

іншу за одиницю часу $\frac{dq}{dt}$, а оскільки заряд конденсатора $q = C_M \Delta \varphi = C_M \varphi_M$, то ємнісний струм:

$$I_c = C_M \frac{d\varphi_M}{dt}$$

Повний мембранний струм:

$$I_M = C_M \frac{d\varphi_M}{dt} + I_K + I_{Na} + I_{yt} \quad (2.1)$$

На рис. 2.2 представлена еквівалентна електрична схема елемента збудженої мембрани.

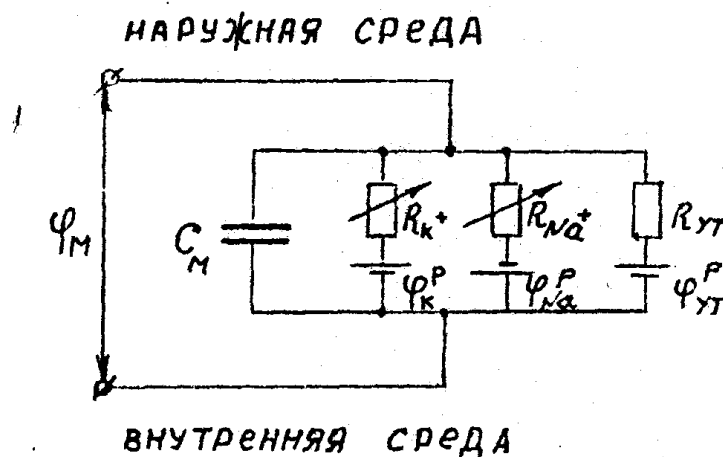


Рис.2.2. Еквівалентна схема елемента збудженої мембрани

Кожен іонний струм визначається різницею мембранного φ_M і рівноважного нернстового потенціалу, створюваного дифузиею іонів даного типу φ_i^p :

$$I_i = g_i(\varphi_M - \varphi_i^p) \quad (2.2)$$

де $g_i = \frac{1}{R_i}$ – провідність.

На еквівалентній електричній схемі елемента мембрани рівноважні потенціали Нернста моделюються джерелами напруг з електрорушійної

силами φ_K^p , φ_{Na}^p , $\varphi_{ут}^p$, а провідності елемента мембрани для різних іонів моделюються резисторами R_K , R_{Na} , $R_{ут}$. Скориставшись (2.2), запишемо (2.1) у вигляді:

$$I_m = \varphi_m + g_K(\varphi_m - \varphi_K^p) + g_{Na}(\varphi_m - \varphi_{Na}^p) + g_{ут}(\varphi_m - \varphi_{ут}^p)$$

Відповідно до теорії Ходжкіна-Хакслі, збудження елемента мембрани пов'язано зі змінами провідності мембрани для іонів Na^+ і K^+ .

Так як збудження викликається підвищенням мембранного потенціалу, провідності (g_K і g_{Na}) мембрани залежать від мембранного потенціалу.

У різні фази розвитку імпульсу збудження іонні провідності (g_K і g_{Na}) різні, тобто вони залежать ще й від часу.

3. Метод фіксації мембранного потенціалу. Іонні струми. Іонні канали

Для доказу вирішальної ролі іонних струмів в генерації нервового імпульсу були поставлені знамениті досліди з фіксацією мембранного потенціалу (Ходжкин, Хакслі та ін.)

Підтримка постійної напруги при дослідженні іонних струмів φ_m через збуджену мембрану дозволила:

- 1) позбутися від ємнісних струмів $I_c = \frac{d\varphi_m}{dt} = 0$
- 2) виключити зміну іонних провідностей g_{Na} і g_K при зміні g_m і вивчити їх зміну в часі в різні фази розвитку збудження: $g = f(t)$ Постійна різниця потенціалів між внутрішньою і зовнішньою поверхнями мембрани підтримується за допомогою спеціальної електронної схеми (рис. 3.1), ключовий елемент якого - операційний підсилювач (ОП) (в основному, ОП представляють собою підсилювачі постійного струму, охоплені глибоким негативним зворотним зв'язком по напрузі).

