

591.181

**ФИЗИКА НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА****В. С. Маркин, В. Ф. Пастушенко, Ю. А. Чизмаджев****СОДЕРЖАНИЕ**

1. Введение . . . . .	289
2. Нервное волокно: основные свойства . . . . .	290
а) К истории вопроса (290). б) Строение и свойства нервной клетки (291).	
в) Явление возбудимости (293). г) Уравнения Ходжкина—Хаксли (295).	
3. Ионный транспорт через мембраны . . . . .	297
а) Бислойные липидные мембраны (297). б) Перенос заряда через мембраны (299). в) Молекулярный подход (303). г) Прямое прохождение (306).	
4. Ионные каналы . . . . .	309
а) Факты и гипотезы (309). б) Однорядный транспорт (312). в) Натриевый канал с модифицированным энергетическим профилем (314). г) Калиевый канал (316). д) Непрерывное описание (317).	
5. Зависимость проводимости канала от электрического поля . . . . .	317
а) Интерпретация уравнений Ходжкина — Хаксли (317). б) Токи ворот (318).	
в) Электрические флуктуации (321).	
6. Распространение импульсов по нервным волокнам . . . . .	322
а) Скорость и форма импульса (322). б) Распространение импульсов по неоднородным волокнам (325). в) Взаимодействие импульсов (326). г) Учет динамики развития возбуждения (328).	
7. Заключение . . . . .	329
Цитированная литература . . . . .	331

**1. ВВЕДЕНИЕ**

Современная биология развивается не менее стремительно, чем физика в начале XX в. Успехи эти стали возможными благодаря использованию новейших физических и физико-химических методов исследования. Наряду с такими разделами биологии, как молекулярная генетика, синтез белка и ферментативный катализ все более важное значение приобретают исследования в области биологических мембран. Функции клеточных мембран крайне многообразны. Среди них одной из главнейших является генерация и проведение нервных импульсов.

Проблема нервного импульса имеет богатую и временами драматическую историю. Было бы наивно пытаться в этом обзоре осветить ее более или менее подробно \*). Однако трудно удержаться от соблазна хотя бы перечислить основные этапы пройденного пути. Это важно и по той причине, что из краткого исторического экскурса в проблему нервного импульса явствует, насколько тесно переплелись здесь физика и биология. Сегодня биофизика возбудимых мембран переживает новый подъем, связанный с переходом на молекулярный уровень исследования, который выражается в попытках реконструкции ионных каналов, анализа их состава

\*) Прекрасное изложение истории вопроса можно найти во вводной статье А. В. Лебединского к «Избранным работам о животном электричестве» Гальвани и Вольты<sup>1</sup>.

и структуры, развития новых релаксационных методов и измерения спектров электрических флуктуаций. Параллельно с экспериментом развиваются и теоретические представления о природе биоэлектрических явлений.

Проблеме нервного импульса посвящена обширная литература. Обилие деталей, тонкие отличия в характеристиках разных систем, большое количество эмпирических соотношений, обрабатываемых на ЭВМ, являются характерными (и, безусловно, оправданными) для физиологического подхода. Однако для понимания физики дела необходимо абстрагироваться от менее существенных подробностей и попытаться увидеть то общее и главное, что присуще проблеме в целом. Именно этот принцип положен в основу последующего изложения.

## 2. НЕРВНОЕ ВОЛОКНО: ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

### а) К истории вопроса

Уже в XVII в. считалось, что нервные волокна служат каналами передачи информации от головного мозга к мышцам. Относительно природы носителя информации высказывались различные предположения, которые отражали уровень научных представлений каждой эпохи. Декарт говорил о «животных духах», которые, в зависимости от их качества, вызывают сокращения или расслабления мышц. Физиологи, уже вооруженные микроскопом, склонялись к тому мнению, что нервное волокно — это трубка, по которой течет «нервный флюид». Ньютон в «Principia» писал об упругой волне, распространяющейся вдоль волокна, что было вполне естественно в век торжества механики. Однако вскоре эта гипотеза была опровергнута, и на смену механическим концепциям пришли электрические, в утверждении которых определенную роль сыграли так называемые электрические рыбы.

Способность некоторых рыб производить «удар» была известна очень давно. Еще римский врач Скрибоний Ларг рекомендовал применять разряды ската *Torpedo* в качестве средства против подагры, головной боли и эпилепсии. В 1776 г. Кавендиш измерил распределение напряженности электрического поля вокруг ската *Torpedo*, находящегося в сосуде с водой. Эти эксперименты послужили доказательством того, что «удар», производимый скатом, представляет собой электрический разряд, который сравнивали с разрядом лейденской банки \*). К этому же времени накопились сведения о действии внешних электрических полей на организм. На основе всех этих фактов естественно было предположить, что имеется определенная связь между «нервными силами» и внешним электрическим полем. Однако вопрос о природе «нервного флюида» оставался открытым. И вот в 1791 г. Гальвани опубликовал «Трактат о силах электричества при мышечном движении», которому была уготована удивительная судьба. Приводя в контакт с нервно-мышечным препаратом лягушки два различных металла, он наблюдал сокращение мышцы \*\*). Уже зная из своих предыдущих опытов о влиянии атмосферного электричества на мышечное сокращение, Гальвани предположил, что и это подрагивание ляжки вызвано электричеством. Оставалось неясным, что же является источником этого электричества — живой объект или металлы. Гальвани

\*) Электрический скат генерирует импульсы в 50 а при напряжении 60 в, а электрический угорь создает импульсные поля с напряжением 500 в.

\*\*) По свидетельству одного из современников, «препарированные лягушки оказались на его столе по случаю приготовления им супа для больной жены» (цитируем по <sup>1)</sup>).

полагал, что сокращение мышцы было вызвано биоэлектричеством, причем нервное волокно играло роль проводника, который в соединении с металлическими электродами замыкал цепь и способствовал разряду мышцы, эквивалентной лейденской банке. Признанный авторитет в области электричества, Вольт заинтересовался опытами Гальвани и воспроизвел их. Однако в ходе последующих экспериментов он установил, что источником электричества был контакт разнородных металлов с раствором электролита. Так был открыт новый класс источников тока, впоследствии названный гальваническими элементами. Научный спор физиолога и физика на этом не окончился.

Гальвани в трактате 1797 г. описал явление сокращения мышцы при ее соприкосновении с нервом, без включения в систему металлов. Однако этот эксперимент, названный впоследствии основоположником современной электрофизиологии Дюбуа-Реймоном «основным опытом нервно-мышечной физиологии», уже не мог преодолеть скепсис физиков — победа в полемике осталась за Вольты. Реабилитация биоэлектричества, которая датируется уже серединой XIX в., потребовала значительно более чувствительной измерительной техники. В возрождении гальванизма большую роль сыграли опыты Маттеучи (40-е годы XIX в), который пытался физически обосновать возникновение электричества в живых тканях «по Вольты», контактными явлениями на поверхности мышечного волокна.

Большой интерес к проблеме биоэлектричества проявлял Фарадей. «Как ни удивительны электрические явления, присущие неорганической материи, — писал он, — они не идут ни в какое сравнение с теми, которые связаны с деятельностью нервной системы и жизненными процессами». Полное торжество идей Гальвани наступило после работ Дюбуа-Реймона и его школы (1843 г.), в которых были измерены токи покоя мышцы и нерва, а затем и токи действия, возникавшие после нанесения раздражения. Гельмгольц и Бернштейн в это же время измерили скорость распространения нервных импульсов. Физические представления о происхождении биоэлектричества, развитые Бернштейном, основывались на работах Гиббса, Гельмгольца, Нериста и Оствальда по термодинамике гальванического элемента. Мы коснемся основных положений этой теории в дальнейшем изложении. Применение более изощренной экспериментальной техники привело к существенному развитию представлений Бернштейна. Разработанная Ходжкиным и Хаксли феноменологическая теория биоэлектрических явлений прекрасно описывает огромный фактический материал. Новейшее развитие этой области науки характеризуется более глубоким проникновением в молекулярную природу мембранных явлений.

#### б) Строение и свойства нервной клетки<sup>2-4</sup>

Основным структурным элементом нервной системы высших организмов является нейрон, состоящий из тела клетки, от которого отходят многочисленные отростки — дендриты (рис. 1). Один из этих отростков у периферических нейронов намного длиннее других — это аксон, протяженность которого достигает иногда метров, а диаметр имеет порядок 1—100 мкм. Аксоны, как правило, окружены толстой жировой (миелиновой) оболочкой, которая периодически (через 1—2 мм) прерывается перехватами Ранвье (1 мкм). Миелиновые сегменты играют роль изолирующих муфт, нервное волокно на этих участках аналогично пассивному кабелю. Электрически активна только часть мембраны в перехватах Ранвье. Большое удобство для исследований представляют немиелинизи-

рованные аксоны кальмаров, иногда достигающие миллиметра в диаметре. В таких волокнах, называемых также гладкими, электрической активностью обладает вся мембрана. В дальнейшем, если специально не оговорено, мы будем рассматривать гладкие нервные волокна.

Аксон можно представить в виде полрой трубки, заполненной раствором электролита. Стенка этой трубки — мембрана аксона — состоит из липидов

и белков. Толщина мембраны составляет  $\sim 70 \text{ \AA}$ . В состоянии покоя электрическое сопротивление мембраны очень высоко — около  $10^3 \text{ ом}\cdot\text{см}^2$ , а ее емкость составляет примерно  $1 \text{ мкф/см}^2$ . Мембрана аксона отделяет внутренний раствор от наружного, имеющего другой состав. Так, внутри, в аксоплазме, высока концентрация ионов калия и мала концентрация ионов натрия и хлора по сравнению с окружающей средой (табл. I). Внутренность клетки в покое заряжена отрицательно по отношению к внешней среде, и на мембране развивается разность потенциалов приблизительно в 60 мв. В теории Бернштейна появление «потенциала покоя» объяснялось следующим образом. Предполагалось, что мембрана проницаема только для ионов калия. Тогда, чтобы уравновесить диффузионный поток ионов калия, на мембране должна установиться разность потенциалов

$$\varphi_m = \frac{kT}{e} \ln \frac{c_K^o}{c_K^i} \quad (1)$$

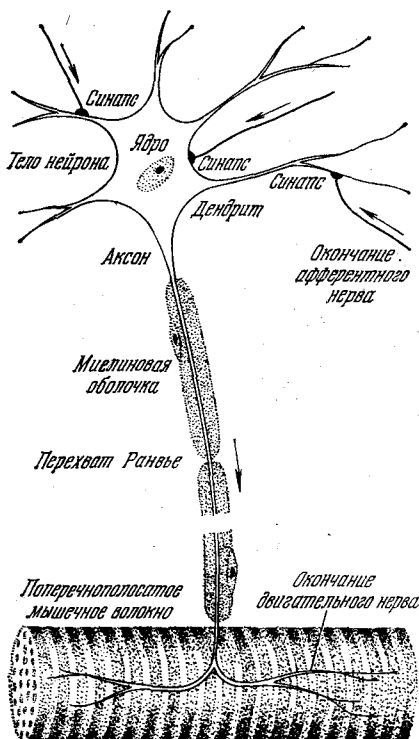


Рис. 1. Схема строения нервной клетки (спинномозгового двигательного нейрона лягушки)<sup>3</sup>.

до тех пор, пока не удалось различных ионов через мембрану и тем самым проверить основной постулат Бернштейна. Оказалось, что в состоянии покоя мембрана проницаема не только для ионов калия, но и для ионов натрия и хлора. Правда, проницаемость по натрию и хлору значительно меньше, чем по калию ( $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$ ), но от кризиса старую мембранную теорию это не спасало. Действительно, ионы натрия, имеющиеся в избытке во внешней среде, поступают в клетку под действием и диффузионных сил, и электрических. Поэтому пришлось предположить, что в мембране действует специфический механизм — натриевый насос, который осуществляет так называемый активный транспорт, т. е. выносит ионы натрия наружу, против градиента электрохимического потенциала, расходуя

Получавшиеся в экспериментах величины потенциала покоя не вполне согласовались с вычисленными по (1), но особого беспокойства это не вызывало.

непосредственно измерить потоки различных ионов через мембрану и тем самым проверить основной постулат Бернштейна. Оказалось, что в состоянии покоя мембрана проницаема не только для ионов калия, но и для ионов натрия и хлора. Правда, проницаемость по натрию и хлору значительно меньше, чем по калию ( $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$ ), но от кризиса старую мембранную теорию это не спасало. Действительно, ионы натрия, имеющиеся в избытке во внешней среде, поступают в клетку под действием и диффузионных сил, и электрических. Поэтому пришлось предположить, что в мембране действует специфический механизм — натриевый насос, который осуществляет так называемый активный транспорт, т. е. выносит ионы натрия наружу, против градиента электрохимического потенциала, расходуя

Таблица I  
Концентрация электролитов (ммоль/л) для аксона кальмара

Ион	Снаружи, $c^o$	Внутри, $c^i$
$\text{Na}^+$	460	50
$\text{K}^+$	10	400
$\text{Cl}^-$	540	40—100

при этом энергию метаболизма \*). Насос устроен таким образом, что перенос натрия наружу сопряжен с переносом калия внутрь клетки. Стехиометрия насоса по натрию и калию отлична от 1 : 1, т. е. процесс активного транспорта является электрогенным. Однако его вклад в потенциал покоя гигантского аксона кальмара составляет всего лишь 2,5 мв. Поэтому вопрос о вычислении потенциала покоя можно рассматривать, отвлекаясь от существования активного транспорта. Поскольку мембрана проницаема для целого ряда ионов, состояние покоя не является термодинамически равновесным. Оно стационарно благодаря действию ионных насосов, причем мембранный потенциал в условиях разомкнутой цепи находится из условия равенства нулю полного электрического тока. Поэтому вычисление потенциала покоя должно основываться на определенной картине ионного транспорта через биомембраны.

### в) Явление возбудимости

Если пропустить через аксон малый импульс тока, приводящий к допороговой деполяризации мембраны, т. е. сдвигающий потенциал клетки в положительную сторону, то после снятия внешнего раздражения потенциал монотонно возвращается к исходному уровню, т. е. аксон ведет себя как пассивная электротехническая схема, состоящая из конденсатора и примерно постоянного сопротивления.

Однако все выглядит иначе, если импульс тока велик. В этом случае потенциал продолжает изменяться и после выключения возмущения; он проходит через нуль, становится положительным и только потом возвращается к уровню покоя (рис. 2). Отклик мембраны уже не зависит от возмущения. Такой отклик называют нервным импульсом или потенциалом действия. Правильное феноменологическое истолкование механизма генерации нервного импульса было дано Ходжкином и Хаксли<sup>5</sup> на основе экспериментов с фиксацией потенциала. Суть этого метода состоит в том, что на мембране задается потенциал в виде ступенчатой функции различной амплитуды и снимается зависимость тока от времени.

Специальными экспериментами было доказано, что полный ионный ток (кривая 1 на рис. 3) складывается из трех составляющих — калиевого, натриевого и тока утечки. Калиевый ток развивается с задержкой и выходит на стационарное значение за время порядка нескольких миллисекунд (кривая 2 на рис. 3). Натриевый ток, направленный внутрь, быстро растет по величине,

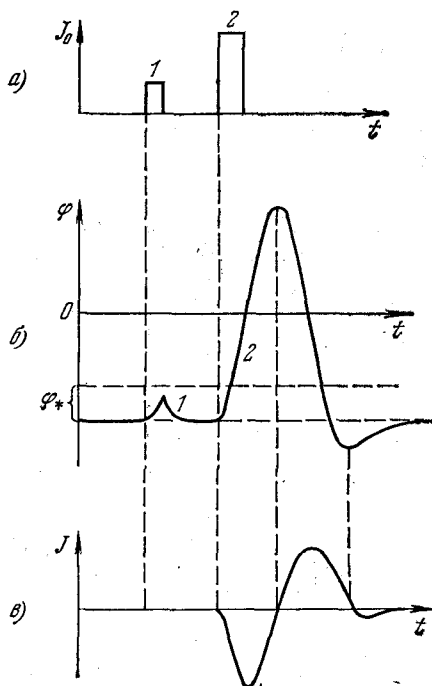


Рис. 2. Отклик нервного волокна (мембранный потенциал (б) и ионный ток (в)) на внешний импульс тока (а).

1 — подпороговое воздействие, 2 — надпороговое.

\*) В дальнейшем мы не будем касаться вопросов активного транспорта, так как процесс генерации нервного импульса представляет самостоятельное явление. Фундаментальная роль активного транспорта состоит в поддержании перепада концентраций на мембране. При выключении насосов концентрации постепенно выравниваются как в возбуждаемой, так и в покоящейся клетке.

достигает максимума, а затем медленно убывает (кривая 3). Последняя фаза называется инактивацией натриевого тока. Измеряя серию  $J-t$

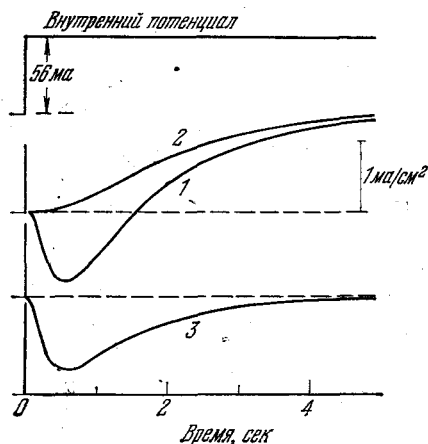


Рис. 3. Разделение мембранного тока (1) на калиевую (2) и натриевую (3) компоненты.

Изменения токов вызваны быстрым смещением потенциала внутри волокна на  $+56$  мВ (верхний график) <sup>2</sup>.

на мембрану, предварительно деполяризованную до потенциалов, лежащих правее точки минимума на рис. 4, б. Соответствующая мгновенная

кривых при разных амплитудах фиксируемого на мембране потенциала, можно построить вольт-амперные характеристики системы (рис. 4). Стационарная вольт-амперная характеристика будет, очевидно, совпадать с калиевой. Что же касается натриевого тока, то принято описывать его через зависимость пикового значения  $J_{Na}$  от потенциала (рис. 4, б). Ток  $J_{Na}$  обращается в нуль при потенциале, совпадающем с равновесным натриевым потенциалом,  $\varphi_{Na} = (kT/e) \ln (c_{Na}^0/c_{Na}^i)$ . Обращает на себя внимание тот факт, что кривая  $J_{Na}$  —  $\varphi$  является немонотонной. В окрестности  $\varphi_{Na}$  натриевая вольт-амперная характеристика близка к линейной, и натриевый ток пропорционален  $(\varphi - \varphi_{Na})$ . В области линейности вольт-амперная характеристика является безынерционной. В этом можно убедиться, подавая короткие толчки потенциала любой амплитуды и знака

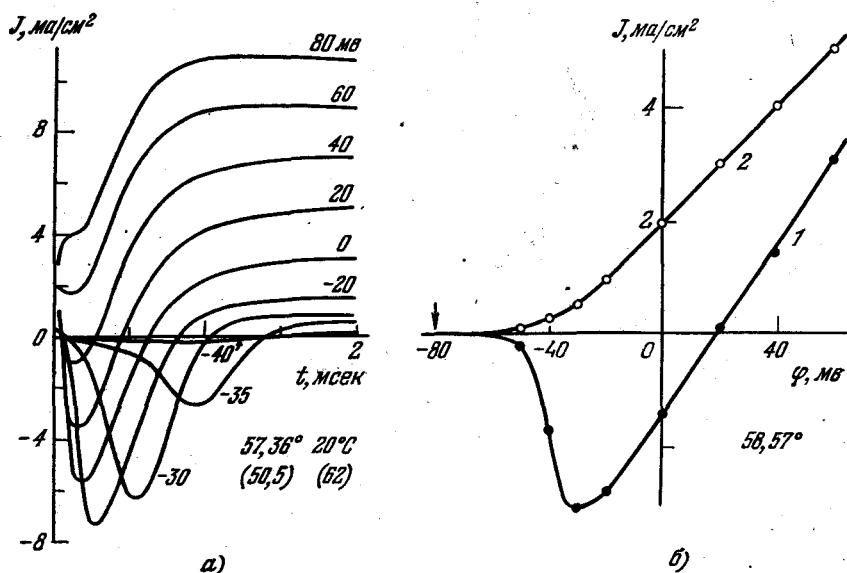


Рис. 4. Типичные данные по фиксации потенциала.

а) Плотности ионного тока при разных указанных на рисунке значениях потенциала, б) пиковая (1) и стационарная (2) вольт-амперные характеристики <sup>2</sup>.

вольт-амперная характеристика показана на рис. 5. Левее точки минимума натриевый ток инерционен и характеризуется более сложной зависимостью от  $\varphi$ . Однако и в этой области в ответ на быстрые толчки потен-

циала система ведет себя как омическая. Падающий участок на кривой зависимости  $J_{Na} - \varphi$  естественно объясняется ростом натриевой проводимости по мере сдвига потенциала в положительную сторону, причем эта проводимость, так же как калиевая, является инерционной. Правее точки минимума на рис. 4, б натриевая проводимость выходит на постоянное значение.

Мощным инструментом при исследовании природы ионных токов явились фармакологические агенты (особенно тетраэтиламмоний — ТЭА) и токсины (особенно тетродотоксин — ТТХ). При введении ТЭА внутрь аксона калиевый ток полностью подавляется, тогда как натриевый не изменяется. Введение ТТХ, наоборот, подавляет натриевый ток. Эти эксперименты практически доказывают наличие отдельных, натриевой и калиевой, систем проведения. Следует упомянуть также опыты с внутриклеточным введением фермента проназы, который ликвидирует натриевую инактивацию, не изменяя ни кинетику калиевого тока, ни кинетику натриевой активации. В совокупности все эти факты убедительно свидетельствуют о том, что в мембране имеются две независимые системы ионного транспорта, причем регуляция натриевой системы осуществляется двумя отдельными механизмами — активационным и инактивационным.

Изложенные результаты позволяют дать качественное объяснение явлению возбудимости. В ходе развития нервного импульса резко возрастает проницаемость мембраны для натрия, и внутрь волокна устремляется поток этих ионов. Весьма существенно, что процесс оказывается саморазгоняющимся — увеличение натриевой проницаемости способствует повышению потенциала на внутренней стороне мембраны, что в свою очередь увеличивает натриевую проницаемость. В результате система стремится к равновесному натриевому потенциалу. Одновременно включается система калиевого транспорта, которая выносит положительный заряд из клетки и возвращает мембранный потенциал к исходному значению.

### г) У р а в н е н и я   Х о д ж к и н а — Х а к с л и

Электрические явления в возбудимых мембранах количественно описываются с помощью уравнений, предложенных Ходжкиным и Хаксли. Хотя эти уравнения носят эмпирический характер, они играют исключительно большую роль в биофизике, фактически образуя тот язык, на котором обсуждается весь экспериментальный материал. Успех формализма Ходжкина — Хаксли свидетельствует, по-видимому, о том, что в его основе лежит правильная физическая картина процессов, протекающих в возбудимых биологических системах. Поэтому имеет смысл кратко остановиться на этом вопросе.

Временное поведение мембранного потенциала при пространственно-однородном возбуждении волокна описывается уравнением

$$C \frac{d\varphi}{dt} = -J, \quad (2)$$

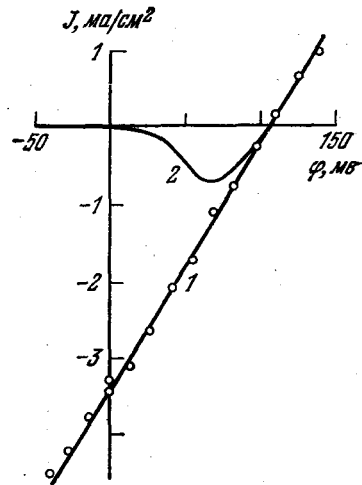


Рис. 5. Прямое измерение мгновенной натриевой проводимости (1).

Кривая (2) соответствует пиковой вольт-амперной характеристике \*.

где  $C$  — емкость мембраны, а ионный ток  $J$  складывается из двух парциальных — калиевого и натриевого

$$J = J_K + J_{Na}.$$

Каждый из этих токов, как это следует из опыта, можно рассматривать как ток, даваемый батареей с постоянной э. д. с. и переменной инерционной проводимостью:

$$\begin{aligned} J_{Na} &= g_{Na} (\varphi - \varphi_{Na}), \\ J_K &= g_K (\varphi - \varphi_K). \end{aligned} \quad (3)$$

Выделение линейных безынерционных сомножителей  $(\varphi - \varphi_i)$  оправдано экспериментально (см. прямую линию на рис. 5) Центральный вопрос

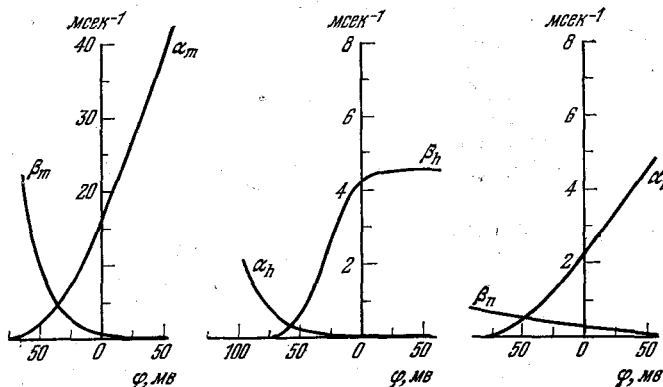


Рис. 6. Кривые зависимости констант скоростей  $\alpha$  и  $\beta$  от мембранного потенциала <sup>4</sup>.

состоит в том, как описать динамику и зависимость от потенциала инерционных проводимостей  $g_{Na}$  и  $g_K$ . Ходжкин и Хаксли <sup>5</sup> ввели «ненаблюдаемые» переменные  $m$ ,  $h$  и  $n$ , которые подчиняются линейным динамическим уравнениям:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= \alpha_m (1 - m) - \beta_m m, \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h (1 - h) - \beta_h h, \\ \frac{dn}{dt} &= \alpha_n (1 - n) - \beta_n n. \end{aligned} \quad (4)$$

Проводимости  $g$  определены как нелинейные функции этих переменных:

$$\begin{aligned} g_{Na} &= \bar{g}_{Na} m^3 h, & \bar{g}_{Na} &= 0,12 \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-2}, \\ g_K &= \bar{g}_K n^4, & \bar{g}_K &= 3,6 \cdot 10^{-2} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-2}. \end{aligned} \quad (5)$$

Зависимость кинетических коэффициентов  $\alpha$  и  $\beta$  от мембранного потенциала (рис. 6) выбрана из условий наилучшего совпадения расчетных и измеряемых методом фиксации потенциала парциальных  $J-t$  кривых. Этими же соображениями продиктован выбор степеней в соотношениях (5). Например, зависимость  $g_K \sim n^4$  хорошо описывает запаздывание калиевого тока. Введение двух переменных  $m$  и  $h$  для описания динамики натриевой проводимости связано с наличием двух независимых процессов — активации и инактивации, а конкретная степень также обусловлена



запаздыванием натриевого тока. На рис. 7 приведена зависимость стационарных значений  $m$ ,  $n$  и  $h$  от мембранного потенциала, из которой очевидно, что стационарный калиевый ток может протекать в широкой области потенциалов, тогда как стационарный натриевый ток ограничен узкой областью, где  $m^3$  и  $h$  одновременно отличны от нуля.