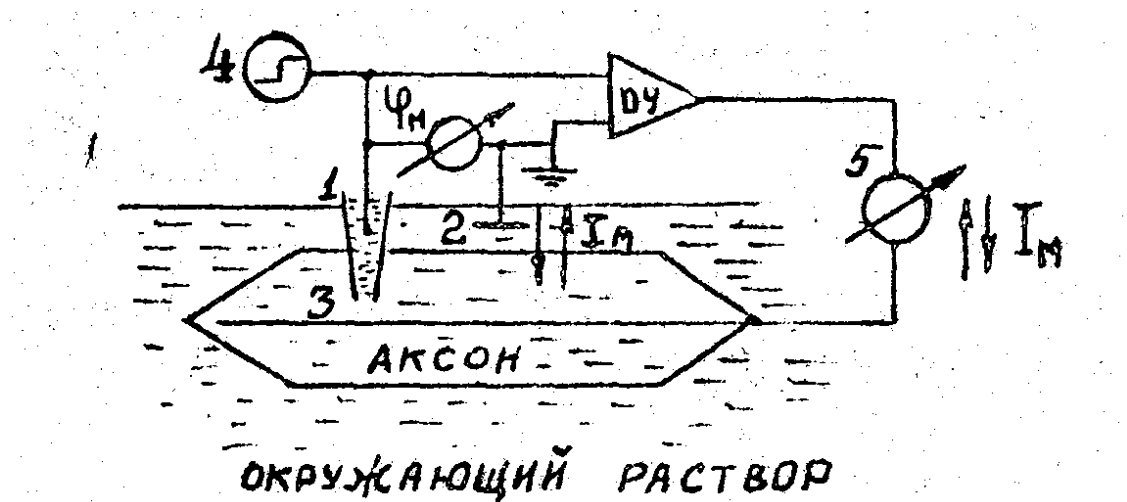


Рис.3.1 Схема дослідження струмів через мембрану з фіксацією мембранного потенціалу

Між входами ОП - різниця потенціалів мікроелектрода, поміщеного всередину аксона кальмара (1), і електрода порівняння (2), тобто мембранний

потенціал $\varphi_M = \Delta\varphi_M = \varphi_{\text{вн}} - \varphi_{\text{нар}}$. З виходу операційного підсилювача напруга подається на срібну зволікання (3), розташовану по осі аксона. Електронна схема утримує на виході (всередині аксона) той же потенціал, що на вході ОП, таким чином утримується постійний мембранний потенціал: $\varphi_M = \text{const}$. За допомогою джерела постійної напруги (4) можна «сходінкою» змінити вхідна напруга ОП, наприклад, підняти його вище порогового (рис. 3.2 а). Електронна схема буде утримувати це задану напругу під час досліду. Амперметр (5) вимірює протікаючий через мембрану струм I_M (між електродом порівняння (2) і виходять електродом ОП (3) (рис. 3.1). У дослідах з фіксацією напруги можна досліджувати зміну мембранного струму в часі, при розвитку збудження, задаючи різні постійні значення мембранного потенціалу φ_M .

Якщо струм спрямований з клітини назовні в навколишній розчин, його вважають позитивним, якщо всередину клітини з навколишнього розчину - негативним.

Виявлено, що якщо підняти мембранний потенціал вище порогового $\varphi_M > \varphi_M^{\text{пор}}$ (рис. 3.2 а), спочатку тече струм всередину клітини ($I_M < 0$), а потім з клітки назовні ($I_M > 0$) (рис. 3.2 б).

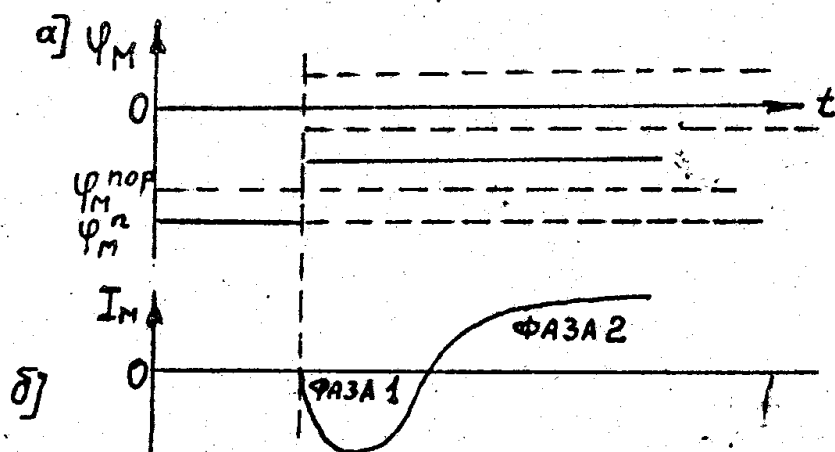


Рис.3.2. Результати досліджень мембранного струму методом фіксації напруги

У блискучих експериментах, проведених Ходжкіна, Хакслі, байкери, Шоу, було переконливо доведено, що фаза I мембранного струму ($I_m < 0$) пов'язана з потоком іонів натрію з навколишнього середовища (де концентрація натрію $[Na^+]_{нар}$ більше) в клітку, (де концентрація натрію $[Na^+]_{вн}$ менше), а фаза 2 пояснюється витіканням іонів калію з клітки назовні ($[K^+]_{вн} > [K^+]_{нар}$).

У своїх дослідках дослідники змінювали іонний склад навколишнього розчину. Було виявлено, що якщо зовні прибирали натрій, перша фаза мембранного струму (струм всередину клітини) пропадала. Отже, насправді, перша фаза розвитку потенціалу дії пов'язана зі збільшенням проникності мембрани для іонів натрію. Потік позитивних частинок в клітку призводить до деполяризації мембрани - внутрішня її поверхня заряджається позитивно по відношенню до зовнішньої.