Обсуждение физической интерпретации уравнений Ходжкина — Хаксли будет проведено ниже. Здесь же мы ограничимся только общим выводом, который сводится к тому, что мембрана нервного волокна представляет собой нелинейный ионный проводник, свойства которого существенно зависят от электрического поля. Поэтому будет полезно рассмотреть особенности ионного транспорта через биологические мембраны и их модели.

### 3. ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

#### а) Бислойные липидные мембраны

Строение клеточных мембран на протяжении нескольких последних десятилетий представляли с помощью модели Даниелли — Давсона<sup>7</sup>. В середине мембраны расположен двойной слой молекул липида. Снаружи этот липидный «сендвич» покрыт слоем протеинов, которые могут проникать в глубь мембраны, образуя различные функциональные структуры,

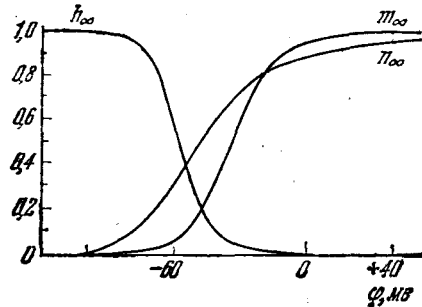


Рис. 7. Зависимость стационарных значений  $m$ ,  $n$  и  $h$  от мембранного потенциала<sup>6</sup>.

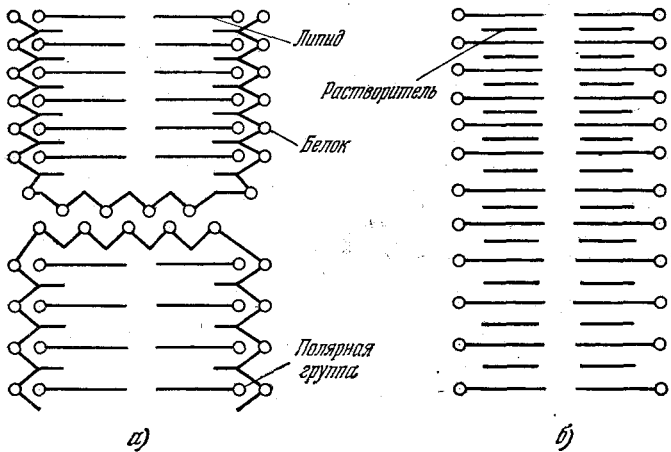


Рис. 8. Модель Даниелли — Давсона.

а) Клеточная мембрана, б) липидный бислой.

например, полярные поры (рис. 8, а). Толщина такого образования имеет порядок 100 Å. Модель Даниелли — Давсона, значительно усовершенствованная к настоящему времени, сыграла существенную роль в развитии мембранных исследований. Уже в 30-х годах нашего столетия предпринимались первые попытки приготовить тонкие устойчивые липид-

ные или протеолипидные модельные структуры. Эти попытки увенчались успехом в 1961 г., когда Мюллер и др. открыли, что суспензия экстракта окисленных фосфолипидов мозга быка в водном растворе самопроизвольно образует бимолекулярную (черную) пленку<sup>8</sup>.

Идея опыта оказалась удивительно простой. Некоторое количество фосфолипида растворяется в жидком углеводороде, например, в *n*-декане. В сосуде с водой помещается тефлоновая перегородка с небольшим отверстием. На это отверстие наносится капля раствора липидов. Постепенно растекаясь, она превращается сначала в толстую пленку с радужными разводами, а затем утоньшается и становится черной.

Прежде всего было интересно определить толщину черных пленок. Наиболее простой и распространенный способ заключается в измерении электрической емкости пленки. Зная диэлектрическую постоянную липидов (она заключена в пределах от 2 до 3), по формуле плоского конденсатора непосредственно вычисляют толщину. Слегка изменяясь в зависимости от состава липидов, толщина оказалась приблизительно равной 50 Å. Это в точности соответствует двум длинам углеводородных цепей липидных молекул. Оптические измерения дают величину 70 Å, куда, по-видимому, включаются и полярные головки липидов.

Таким образом, бислойную липидную мембрану (БЛМ) можно представлять так, как показано на рис. 8, б. Возникает вопрос о том, каково состояние и расположение молекул растворителя в мембране. В принципе они могут размещаться либо между двумя липидными слоями, либо в пределах каждого слоя между молекулами липидов. Полученные оценки исключают первую возможность. При изучении БЛМ из фосфатидилхолина<sup>9</sup> было показано, что на одну молекулу липида в пленке приходится площадь около  $75 \text{ Å}^2$ , тогда как минимально возможная площадь составляет  $58 \text{ Å}^2$ . Это позволило заключить, что молекулы растворителя присутствуют в каждом слое между молекулами липидов в соотношении примерно 1 : 1. Именно такая ситуация изображена на рис. 8, б. В природных мембранах роль простых молекул растворителя, по-видимому, играют более полярные наполнители.

Таким образом, БЛМ представляет собой тонкую пленку углеводородов, стабилизированных в водной фазе молекулами липидов, которые сами вносят существенный вклад в объем этой пленки. Из термодинамического анализа таких пленок следует<sup>10</sup>, что молекулы, способные образовывать подобные структуры, должны обладать высокой энергией адсорбции как на масле, так и на воде. Этим условиям естественно удовлетворяют липиды, содержащие длинные углеводородные цепи и короткие сильно полярные группы. Еще одним требованием, которому также удовлетворяют липиды, является условие, что поперечное сечение их головок не должно сильно отличаться от сечения углеводородных цепей.

Совершенно уникальной чертой БЛМ является то, что в одном направлении они имеют молекулярные размеры, а в другом макроскопические. Обычно эти длины отличаются в  $10^6$  раз. В этой связи возникает довольно много вопросов, которые в настоящее время не имеют исчерпывающих ответов. Это в первую очередь относится к структуре, устойчивости, фазовым переходам в таких пленках. Несмотря на отдельные исследования, в этой области еще предстоит много сделать.

Бислойные липидные мембраны моделируют скелет клеточных мембран, который представляет собой барьер между двумя объемами жидкости. Если на этот скелет или матрицу посадить подходящие функциональные группы, то ей можно придать определенные функции, присущие клеточным мембранам. Так, применяя аламетицин вместе с поверхностно-актив-

ным белком протамином, Мюллер и Рудин сумели реконструировать на искусственной мембране явление электровозбудимости<sup>11</sup>. В дальнейшем, используя различные вещества и клеточные фракции, разным авторам удалось воспроизвести целый ряд мембранных явлений.

#### б) Перенос заряда через мембраны

Уже первые измерения электрических свойств БЛМ показали, что они значительно отличаются от клеточных мембран. Если электропроводность клеточных мембран составляет примерно  $10^{-3} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-2}$ , то электропроводность БЛМ, в зависимости от условий опыта, меняется в пределах от  $10^{-6}$  до  $10^{-10} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-2}$ . Наиболее типичным значением можно считать  $10^{-8} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-2}$ . Это очень низкая проводимость. Для наглядности сравним ее с проводимостью омывающего раствора электролита. Если в этом растворе присутствует КСl с концентрацией 0,01 М, то проводимость водного слоя такой же толщины, как у БЛМ, составляет  $10^4 \text{ см}^{-1} \text{ см}^{-2}$ . Отличие достигает  $10^{12}$  крат.

Очень важным было открытие класса веществ, которые могут радикальным образом изменять электрические свойства мембран (обзор см. в<sup>12, 13</sup>). Они были названы ионофорами. В их присутствии проводимость мембран возрастает на много порядков. Сами ионофоры требуются в небольших количествах; они лишь обеспечивают перенос через мембрану других ионов, присутствующих в растворе. Проводимость в этом случае носит селективный характер. К ионофорам принадлежат жирорастворимые кислоты — 2,4-динитрофенол, дикумарол, тетрахлортрифторметилбензимидазол (ТТФБ) и т. п., полипептиды — валиномидин, группа антинов, грамицидины А, В и С, аламетицин.

В подавляющем большинстве работ, посвященных изучению электрических свойств, липидные мембраны рассматриваются как однородная фаза. Довольно очевидны ограничения такого подхода, но тем не менее он позволяет получить довольно важные результаты. Проводимость мембраны определяется концентрацией имеющихся в ней носителей тока и их подвижностью. Чрезвычайно низкая диэлектрическая проницаемость липидов (она заключена в пределах от 2 до 3) очень неблагоприятна для внедрения заряженных частиц в мембрану. Коэффициент распределения частиц между липидной и водной фазами равен

$$\gamma = \frac{c_m}{c_w} = e^{-W/kT}, \quad (6)$$

где  $W$  — энергия частицы в липиде, отсчитанная от энергии в воде. Она складывается из электростатической энергии и энергии гидрофобного взаимодействия:

$$W = W_e + W_n.$$

Основным является первый член, который в случае сферических частиц с радиусом  $a$  принимает вид

$$W_e = \frac{q_0}{a} \left( \frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_w} \right), \quad (7)$$

$$q_0 = \frac{ze^2}{2kT}.$$

При температуре 25 °С и единичной валентности величина  $q_0 = 282 \text{ \AA}$ . Если радиус иона положить равным  $2 \text{ \AA}$ , а диэлектрическую постоянную мембраны  $\epsilon_m = 3$ , то коэффициент распределения окажется равным  $10^{-20}$ . В таком случае проводимость бислойных мембран была бы существенно

ниже указанных ранее значений. Положение может быть несколько поправлено за счет гидрофобных взаимодействий, которые повышают коэффициент распределения в пользу липидной фазы. Кроме того, существует еще ряд обстоятельств, которые могут снизить энергию частицы внутри мембраны. К их рассмотрению мы сейчас и перейдем.

Существует по крайней мере четыре фактора, снижающих энергию иона в мембране <sup>14</sup>:

- 1) мембрана имеет конечную толщину;
- 2) ионы могут образовывать ионные пары внутри мембраны;
- 3) мембрана может иметь поры с высокой диэлектрической постоянной, через которые проходят частицы;

4) ион может быть «завернут» в нейтральную молекулу «переносчика», с высокой поляризуемостью, которая сольватирует его (увеличивает эффективный радиус  $a$ ) и тем самым способствует его растворению в фазе мембраны.

Расчет каждого из этих эффектов приводит к следующим результатам.

а) На границе между мембраной и водной фазой возникают силы изображения. Электростатическая энергия  $W_e$  иона в мембране снижается и принимает вид кривой, приведенной на рис. 9, а <sup>15</sup>. В центре мембраны энергия за счет сил изображения понижается на

$$\frac{e^2}{\epsilon_m l} \ln \frac{2\epsilon_w}{\epsilon_w + \epsilon_m}. \quad (8)$$

При  $\epsilon_w = 80$  и  $\epsilon_m = 2$  относительное отличие от энергии иона в бесконечной среде составляет  $1,4 \cdot a/l$ , т. е. не превышает нескольких процентов. На этом примере наглядно видно, что углеводородная часть мембраны представляет собой существенный барьер для прохождения ионов. Высота барьера составляет несколько десятков ккал/моль.

б) Образование ионных пар из двух расположенных поблизости сфер при ионном взаимодействии также не дает заметного выигрыша. Электростатическая энергия двух частиц с радиусами  $a_+$  и  $a_-$ , разделенных расстоянием  $d$  (см. рис. 9, б), равна

$$W = \frac{e^2}{2\epsilon_m a_+} + \frac{e^2}{2\epsilon_m a_-} - \frac{e^2}{\epsilon_m d}. \quad (9)$$

Рис. 9. К расчету энергии иона в мембране.

а) Влияние сил изображения; б) образование ионных пар; в) гидрофильная пора в мембране; г) влияние комплексообразования.

Отсюда видно, что максимальное понижение энергии будет не более чем двукратным. Только в случае ковалентной связи между заряженными частицами электрическое поле вокруг них будет существенно понижено, однако это уже означало бы разряд двух ассоциированных частиц.

в) Пóры с высокой поляризуемостью могут значительно понизить энергию заряда в мембране (см. рис. 9, в). При  $b \ll l$  энергия частицы на оси пóры равна

$$W_p = \frac{e^2}{2\epsilon_p a} + \frac{e^2}{\epsilon_m b} P\left(\frac{\epsilon_m}{\epsilon_p}\right). \quad (10)$$

Второй член в этой формуле вызван силами изображения в стенках поры. Он обратно пропорционален радиусу поры  $b$ . Функция  $P(x)$  рассчитана численно<sup>14</sup>. Ее максимальное значение не превышает 0,25. Если, например, величина  $\varepsilon_p$  сравнима с  $\varepsilon_w$ , то величина барьера для иона, проходящего через мембрану, дается просто вторым членом. При  $\varepsilon_m = 2$  он равен

$$\frac{e^2}{2b} P\left(\frac{1}{40}\right) \approx \frac{28}{b} \text{ ккал/моль}, \quad (11)$$

где величина  $b$  выражена в ангстремах.

г) Рассмотрим, наконец, возможность комплексообразования. Пусть нейтральная молекула с высокой поляризуемостью может образовывать сферический комплекс с ионом. Если внешний радиус комплекса равен  $b$ , то его энергия в среде имеет вид

$$W_c = \frac{e^2}{2\varepsilon_m b} + \frac{e^2}{2\varepsilon_c} \left( \frac{1}{a} - \frac{1}{b} \right). \quad (12)$$

В случае высокой поляризуемости молекулы комплексообразователя, когда вторым членом можно пренебречь, энергия комплекса все еще заметна по сравнению с тепловой энергией, хотя и значительно меньше, чем энергия «голого» иона. Например, если  $b \sim 5 \div 10 \text{ \AA}$ , то при температуре  $25^\circ\text{C}$

$$W_c = 16,5 \div 8,2 \text{ ккал/моль или } 9,8 \div 4,9 \text{ кТ/ион.}$$

Следует отметить еще одно немаловажное обстоятельство. Если прращение электростатической энергии иона в углеводородной фазе велико, то в мембране может возникнуть мощная электрострикция. Оценки показывают, что возникающие давления имеют порядок атмосферы. Не исключено, что это может вызвать локальное утоньшение мембраны и тем самым существенно повлиять на ионный транспорт.

Конечно, проделанные оценки имеют весьма грубый характер. Однако они ясно указывают, что барьер для прохождения иона через мембрану можно значительно снизить благодаря комплексообразованию или специальным порам. Если теперь возвратиться к ионофорам, существенно облегчающим ионный транспорт через мембраны, то можно предположить, что они действуют по одному из этих двух механизмов.

Теории индуцированного ионного транспорта посвящена большая литература<sup>13</sup>. В ней детально разработаны методы «электрической диагностики» механизмов ионного транспорта. Однако представляет интерес изучение механизмов с помощью прямого определения энергии активации проводимости. В работе<sup>16</sup> измерялась температурная зависимость проводимости мембран в присутствии ряда ионофоров. В исследованной области температур от  $17$  до  $45^\circ\text{C}$  проводимость описывается формулой

$$g = Ae^{-H/RT},$$

где  $H$  — активационная энтальпия суммарного процесса переноса. При этом для монактина  $H$  оказалась равной  $32,5 \text{ ккал/моль}$ , для валиномицина  $55 \text{ ккал/моль}$  и для грамицидина А  $9,3 \text{ ккал/моль}$ . Еще раньше на основании исследований другого типа было показано, что валиномицин и монактин представляют собой подвижные переносчики, а грамицидин А должен образовывать внутри мембраны полярную пору. Приведенные выше цифры подтверждают это заключение. Кроме того, Хладки и Хейдон<sup>17</sup>, изучая проводимость мембран при низких концентрациях грамицидина, наблюдали

дискретные флуктуации проводимости (рис. 10). Каждая ступенька на этом рисунке отвечает созданию или разрушению одиночного канала.

Отличие двух механизмов было продемонстрировано также в работе <sup>18</sup>. Специально подобранные липидные мембраны могли быть «заморожены»

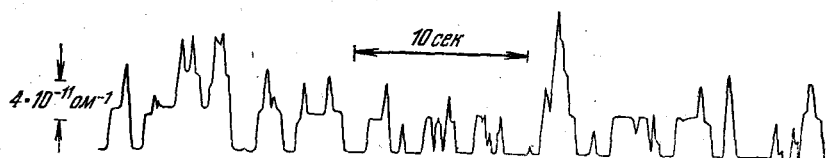


Рис. 10. Флуктуации проводимости бислойной мембраны, содержащей грамицидин А и «расплавлены» при изменении температуры. В присутствии валиномицина и нонактина проводимость резко уменьшалась при «замораживании» мембраны, тогда как свойства грамицидина А не изменялись. Простейшее

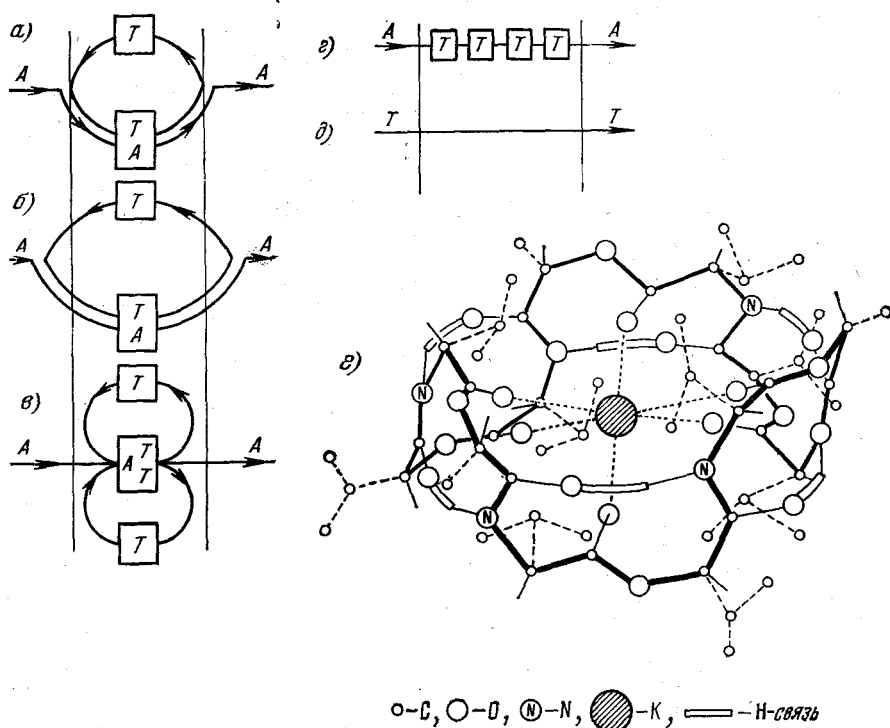


Рис. 11. Механизм переноса ионов через мембраны.

а) Подвижные переносчики с «малой каруселью» (переносчик Т заключен в мембране, а комплексообразование происходит на границах раздела мембрана — раствор); б) подвижные переносчики с «большой каруселью» (переносчик Т имеется и в мембране, и в растворе, комплексообразование происходит в растворе); в) коллективный транспорт (ион А переносится несколькими частицами переносчика Т); г) эстафетный перенос; д) прямое прохождение; е) строение молекулы валиномицина <sup>12</sup>.

объяснение этого явления опять состояло в том, что валиномицин и нонактин, в отличие от грамицидина А, действуют как подвижные переносчики, чья подвижность резко снижается при «замораживании» мембраны. В то же время на свойства поры состояние окружающих липидных молекул заметного влияния оказывать не должно.

Таким образом, индуцированный транспорт, возникающий в присутствии ионофоров, может осуществляться по механизму подвижных

переносчиков<sup>19</sup> и с помощью специальных пор. Последний механизм называют также эстафетным, поскольку пора может быть образована несколькими последовательно расположенными молекулами, между которыми осуществляется передача иона. Возможна разновидность механизма подвижных переносчиков, когда ион переносится не одной молекулой, а сразу несколькими — этот вариант носит название коллективного транспорта. Если сюда добавить механизм прямого прохождения крупных жирорастворимых ионов, таких как тетрафенилборат и дипикриламид, то мы получим все основные типы механизмов, которые рассматриваются в литературе (рис. 11)<sup>13</sup>. Простейшим является механизм прямого прохождения ионов через мембрану. С него мы и начнем изложение закономерностей ионного транспорта. Однако в начале уделим еще немного времени более детальному молекулярному описанию мембран.

### в) Молекулярный подход

До сих пор мы рассматривали липидную мембрану как совершенно однородную сплошную фазу. Ясно, что это является лишь приближением к реальности и не охватывает многих важных свойств мембраны. Поэтому делались попытки более детального описания мембраны и, в частности, процесса переноса частиц через нее.

Прежде всего отметим, что бислойная липидная мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии. С одной стороны, она является весьма текучей, — ее отдельные компоненты подвижны, а, с другой стороны, молекулы липидов в весьма высокой степени упорядочены — они расположены в два слоя, и их углеводородные хвосты вытянуты. В пределах каждого слоя возможна большая или меньшая степень упорядоченности. В работе<sup>20</sup> была исследована дифракция электронов на бислоях из фосатидилхолина. Дифракционные картины показали, что бислой состоит из большого числа маленьких, но хорошо упакованных участков, ориентация которых несколько отличается от ориентации соседей. Размер кристаллитов оценивается в несколько сотен ангстрем. Такие образования должны иметь динамический характер и видоизменяться с течением времени.

Подвижность липидных молекул, составляющих мембрану, важна с точки зрения переноса частиц через мембрану. Движение может быть параллельным поверхности мембраны и поперечным. Поперечное движение молекул изучал еще Лэнгмюр<sup>21</sup> на примере полисоев стеарата бария. В последние годы благодаря развитию чувствительных методов, и в частности, применению спин-метки, появилась возможность более детального изучения этого процесса. В работе<sup>22</sup> было показано, что молекулы стеарата бария обмениваются между отдельными слоями с характерным временем «полураспада» равным 25 мин. при 25 °C. Там же высказано предположение, что в «жидких областях» биологических мембран обменные процессы с участием липидов должны проходить с большей скоростью.

Переход липидных молекул из одного слоя в другой обладает одной существенной особенностью: молекула должна не только переместиться в другое место, но и повернуться при этом, так как ее полярная головка должна быть направлена в противоположную сторону. Это обстоятельство, по-видимому, может играть существенную роль в транспортных процессах. Проиллюстрируем это на примере переноса хлора через липидные мембраны.

В ряде работ отмечалось, что поток ионов хлора, рассчитанный по электропроводности мембраны и померенный с помощью меченых атомов, имеет разные значения, причем изотопный поток оказывается на три

порядка больше <sup>23</sup>. Электрический потенциал, приложенный к мембране, на него не оказывает никакого влияния. Таким образом, в мембране действует какой-то электрически не проявляющийся процесс, приводящий к интенсивному переносу ионов. Подобные явления довольно хорошо известны в биологии, и их связывают с обменными процессами, в которых происходит эквивалентный обмен ионов из одного резервуара на такие же ионы из другого. Обменную диффузию проще всего осуществить с помощью переносчиков, которые могут перемещаться через мембрану только в нагруженном состоянии. Однако в рассматривавшихся мембранах не было ничего, кроме самих липидов. Поэтому естественно родилось предположение, что обменную функцию осуществляют сами липиды. Ионы хлора объединяются с полярными головками липидов, и образовавшиеся комплексы переносятся через мембрану. Такой механизм объясняет не только различие между электрическим и изотопным потоками, но и насыщение потоков при увеличении концентрации. Такой переворот, или флип-флоп липидных молекул, идет с разной скоростью в зависимости от

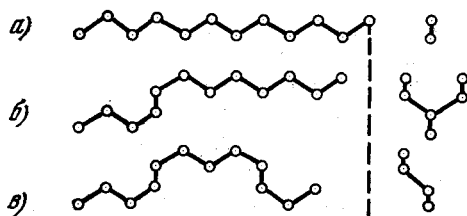


Рис. 12. Конформационная перестройка углеводородной цепи.

а) Вытянутая цепь, б) цепь с простейшим кинком, в) комбинация двух кинков  $2g1$ . Следует обратить внимание на эффективное укорочение цепи. Справа показан вид цепи сбоку.

состава мембраны и условий опыта. Так у фосфатидилхолина характерное время флип-флопа составляет несколько часов.

Флип-флоп — это довольно сложный в геометрическом смысле процесс. Для того чтобы повернуть крупную молекулу, предварительно требуется освободить большое пространство. Поэтому более вероятным представляется флип-флоп не одной молекулы, а одновременно двух из разных слоев <sup>24</sup>. Такой одновременный флип-флоп двух молекул освобождает место в каждом из слоев для внедрения новых молекул. Вовлечение двух, а возможно, и более, молекул, по-видимому, может объяснить довольно большую активационную энергию процесса, которая достигает 19,4 ккал/моль.

Разумеется, не всякий вид мембранного транспорта сопряжен с флип-флопом липидных молекул, однако в каждом случае должно происходить какое-то перемещение мембранных компонент. Эта проблема тесно связана с диффузией молекул в полимерных материалах. Экспериментальные и теоретические исследования механической релаксации в полиэтилене, парафинах и других полимерных материалах показывают, что полимерные материалы как в кристаллическом, так и в жидкокристаллическом состоянии содержат определенные типы подвижных структурных дефектов, так называемых кинков <sup>25, 26</sup>, которые являются следствием конформационных перестроек углеводородных цепей. Присутствуя в углеводородной части мембраны, кинки образуют небольшие подвижные «кармашки» или «пузырьки» свободного пространства различных размеров, в зависимости от их типа и положения. Транспортируемая молекула из водной фазы вблизи мембраны может перейти в свободное пространство кинка на поверхности мембраны и затем диффундировать через мембрану вместе с подвижным кинком <sup>27</sup>.