У другій фазі - коли відбувається реполяризация мембрани і відновлюється негативний мембранний потенціал, різко збільшується проникність мембрани для калію і з клітини назовні виходять позитивно заряджені іони калію, в той час як натрієвий струм зменшується.

Такий іонний механізм розвитку потенціалу дії був остаточно доведено в вирішальному експерименті Ходжкіна, Бейкера і Шоу, в якому аксоплазма препарованого аксона замінили на зовнішній розчин, а іонний склад зовнішнього розчину зробили таким же, як у нормальної аксоплазми. При такій заміні іонних складів змінила знак різниця потенціалів на мембрані. Тепер в спокої її внутрішня поверхня була заряджена позитивно по відношенню до зовнішньої. А потенціал реверсії виявився негативним. Була висунута гіпотеза, що селективне (виборче) зміна іонної проникності збудженої мембрани: спочатку для Na^+ , а потім для K^+ пояснюється тим, що в мембрані є спеціальні іонні «канали» (пори, утворені білковими молекулами). Існують окремо натрієві і калієві канали, які відкриваються і

закриваються під час проходження через дану ділянку мембрани нервового імпульсу. У першій фазі відкриваються натрієві канали, в другій фазі - калієві. Відповідно, потім спочатку закриваються натрієві канали, а потім калієві. Відкривання і закривання іонних каналів викликається зміною мембранного потенціалу. Один із доказів наявності в мембрані іонних каналів - існування речовин, які блокують іонні потоки через мембрану.

Так, що тетродотоксин в скалозубій рибі Фугу блокує надходження всередину клітини натрію і, таким чином, порушує передачу нервового імпульсу, що може привести до летального результату. Доведено, що тетродотоксин не впливає на проникність клітини для калію, значить, іони натрію і калію, насправді, проходять через різні канали.

Через свою специфічну будову молекули тетродотоксини застряють в натрієвих каналах. Підрахувавши число застрягли в мембрані молекул тетродотоксина, вдалося визначити кількість натрієвих каналів. У різних нервових волокнах воно було різним - від 3 до 75 каналів на один квадратний мікромметр площі мембрани (для порівняння кількість молекул фосфоліпідів $\sim 2 \cdot 10^6 \frac{1}{\text{мкм}^2}$). Був виявлений і специфічний інгібітор калієвих каналів - тетраетіламмоній.

Якщо обробити мембрану тетродотоксином, блокуючим натрієві канали, в дослідах з фіксацією мембранного потенціалу пропадає I фаза

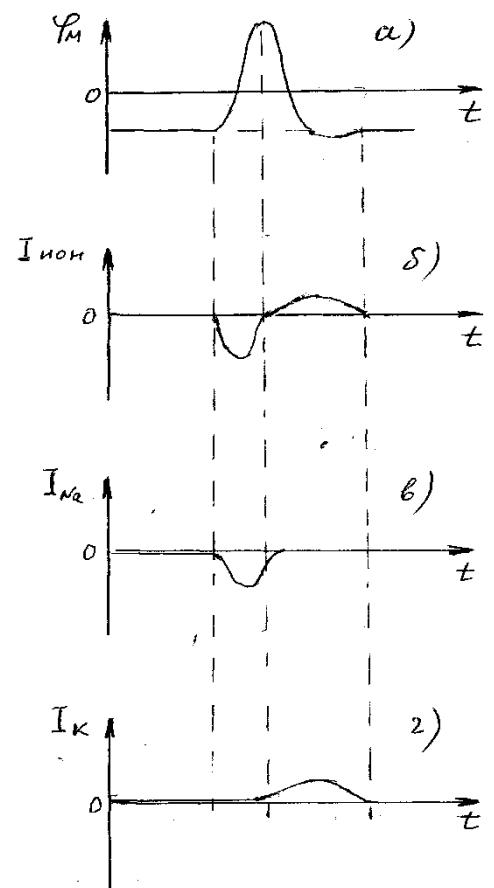


Рис.3.3 Тимчасові залежності мембранного потенціалу - а, сумарного іонного струму через мембрану-б, натрієвого струму - в і калієвого струму - г при формуванні потенціалу дії (в аксонах і скелетних м'язах).

(рис. 3.2), а тетраетіламмоній, який припиняє перенесення через мембрану калію, викликає зникнення 2 фази.

Таким чином, було встановлено, що формування потенціалу дії викликається іонними потоками через мембрану: спочатку іонів натрію всередину клітини, а потім іонів калію з клітки в зовнішній розчин.

Тимчасові залежності мембранних струмів при формуванні потенціалу дії в аксонах і скелетних м'язах представлені на рис.3.3.