Происхождение кинков связано со специфической природой углеводородной цепи. В вытянутой цепи (рис. 12) все связи находятся в *транс*-конформации. Однако каждая C — C-связь может быть повернута на угол  $\pm 120^\circ$ . Такое состояние называется *гош*-конформацией. Если вытянутую углеводородную цепь повернуть вокруг какой-нибудь C — C-связи



на угол  $120^\circ$ , а затем вокруг другой С — С-связи, расположенной через одну от исходной, на угол  $-120^\circ$ , то получится конформация (рис. 12), которая в работе <sup>25</sup> была названа простейшим кинком *2g1*. Линейная молекула оказывается как бы дважды переломленной; она состоит из двух участков, оси которых смещены друг от друга. На рис. 13 приведена фотография молекулярных моделей таких цепей <sup>27</sup>.

При образовании кинка цепь эффективно укорачивается на длину одной  $\text{CH}_2$  группы. По этой причине мало вероятно, чтобы кинки образовывались или исчезали в средней части цепи, поскольку тогда пришлось

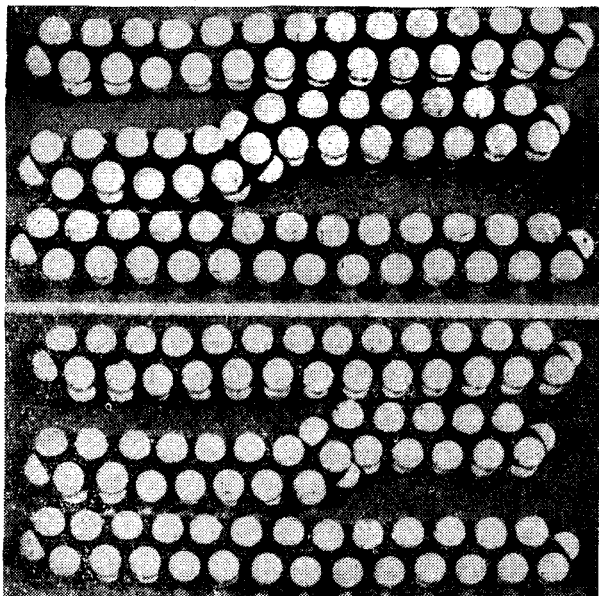


Рис. 13. Молекулярная модель углеводородной цепи с кинком.

бы подтягивать довольно длинные концы молекулы. Кинкам гораздо легче образовываться (и исчезать) на поверхности, откуда они могут мигрировать в толщу мембраны.

Разность энергии между транс- и гош-конформациями была рассчитана на примере молекулы бутана <sup>28</sup> и оказалась равной  $0,8 \text{ ккал/моль}$ . Поэтому образование одного кинка приводит к увеличению собственной энергии изолированной цепи на  $2 \times 0,8 = 1,6 \text{ ккал/моль}$ . Активационная энергия перехода из транс- в гош-конформацию составляет  $2,4 \text{ ккал/моль}$ . На две связи это дает  $4,8 \text{ ккал/моль}$ . Однако образование кинка приводит к значительному повышению энтропии системы, следовательно, термодинамически кинки достаточно выгодны. Свободная энергия образования и миграции кинков сравнима с тепловой энергией при комнатной температуре ( $kT = 0,6 \text{ ккал/моль}$ ). Поэтому можно ожидать, что углеводородная часть мембраны в равновесии содержит достаточно много кинков, которые постоянно движутся вдоль молекулярных цепей.

В работе <sup>26</sup> проведен статистический расчет концентрации кинков. В общем случае доля  $\text{CH}_2$ -групп, находящихся в гош-конформации, растет с температурой. В парафинах и линейных полимерах, так же как и в липидах, концентрация кинков претерпевает два резких скачка при повышении температуры. Один ротационный фазовый переход происходит при температуре  $T_1$ , лежащей ниже точки плавления материала, а второй —

при температуре плавления  $T_m$ . При  $T \leq T_t$  концентрация кинков  $\xi$  не превышает 0,05, а при  $T > T_t$  величина  $\xi$  лежит в пределах от 0,1 до 0,5. Для большинства мембранных липидов комнатная температура превышает температуру перехода  $T_t$ . Следовательно, концентрация кинков в липидной мембране заключена в пределах 0,1—0,5. Зная эту величину, можно рассчитать абсолютную концентрацию кинков, которая в общем случае равна  $c_k = 8,5 \cdot 10^{-2}$  моль/см<sup>3</sup>. При подходящей комбинации двух 2g1-кинков могут быть образованы достаточно большие пустоты, вмещающие воду и другие частицы. Большинство таких пустот имеет протяженность в несколько звеньев углеводородной цепи, следовательно, сквозных пор они не образуют.

Увеличение концентрации кинков должно приводить к повышению удельного объема липидов. Действительно, рентгеновское исследование показало, что ротационный фазовый переход в парафине сопровождается увеличением объема на 2—4%<sup>29</sup>.

И наконец, подвижность кинков. Оценки показывают, что коэффициент диффузии кинков должен составлять примерно  $10^{-5}$  см<sup>2</sup>/сек<sup>27</sup>. Эта величина того же порядка, что коэффициент диффузии частиц в воде.

В модели кинков углеводородная фаза мембраны рассматривается как упорядоченная структура с дефектами. Механизм кинков будет неприменим, если степень беспорядка столь велика, что углеводородная фаза напоминает скорее жидкость, чем упорядоченную структуру. Предложенный механизм, скорее всего, имеет отношение к прохождению через мембрану небольших нейтральных молекул с эффективным объемом, равным или несколько превышающим объем мономера СН<sub>2</sub>. Он может участвовать и в прохождении сравнительно крупных ионов через мембрану. Однако проникновение больших молекул, таких как циклические антибиотики, не может быть описано простым механизмом. Присутствие больших молекул должно приводить к сильному искажению углеводородных цепей. Такое искажение, однако, может быть описано в терминах образования комбинации кинков в соседних цепях.

### г) Прямое прохождение

Теперь мы перейдем к феноменологическому описанию закономерностей ионного транспорта через тонкие мембраны. Наиболее подробно изучен простейший вид ионного транспорта — прямое прохождение заряженных частиц. Существует два подхода к его описанию — дискретный и непрерывный. В дискретном подходе, основанном на эйринговской теории абсолютных скоростей реакций<sup>30</sup>, предполагается, что частица преодолевает мембрану с помощью нескольких дискретных перескоков через активационные барьеры. Непрерывный подход основан на представлении о свободной диффузии и миграции частиц в мембране, которая рассматривается как сплошная однородная фаза. В таком случае ток ионов сорта  $k$  дается выражением

$$J_k = z_k u_k RT \left( \beta z_k c_k E - \frac{dc_k}{dx} \right); \quad (13)$$

здесь  $z_k$  — заряд иона сорта  $k$  (в единицах заряда протона),  $u_k$  — подвижность, связанная с коэффициентом диффузии  $D_k$  соотношением Эйнштейна  $D_k = u_k / \beta$  ( $\beta = e/kT = F/RT$ ),  $E$  — напряженность электрического поля, которая удовлетворяет уравнению Пуассона

$$\frac{dE}{dx} = \frac{F}{\epsilon} \sum_k z_k c_k; \quad (14)$$

здесь  $\varepsilon$  — диэлектрическая постоянная мембраны,  $c_k$  — концентрация ионов сорта  $k$ . В стационарном случае  $J_k = \text{const}$ , т. е. (13) представляет собой нелинейное дифференциальное уравнение первого порядка, содержащее неизвестные функции  $c_k$  и  $E$  и неизвестную постоянную  $J_k$ . В нестационарном случае имеем уравнение непрерывности

$$\frac{\partial J_k}{\partial x} + Fz_k \frac{\partial c_k}{\partial t} = 0, \quad (15)$$

а полный ток  $J_0$  складывается теперь из тока смещения и ионного тока

$$J_0 = \varepsilon \frac{\partial E}{\partial t} + \sum_k J_k. \quad (16)$$

Из уравнения (13) в стационарном случае можно получить важное интегральное соотношение

$$J_k = -g_k (\varphi - \varphi_k), \quad (17)$$

где  $\varphi_k$  — равновесный мембранный потенциал для ионов  $k$ , а проводимость  $g_k$  равна

$$g_k = Fz_k^2 u_k / \int_0^\delta \frac{dx'}{c_k(x')}. \quad (18)$$

Проводимость  $g_k$  зависит от потенциала через концентрационный профиль, т. е. вольт-амперная характеристика является нелинейной. Тем не менее, запись в форме (17), где выделен линейный по смещению потенциала сомножитель, имеет определенный смысл. Во-первых, при вычислении проводимости в пределе малого внешнего поля можно использовать равновесный концентрационный профиль, после чего решение сводится к одной квадратуре. Во-вторых, при быстром изменении внешнего поля распределение концентраций в мембране не успевает перестроиться, а поэтому на малых временах формула (17) предсказывает линейность связи ток — потенциал.

Электродиффузионная задача значительно упрощается, когда объемный заряд в мембране мал. Чтобы построить и обосновать соответствующее приближение, необходимо найти равновесное распределение потенциала в мембране и омывающих ее растворах для случая одного проникающего иона. В приближении самосогласованного поля концентрации ионов связаны с потенциалом соотношением Больцмана, т. е. уравнение Пуассона (14) оказывается замкнутым. Результат решения представлен на рис. 14, а, кривая (1). Скачок потенциала в мембране, определенный как разность потенциалов между ее центром и любой из границ равен

$$\psi(0) - \psi\left(\frac{\delta}{2}\right) = -\frac{\kappa_m^2 \delta^2}{16}, \quad (19)$$

где  $\psi = e\varphi/kT$ ,  $\delta$  — толщина мембраны,  $\kappa_m^2 = \kappa^2 \gamma \varepsilon / \varepsilon_m$ ,  $\kappa = \sqrt{8\pi e c \beta / \varepsilon}$  — дебаевский параметр,  $c$  — объемная концентрация проникающего иона

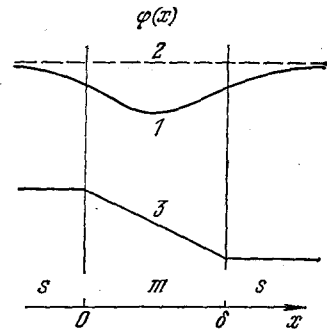


Рис. 14. Распределение потенциала в системе раствор (s) — мембрана (m). 1 — общий случай, 2 — эквипотенциальное распределение, 3 — приближение постоянного поля.

в растворе. Таким образом, скачок потенциала в мембране определяется соотношением между ее толщиной и длиной экранирования, которая зависит прежде всего от числа носителей. При типичных значениях параметров длина экранирования на несколько порядков превосходит толщину мембраны, т. е. потенциал постоянен (пунктирная прямая (2) на рис. 14, а). Это означает, что при наложении внешнего поля результирующее поле в мембране можно считать постоянным (см. случай (б) на рис. 14).

Уравнение Нернста — Планка при  $E = \text{const}$  значительно упрощается. Парциальная вольт-амперная характеристика в этом приближении приобретает вид

$$J_k = \frac{z_k^2 RT u_k \psi}{\delta} \frac{c_k(0) - c_k(\delta) e^{-z_k \psi}}{1 - e^{-z_k \psi}}, \quad (20)$$

где  $c_k(0)$  и  $c_k(\delta)$  — концентрации в фазе мембраны, которые связаны с соответствующими концентрациями в растворах  $c_k^0$  и  $c_k^i$  с помощью коэффициентов распределения  $\gamma_k$ , например,

$$c_k(0) = \gamma_k c_k^i.$$

Именно этот формализм, основанный на представлении о диффузии и миграции ионов в сплошной однородной фазе, применяется для описания состояния покоя биологических мембран. Например, на основе соотношений (20) нетрудно вычислить мембранный потенциал, являющийся одной из основных характеристик нервной клетки. Как уже упоминалось, мембрана гладких волокон проницаема для ионов натрия, калия и хлора. Поэтому состояние покоя является стационарным, а не термодинамически равновесным. При разомкнутой цепи условие стационарности сводится к компенсации парциальных ионных токов,  $\sum_k J_k = 0$ . Это условие фактически является уравнением для определения мембранного потенциала, решение которого имеет вид

$$\psi = \ln \frac{P_{K^+} c_{K^+}^0 + P_{Na^+} c_{Na^+}^0 + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^i}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^0}, \quad (21)$$

где введены так называемые проницаемости  $P_i = u_i \gamma_i / \beta \delta$ .

Соотношение (21) удовлетворительно описывает экспериментальные данные, если только интервал концентраций не слишком широк. Это едва ли можно рассматривать как серьезный аргумент в пользу применимости электродиффузионной теории к описанию электрических характеристик нервных клеток в состоянии покоя, так как неизвестные параметры  $P_i$  определяются из того же круга экспериментов. Более того, вся совокупность имеющихся фактов говорит о том, что рассмотрение мембраны как сплошной однородной фазы, используемое в электродиффузионной теории, не является адекватным. Поэтому фактически основанием для использования соотношений (20), (21) является их простота и отсутствие надежной информации об истинных механизмах ионного транспорта в состоянии покоя. Значительно больше известно о явлении переноса ионов через мембраны в процессе возбуждения, когда проводимость системы резко повышена. Твердо установлено, что в этом случае ионный транспорт осуществляется через специализированные липопротеиновые структуры, называемые ионными каналами. К описанию переноса через каналы, требующему специального формализма, мы и перейдем.

## 4. ИОННЫЕ КАНАЛЫ

## а) Факты и гипотезы

Сейчас уже накоплено множество аргументов в пользу того, что проводящие структуры биомембран действуют по типу каналов, а не подвижных переносчиков<sup>31</sup>. Упомянем в этой связи эксперимент Чандлера и Мевеса<sup>32</sup>, в котором изучалась высокочастотная проводимость мембраны в таких условиях, когда в растворе отсутствовали проникающие ионы — натрий и калий. Если бы в мембране существовали заряженные подвижные группы, то в переменном поле был бы зафиксирован электрический ток, по порядку величины равный ионному току в обычных условиях. Однако высокочастотная проводимость в пределах точности эксперимента оказалась равной нулю. Отсюда был сделан вывод об отсутствии подвижных переносчиков и дана оценка сверху числа каналов. Последующие опыты со связыванием ТТХ и ТЭА, а также измерения электрических флуктуаций (см. раздел в) гл. 5) подтвердили эти данные — на  $1 \text{ мкм}^2$  приходится порядка сотен натриевых каналов. Проводимость одиночного натриевого канала оценивается в  $4 \cdot 10^{-12} \text{ ом}^{-1}$ , а калиевого —  $12 \cdot 10^{-12} \text{ ом}^{-1}$ <sup>33</sup>. В структурном отношении ионный канал до сих пор остается в значительной мере неопределенным понятием. Выделить и охарактеризовать мембранные белки возбудимых биологических мембран, ответственные за регулируемый ионный транспорт пока не удалось. Поэтому в литературе распространены весьма различные представления о природе ионных каналов. Опираясь на аналогию с искусственными каналами в БЛМ, где электрическое поле влияет на статистический процесс сборки канала из субъединиц, некоторые авторы считают, что в биологических мембранах нет предсуществующих ионных каналов, а наблюдаемый процесс повышения проводимости при деполяризации отвечает их сборке. Более распространена другая точка зрения, согласно которой канал представляет собой достаточно жесткую макромолекулярную систему, способную к небольшим конформационным перестройкам. Целый ряд аргументов, на анализе которых мы не будем останавливаться, свидетельствует в пользу последней точки зрения \*). Представление о ионном канале, как о липопротеиновом комплексе, характеризующемся совокупностью конформационных состояний, позволяет рассматривать его как «векторный» фермент, который катализирует реакцию переноса иона. Особенность этого транспортного фермента состоит в том, что его активность управляется электрическим полем. Аналогия транспортных мембранных систем с ферментами распространяется и в область специфичности. Как показали исследования в области мембрано-активных комплексов<sup>12</sup>, механизм взаимодействия иона с комплексом включает конформационную перестройку всего комплекса и хорошо моделирует индуцированное соответствие между субстратом и активным центром фермента.

Ионный канал выполняет два основные функции — делает мембрану селективной и управляемой полем. Возникает естественный вопрос, можно ли установить соответствие между этими функциями канала и какими-то молекулярными группами. В более скромной (и более реалистической) постановке вопрос этот звучит так — можно ли утверждать, что различные функции осуществляются разными группами канала. Дать категорический ответ пока не представляется возможным, хотя считается наиболее вероятным, что транспортно-селективная и регуляторная функции реали-

\*) Пожалуй, наиболее убедительным доводом в пользу предсуществующих каналов является факт связывания ТТХ с закрытым натриевым каналом.

зуются различными участками канала. Анализ различных функций канала мы начнем с изучения транспортной системы. Иными словами, рассмотрим ионный перенос через открытые каналы.

Ионные каналы высоко селективны. Тем не менее, замещая в наружном растворе ионы натрия на другие катионы и блокируя калиевый канал с помощью тетраэтиламмония, удастся реализовать такую искусственную ситуацию, когда через натриевый канал переносятся другие катионы. В результате можно найти ряд проницаемостей для серии катионов. Пример такого ряда дает табл. II<sup>4</sup>, основанная на данных Хилле<sup>34</sup>.

Таблица II

Относительные проницаемости натриевых каналов перехвата Ранвье для одновалентных катионов

Ион	$P_{\text{ион}}/P_{\text{Na}}$	Ион	$P_{\text{ион}}/P_{\text{Na}}$
Натрий	1,00	Формамидин	0,14
Гидроксиламин	0,94	Гуанидин	0,13
Литий	0,93	Гидроксигуанидин	0,12
Гидразин	0,59	Калий	0,09
Таллий	0,33	Аминогуанидин	0,06
Аммоний	0,16		

Аналогичные эксперименты были недавно проведены и для случая калиевого канала (табл. III). Используя ряд катионов с разными кристаллографическими радиусами, удалось оценить геометрические характеристики натриевых и калиевых каналов.

Таблица III

Относительные проницаемости калиевых каналов перехвата Ранвье для одновалентных катионов<sup>35</sup>

Ион	$P_{\text{ион}}/P_K$	Кристаллографический радиус иона, Å	Ион	$P_{\text{ион}}/P_K$	Кристаллографический радиус иона, Å
Калий	1,000	2,66	Гидроксиламин	0,025	3,30
Таллий	0,300	2,80	Метиламин	0,021	3,60
Рубидий	0,910	2,96	Формамидин	0,020	3,60
Аммоний	0,130	3,00	Литий	0,018	1,20
Цезий	0,077	3,38	Натрий	0,010	1,90
Гидразин	0,029	3,33			

На рис. 15 показана предложенная Хилле<sup>34</sup> модель натриевого канала, которая состоит из входных участков, где происходит постепенная дегидратация иона и замещение молекул воды на полярные группы, выстилающие внутренность канала. Основной барьер находится в селективном центре канала, который, по оценкам, имеет сечение  $3 \times 5 \text{ Å}^2$ . Размер сечения выбран из тех соображений, чтобы

геометрически исключить непроникающие катионы. Продольный размер (порядка нескольких Å) оценен очень грубо, исходя из максимально допустимого омического сопротивления канала как проводника с удельными характеристиками окружающих растворов. Натриевый канал обладает очень высокой проводимостью. В открытом состоянии поток через него составляет  $\sim 10^7$  ионов/сек. Это и заставляет максимально сужить основную барьерную область, чтобы получить высокую проницаемость наряду с высокой селективностью.

Большая проницаемость натриевого канала ставит вопрос о том, не является ли лимитирующим процесс диффузии ионов в примембранном пространстве. Оценки показывают, что предельный диффузионный ток примерно на порядок выше тока через канал, т. е. основным является внутримембранный транспорт. Это тем более верно в случае калиевых каналов, пропускная способность которых составляет  $\sim 10^6$  ионов/сек.

Обращаясь к проблеме селективности, отметим, что существующая теория является термодинамической и основана на расчете равновесного коэффициента распределения ионов между водным раствором и определенным состоянием в мембране. Вычисление разности энергий сольватации, если проводить его просто по формуле Борна (7), приводит к монотонно

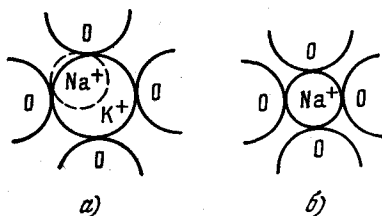


Рис. 16. Модель калиевого канала. Расположение ионов калия и натрия в селективном центре калиевого канала (а). Ион натрия в водном растворе находится в более тесном контакте с атомами кислорода (б) <sup>4</sup>.

возрастающему по радиусу иона ряду селективности, тогда как реальные каналы характеризуются более сложной зависимостью. Поэтому Эйзенман <sup>36</sup> ввел в рассмотрение еще и взаимодействие иона с фиксированным зарядом, локализованным в мембране. Физически очевидно, что ионы малого радиуса теперь находятся в преимущественном положении, так как их кулоновское взаимодействие с фиксированным зарядом противоположного знака будет увеличивать сродство в канале.

Ряд селективности, наблюдаемый в натриевом канале, заставляет предположить, что в окрестности селективного центра находится анионная группа.

На рис. 16 представлена гипотетическая модель калиевого канала. Дискриминация ионов большего размера объясняется стерическими факторами. Спрашивается, однако, почему так низка проницаемость калиевого канала по натрию, который имеет меньший кристаллографический радиус? Если полость канала является жесткой, состояние иона натрия, показанное на рис. 16, а, энергетически не выгодно по сравнению с его положением в водном растворе (рис. 16, б), где он полностью гидратирован. Более выгодным является случай калия, так как полярные группы канала образуют вокруг него плотную сольватную оболочку. Чисто термодинамический подход к проблеме селективности не представляется удовлетворительным. Процесс перепоса ионов является кинетическим явлением, т. е., как будет показано в дальнейшем изложении, селективность зависит также от кинетических параметров.

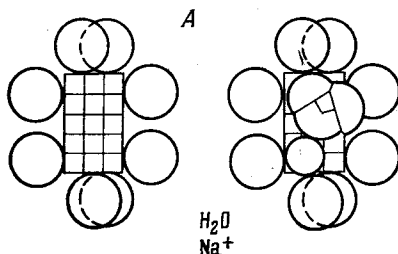


Рис. 15. Модель натриевого канала. Показаны кислородные атомы, выстилающие канал, а также частично гидратированный ион натрия <sup>34</sup>.

## б) Однорядный транспорт

Ионные каналы допускают лишь однорядное движение ионов. Следовательно, обычное электродиффузионное описание (13), основанное на представлении о диффузии точечных не взаимодействующих частиц, теряет силу. Об этом свидетельствует и анализ экспериментальных данных, касающихся односторонних ионных потоков. Из (20) нетрудно получить выражение для односторонних потоков ионов, полагая  $c_k(\delta)$  и  $c_k(0)$  попеременно равными нулю:

$$\vec{j}_k = \frac{z_k u_k \psi c_k(0)}{\beta \delta (1 - e^{-z_k \psi})}, \quad \overleftarrow{j}_k = \frac{z_k u_k \psi e^{-z_k \psi} c_k(\delta)}{\beta \delta (1 - e^{-z_k \psi})}. \quad (22)$$

Из (22) следует, что в приближении постоянного поля односторонние потоки независимы и их отношение определяется формулой Уссинга:

$$\frac{\vec{j}_k}{\overleftarrow{j}_k} = \frac{c_k(0)}{c_k(\delta)} e^{z_k \psi} = e^{z_k(\psi - \psi_k)}. \quad (23)$$

Экспериментальные результаты говорят о том, что в натриевом канале входящий и выходящий потоки независимы, когда через канал движутся ионы натрия<sup>37</sup>. Если же во внешнем растворе натрий замещен на другие катионы, то натриевый канал перестает подчиняться принципу независимости. Перенос ионов калия через калиевые каналы не подчиняется

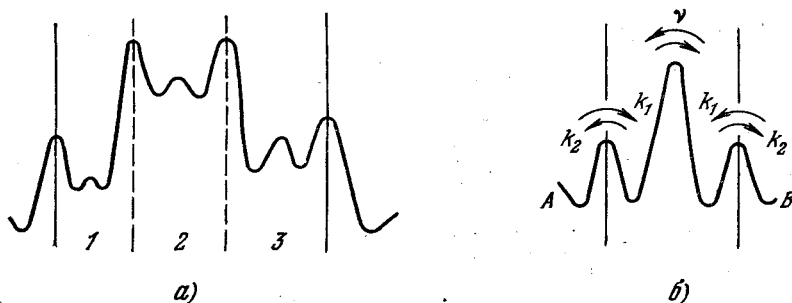


Рис. 17. Схематическое изображение энергетического профиля иона в канале.  
а) Общий случай, б) трехбарьерная модель.

принципу независимости<sup>38</sup>. Так, например, при увеличении внешней концентрации калия в 10 раз входящий ток увеличивается в 30 раз, а выходящий уменьшается в 3—4 раза. Отношение входящего и выходящего потоков калия не удовлетворяет формуле Уссинга (23) и описывается эмпирической зависимостью

$$\frac{\vec{j}}{\overleftarrow{j}} = e^{n(\psi - \psi_k)}, \quad (24)$$

где  $n \approx 2,5$ .

Согласно модели ионного канала, представленной на рис. 15, профиль потенциальной энергии иона в мембране можно изобразить в виде кривой, изображенной на рис. 17, а. Области 1 и 3 отвечают входным участкам канала, а область 2 — селективному центру. Пока на конкретизированы количество потенциальных ям, их глубина и высота барьеров, такое представление является достаточно общим. Если в полном наборе барьеров имеется несколько основных, наиболее высоких, то перенос удобно рассматривать в дискретном формализме. В противном случае, когда число



барьеров велико, а высоты их близки по величине, можно использовать непрерывное описание. Достаточно содержательным оказывается вариант, когда в потенциальном профиле имеется всего три высоких барьера (рис. 17, б). Пусть слева от мембраны находится раствор, содержащий ионы А, а справа — раствор, содержащий ионы В. Константы скоростей всех переходов через барьеры указаны на рис. 17. Состояния канала характеризуются бинарными функциями  $F(X_1, X_2)$ , ( $X = A, B, O$ ), через которые выражаются все потоки. Функции  $F(X_1, X_2)$  удовлетворяют системе дифференциальных уравнений, которую удобно решать методом направленных парциальных диаграмм<sup>39</sup>. Базовая диаграмма для трех-барьерной задачи представлена на рис. 18. Точками изображены различные состояния канала, а линиями — переходы. На связях, по которым переход возможен в обе стороны, стрелки не проставлены. Каждой линии ставится в соответствие определенное аналитическое выражение. Например, линии  $OO \rightarrow AO$  отвечает  $k_1^A A e^{\beta\psi_1/2}$ , где  $A$  — концентрация ионов в растворе,  $\psi_1$  — скачок потенциала на первом барьере. Вероятность любого состояния системы  $i$  равна

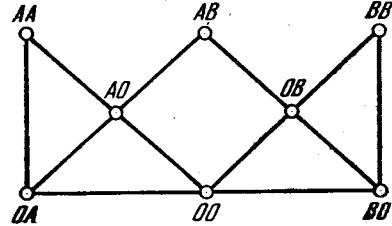


Рис. 18. Базовая диаграмма трех-барьерной модели.

$$F^{(i)} = \frac{\sum \text{парциальные диаграммы, направленные к состоянию } i}{\sum_j \sum \text{парциальные диаграммы, направленные к состоянию } j}. \quad (25)$$

Парциальные диаграммы получаются из базовой разрывом минимального количества связей так, чтобы полученная диаграмма не содержала циклов. Направленные парциальные диаграммы строятся из парциальных ориентированием всех линий в сторону нужного узла. Односторонние потоки ионов вычисляются особенно просто в случае высокого среднего барьера:

$$j_A = nG\gamma_A A v_A e^{\psi_2/2}, \quad j_B = nG\gamma_B B v_B e^{-\psi_2/2};$$

$$G^{-1} = (1 + \gamma_A A)(1 + \gamma_B B), \quad \gamma_A = \frac{k_1^A}{k_2^A} e^{\psi_1}, \quad \gamma_B = \frac{k_1^B}{k_2^B} e^{-\psi_3}. \quad (26)$$

Комбинация множителей  $\gamma_A A$  определяет вероятность заполнения входной ямы при условии, что она вакантна; множитель  $G$  характеризует вероятность того, что канал пуст, а произведение  $v e^{\psi_2/2}$  есть константа скорости перехода через центральный барьер.

Отношение односторонних потоков (26) описывается формулой Уссинга

$$\frac{j_A}{j_B} = e^{\psi - \psi_0}, \quad \psi_0 = \ln \frac{v_B \gamma_B^0 B}{v_A \gamma_A^0 A}, \quad (27)$$

где  $\gamma_i^0 = k_1^i/k_2^i$ . Односторонние потоки, как это следует из (26), нелинейно зависят от концентраций по обе стороны мембраны, т. е. принцип независимости не имеет места. Только в том случае, когда  $\gamma_A A \ll 1$ ,  $\gamma_B B \ll 1$ , т. е. мала концентрация в растворе или сродство данных ионов к входным участкам каналов, имеем  $G \approx 1$ , односторонние потоки оказываются независимыми и, как в электродиффузионной теории, определяются только произведением параметров  $v_i \gamma_i$ . При повышении концентраций или сродства проявляются эффекты автоблокировки. Из (26) следует, что проницаемость в общем случае становится функцией концентраций. Отсюда вытекает также, что селективность, выраженная как отношение

односторонних потоков определяется не только термодинамической величиной — средством, но и кинетической характеристикой  $v_i$ .

Фактически приведенные формулы описывают и более общий вариант энергетического профиля, в котором входным участкам соответствует ряд мелких потенциальных ям, находящихся в равновесии с окружающими растворами. Анализ экспериментальных данных по транспорту различных катионов через натриевый канал позволяет заключить, что этот тип

энергетического профиля с одним высоким барьером отражает определенные качественные черты, характерные для натриевого канала. Не останавливаясь на деталях обработки эксперимента, приведем табл. IV найденных коэффициентов  $v_i$  и  $\gamma_i$  для ряда катионов. Из нее следует, что замещающие ионы лучше связываются с входным участком канала, чем ионы натрия, но их константа скорости прохождения через селективный центр  $v$  много меньше, чем соответствующая константа для иона натрия. При замене ионов натрия на другие катионы в эквивалентной

Таблица IV  
Коэффициенты  $v_i$  и  $\gamma_i$  для ряда катионов

Ион	$\gamma_i$ , М <sup>-1</sup>	$v_i/v_{Na}$
Натрий	2,6	1
Таллий	21,7	0,042
Гидроксигуанидин	18,0	0,037
Аминогуанидин	9,3	0,038
Метилгуанидин	16,3	0,039

концентрации растет член  $\gamma_B B$  в блокировочном множителе  $G$ , так как коэффициент распределения  $\gamma$  у натрия минимален. Следовательно, при переходе к другим катионам можно ждать отклонений от принципа независимости, что и наблюдается на опыте. К этому следует добавить, что расчет вольт-амперной характеристики однорядного транспорта позволяет получить линейную зависимость ток — потенциал в достаточно широкой области, в соответствии с экспериментальными данными.

Остановимся кратко на учете кулоновских эффектов в однорядном транспорте. Потенциальная энергия иона в канале складывается из его взаимодействия с самой транспортной системой и с другими проникающими частицами, находящимися в канале. В результате суммарный энергетический профиль зависит от характера заполнения канала. При расчете потоков теперь необходимо перенормировать некоторые из констант скоростей с учетом кулоновского ион-ионного взаимодействия, тогда как вычислительная схема остается прежней. В результате для односторонних потоков имеем

$$j_A = n\tilde{G}\gamma_A A v_A e^{\psi/2}, \quad j_B = n\tilde{G}\gamma_B B v_B e^{-\psi/2}, \quad \tilde{G}^{-1} = 1 + \gamma_A A + \gamma_B B. \quad (28)$$

Формула Уссинга сохраняет силу. Различие формул (26) и (28) сводится к слагаемому  $\gamma_A A \gamma_B B$  из (26), которое отсутствует в (28), что связано с исчезновением состояния (AB) из-за кулоновского отталкивания. Соответственно односторонние потоки оказываются повышенными, а эффекты блокирования уменьшенными.

#### в) Натриевый канал с модифицированным энергетическим профилем <sup>40</sup>

Энергетический профиль с высоким центральным барьером не противоречит измеряемым электрическим характеристикам натриевого канала. Однако он не согласуется с данными о том, что в области селективного центра имеется фиксированная анионная группа. При ее протонировании

проницаемость канала для катионов резко уменьшается. Поэтому естественно думать, что в протонированном состоянии селективная область эквивалентна высокому барьеру, который для катионов понижается и расщепляется при депротонировании. Таким образом, перенос через канал является уже четырехбарьерным (рис. 19), и состояние канала должно описываться трехмерным вектором  $(X_1, X_2, X_3)$ ,  $X_i = A, B, O$ . Базовая диаграмма теперь имеет вид рис. 20, а, причем сплошными линиями обозначены переходы между растворами и входными участками, а пунктирными — между входными участками и селективным центром. Вычисление вероятности любого состояния значительно упрощается, если воспользоваться теорией возмущений, считая переходы  $k_3, k_4$  медленными (штриховые линии) по сравнению с переходами  $k_1, k_2$  (сплошные линии). Однако физическая картина процесса переноса оказывается

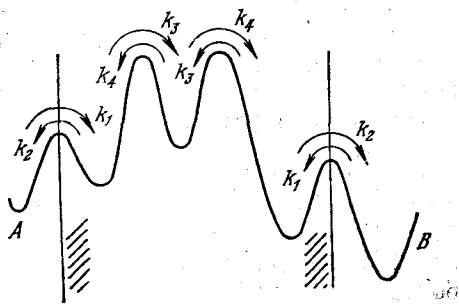


Рис. 19. Энергетический профиль иона в четырехбарьерном канале.

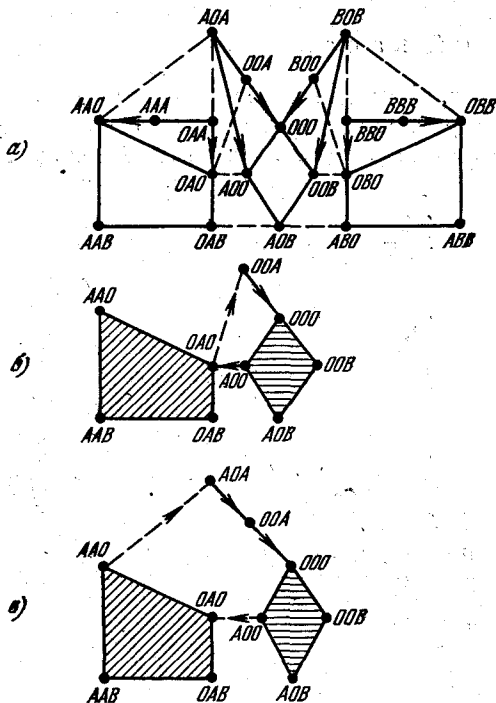


Рис. 20. Базовая диаграмма четырехбарьерной модели (а) и потоковые циклы, отвечающие одночастичному (б) и двухчастичному (в) переносу.

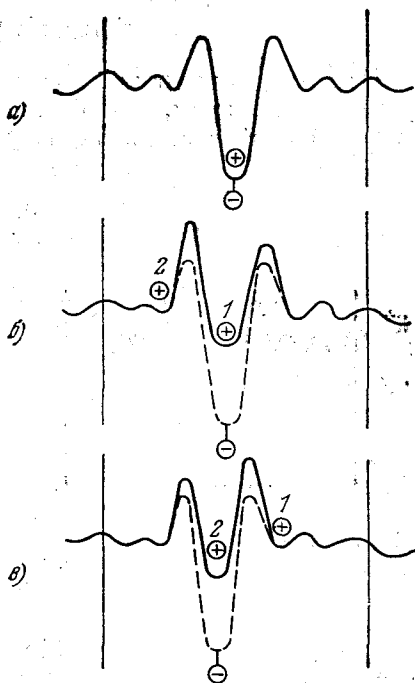


Рис. 21. Двухчастичный перенос ионов через канал.

Глубокая потенциальная яма (а) соответствует одночастичному состоянию в канале. Кулоновское отталкивание в двухчастичном состоянии делает яму менее глубокой (б) и облегчает переход иона 1 в следующую яму (в).

более наглядной, если воспользоваться методом потоковых диаграмм. Рассматривая всевозможные потоковые циклы, можно получить информацию о различных «механизмах» переноса иона через мембрану. Под «меха-

низмом» переноса следует понимать последовательность состояний, через которые проходит канал в этом процессе. На рис. 20, б, в для иллюстрации изображены два примера потоковых циклов, первый из которых отвечает одночастичному переносу (б), а второй — двухчастичному (в). Кулоновские эффекты приводят к тому, что в определенном интервале параметров исходного энергетического профиля двухчастичный перенос становится основным транспортным процессом. Физически пояснить это можно следующим образом. Фиксированный анионный центр, притягивая катионы, облегчает им вход в канал. Однако одновременно с этим он затрудняет им выход из канала. Очевидно, что выход из центральной ямы был бы облегчен, если бы в левой яме появился второй катион (рис. 21), так как взаимодействие иона 1 с фиксированным зарядом теперь ослаблено отталкиванием от иона 2. Иными словами, яма стала менее глубокой и возникла возможность перехода иона 1 в правую яму. Соответственно, ион 2 может заполнить центральную яму, как бы «выбив» оттуда ион 1. Количественный анализ этой задачи, проведенный изложенным выше методом потоковых диаграмм, показывает, что такой «бильярдный» механизм не нарушает справедливости формулы Уссинга и приводит к качественно тем же результатам, что и однорядный перенос в канале с одним высоким барьером.

### г) Калиевый канал

Во всех упомянутых выше случаях, несмотря на отклонения от принципа независимости, сохраняла силу формула Уссинга. Однако для калиевого канала эта формула уже не справедлива. Поэтому необходимо

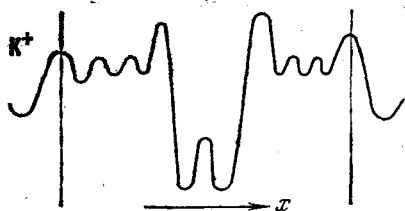


Рис. 22. Энергетический профиль иона в калиевом канале.

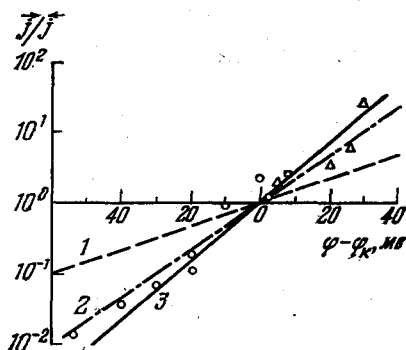


Рис. 23. Зависимость отношения одно-сторонних потоков от скачка потенциала на мембране.

1 — формула Уссинга, 2 — формула (29), 3 — эксперимент <sup>38</sup>.

расширить класс профилей потенциальной энергии иона в канале, с тем чтобы найти условия, при которых возникают отклонения.

Собственно уже механическая модель Хаксли, а также работы Хекмана <sup>41</sup> показали, на каком пути следует искать решение этого вопроса. Необходимая модификация энергетического профиля должна состоять во введении в селективный центр не одной, а как минимум двух сильно коррелированных глубоких потенциальных ям (рис. 22). Выражение для отношения односторонних потоков в этом случае имеет вид

$$\frac{j_A}{j_B} = e^{2(\psi - \psi_0)}. \quad (29)$$

Появление второй степени в экспоненте говорит как бы об удвоении порядка реакции переноса иона через канал. Это происходит из-за того, что канал находится в заполненном двухчастичном состоянии, и поэтому выход частицы в раствор сопровождается последовательным сдвигом ионов по всему каналу. Формула (29), как видно из рис. 23, удовлетворительно согласуется с экспериментом. Удастся также количественно объяснить наблюдающиеся отклонения односторонних потоков от принципа независимости. Это говорит о том, что энергетический профиль на рис. 22 правильно отражает основные качественные особенности профиля энергии в калиевом канале.

#### д) Непрерывное описание

Если пренебречь корреляциями, то перенос между  $m$  и  $m + 1$  ямами в неоднородной цепочке можно записать в виде

$$j_{m, m+1} = n v_{m, m+1} \theta_m (1 - \theta_{m+1}) e^{\psi_{m, m+1}/2} - n v_{m+1, m} (1 - \theta_m) \theta_{m+1} e^{-\psi_{m, m+1}/2}, \quad (30)$$

где  $\theta_m$  — число заполнения ямы  $m$ . Поскольку при большом числе ям  $\psi_{m, m+1}$  мало, то, полагая, что  $\theta_m$  меняется гладко, можно перейти к непрерывному описанию:

$$j(x) = -n v(x) \delta \frac{d\theta}{dx} - n \delta v(x) \theta (1 - \theta) \frac{d(\psi + \mu_0)}{dx}, \quad (31)$$

где  $\delta$  — расстояние между соседними барьерами,  $\mu_0(x)$  — безразмерный стандартный химический потенциал иона. Соотношение (31) является простым обобщением уравнения Нернста — Планка, учитывающим ограниченное число вакантных для диффузии мест, а также неоднородность мембраны.

### 5. ЗАВИСИМОСТЬ ПРОВОДИМОСТИ КАНАЛА ОТ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

#### а) Интерпретация уравнений Ходжкина — Хаксли

Уравнения Х — Х описывают динамику некоторых макроскопических величин — проводимостей участков мембраны, содержащей большое количество отдельных ионных каналов. Поэтому одна и та же зависимость может быть получена как результат статистического усреднения проводимости каналов, испытывающих скачкообразные изменения, либо просто как умноженная на плотность каналов непрерывно изменяющаяся проводимость отдельного канала. Рассмотрим первую возможность на примере калиевой проводимости. Как следует из уравнений (5), эта величина пропорциональна  $n^4$ , причем  $n$  изменяется от 0 до 1. Естественно рассматривать  $n$  как вероятность того, что некоторая частица, принадлежащая каналу, находится в определенном положении, способствующем возникновению проводящего состояния. Степень 4 тогда будет означать, что таких частиц имеется 4 и все они независимы, причем канал находится в проводящем состоянии лишь в том случае, если все 4 частицы одновременно оказываются в «активном» положении. Как следует из вида кинетического уравнения для  $n$ , кроме активного, имеется лишь одно состояние для  $n$ -частицы, и его вероятность равна  $1 - n$ . Таким образом, простейшая

интерпретация модели X — X дает для калиевого канала следующую картину. Пусть для определенности все  $n$ -частицы несут некоторый положительный заряд. Тогда в состоянии покоя все четыре  $n$ -частицы находятся у внутренней стороны мембраны, и канал закрыт. Если увеличивать мембранный потенциал, то энергия  $n$ -частиц у внутренней стороны повышается, а у внешней — понижается. Поэтому вероятность нахождения частицы у внешней стороны мембраны растет, и соответственно повышается проводимость мембраны. Наконец, при больших потенциалах  $n$ -частицы почти все время проводят у внешней стороны мембраны, и проводимость достигает наибольшего возможного значения. Аналогичным образом можно интерпретировать и проводимость для натриевого канала, с тем отличием, что здесь придется ввести два типа частиц —  $m$  и  $h$ , причем на один канал приходится три  $m$ -частицы и одна  $h$ -частица, не взаимодействующие между собой. Кинетическое уравнение для  $m$ -частиц линейно, что соответствует представлению об одnobарьерном переходе, или наличию всего двух состояний  $m$ -частицы. Константа равновесия между этими состояниями зависит от потенциала следующим образом:

$$\frac{\beta_m}{\alpha_m} \approx e^{-35\psi/9}.$$

Обычно предполагается, что разность потенциалов между начальным и конечным состояниями  $m$ -частицы совпадает с мембранным потенциалом  $\psi$ . Тогда заряд  $m$ -частицы, определенный в окрестности потенциала покоя, оказывается равным  $\approx 4$ . Однако трудно примириться с идеей о перескоке нескольких частиц в процессе активации на расстояние порядка 100 Å, если исходить из того, что канал представляет собой достаточно жесткую макромолекулярную систему. Можно предположить, что  $m$ -частицы испытывают небольшие смещения, но тогда заряд их придется считать неразумно большим. Обойти эту трудность можно, лишь отказавшись от независимости субъединиц канала. Эта идея, безусловно, родственна более ранним попыткам учесть кооперативный характер взаимодействия между каналами <sup>42</sup>.

#### б) Т о к и в о р о т

Структурная перестройка канала, происходящая при изменении внешнего электрического поля, должна проявляться в наличии дополнительной компоненты тока смещения, получившей образное название «ток ворот». Осуществить такое измерение удалось лишь в последние годы <sup>31, 43</sup>. Проблема состояла в том, чтобы выделить весьма малый полезный сигнал. Поэтому обычно измерения проводились на нервных волокнах, в которых внутренняя среда замещалась безкалиевым раствором, а из внешнего раствора убирались ионы натрия. Кроме того, добавлялись специфические яды — ТЭА и ТТХ, подавляющие проводимость калиевого и натриевого каналов. Но и при этих условиях флуктуации были довольно велики по сравнению с полезным сигналом, так что часто приходилось прибегать к использованию накопителя, производившего автоматическое усреднение записей. Типичный опыт состоял в следующем. К предварительно гиперполяризованному волокну до  $-90$  или  $-100$  мВ прикладывался положительный импульс напряжения прямоугольной формы. При этом в начале и в конце импульса регистрировались переходные токи, направленные наружу и внутрь волокна, как показано на рис. 24, а. Для учета тока заряжения емкости аналогичные измерения проводились для отрицательного импульса напряжения (рис. 24, б), после чего результаты первого и второго эксперимента складывались алгебраически. В результате была выделена асимметричная компонента тока смещения, которая имела тот

же знак, что и ток в ответ на положительный импульс напряжения, хотя по амплитуде была значительно меньше (рис. 24, е).

Характерной особенностью получаемых асимметричных токов является их экспоненциальная зависимость от времени. Анализ характерного времени релаксации асимметричного тока в зависимости от потенциала во время положительного импульса напряжения показал, что это время очень близко соответствует времени релаксации переменной  $m$  модели Ходжкина — Хаксли. Такое совпадение позволило предположить, что наблюдаемый асимметричный ток связан с частицами, открывающими и закрывающими натриевый канал. В дальнейшем были найдены дополнительные факты, свидетельствующие в пользу прямой связи асимметричных токов смещения и воротных частиц.

Интегрируя воротный ток по времени, можно получить величину эквивалентного заряда, переносимого с одной стороны мембраны на другую. На рис. 25 показана зависимость перемещенного заряда от мембранного потенциала. Сплошная кривая получена полуэмпирическим путем <sup>43</sup> в предположении, что воротные частицы имеют по одному устойчивому состоянию вблизи каждой стороны мембраны и имеют заряд  $1,3 e$ . Эта кривая описывается формулой

$$\frac{Q(\psi)}{Q_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{-z\psi}} \quad (z = 1, 3), \quad (32)$$

где  $Q_{\max}$  — максимальный смещенный заряд, равный приблизительно  $2400 \text{ e/мкм}^2$ .

Воротные токи можно рассматривать как следствие перескока  $m$ -частиц в процессе активации мембраны. С физической точки зрения представление о перескоке нескольких заряженных групп через всю толщину мембраны, как уже отмечалось, выглядит мало убедительным. Поэтому следует рассмотреть другие возможности интерпретации воротных токов. Остановимся на одной из них, которая связывает воротный ток с изменением проекции суммарного дипольного момента системы <sup>44</sup>. Если липопротеиновый комплекс является достаточно жестким, то процесс перероентации элементарных диполей, соответствующих отдельным связям, будет кооперативным. Это весьма существенно для объяснения крутой зависимости смещенного заряда от мембранного потенциала, наблюдаю-

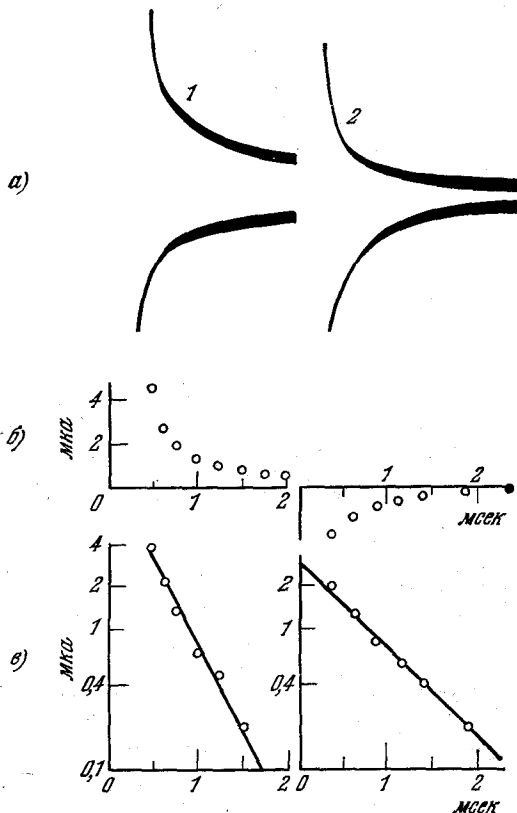


Рис. 24. Выделение асимметричной компоненты токов смещения (токов ворот) при фиксации на мембране ступенчатого потенциала  $\pm 120 \text{ мВ}$ .

Аксон перфузирован раствором  $55 \text{ ммоль CsF}$  и помещен в свободный от  $K$  и  $Na$  раствор салина, содержащий  $110 \text{ ммоль Са}$  и  $300 \text{ нмоль}$  тетродотоксина. Предварительно на аксоне фиксировался потенциал  $-70 \text{ мВ}$ . а) Запись токов смещения; б) их разность, определяющая асимметричную компоненту токов; в) логарифм этой компоненты после внесения поправки на токи утечки. Кривые 1 соответствуют включению ступенчатого потенциала, кривые 2 — выключению <sup>43</sup>.

щейся на опыте (см. рис. 25). Если считать, что каждый элементарный диполь имеет только две возможные ориентации, то долю изменивших ориентацию диполей  $\theta$  можно описать соотношением

$$\frac{\theta}{1-\theta} e^{-w\theta} = k e^{\psi}, \quad (33)$$

где  $w$  — параметр кооперативности,  $\varepsilon = d/\varepsilon\delta$ ,  $d$  — изменение проекции дипольного момента,  $\delta$  — толщина мембраны,  $e$  — элементарный заряд,  $k$  — константа. На рис. 25 показана зависимость  $\theta(\psi)$ , вычисленная при  $w = 3,5$  и  $\varepsilon = 0,2$ . Расхождение расчетной кривой с экспериментом при малых и больших  $\theta$  можно устранить, считая  $w$  функцией  $\theta$ , определенной из условий совпадения (32) и (33).

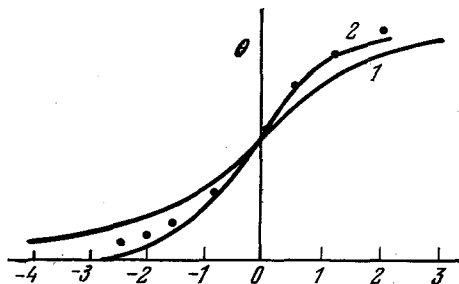


Рис. 25. Доля перенесенного заряда как функция потенциала.

Кривая 1 построена по формуле (33) с линейной аппроксимацией  $w$  (6). Кривая 2 — по формуле (32), точки — эксперимент из [4].

Изменения ионной проницаемости системы, то «открытие» или «закрывание» канала может иметь буквальный смысл, т. е. сводится к перестройке молекулярной геометрии канала. Возможен и другой случай, когда дипольная переориентация, не изменяя геометрии канала, влияет на электростатическую компоненту энергии ионов в канале и тем самым как на их концентрацию в мембране, так и на эффективную подвижность. Простые оценки показывают, что электростатический механизм регуляции в принципе может обеспечить наблюдаемую зависимость проводимости от потенциала.

Окончательный выбор между этими двумя возможностями можно будет сделать после того как будет выяснено, дискретно или непрерывно изменяется проводимость отдельного канала. Физически очевидно, что закон «все или ничего» будет говорить в пользу конформационной гипотезы, тогда как непрерывное изменение проводимости должно свидетельствовать скорее о действии электростатического принципа регуляции. В модели Ходжкина — Хаксли постулировалось, что ионный канал, например, калиевый, может находиться в одном из пяти конформационных состояний, причем проводящим является лишь одно из них. Эта схема канала не является, конечно, единственно возможной, если исходить из условий совпадения с данными экспериментов по фиксации потенциала. Можно, например, предположить, что все конформационные состояния являются проводящими, причем функция распределения по проводимости будет находиться из условий наилучшего совпадения с экспериментом. Другая возможность состоит во введении единственного конформационного состояния, проводимость которого описывается нелинейным уравнением

$$\frac{1}{4} \dot{g} = \alpha(\psi) (g_0^{1/4} g^{3/4} - g) - \beta g. \quad (34)$$

Различить эти схемы можно с помощью изучения спектра электрических флуктуаций.



# в) Электрические флуктуации

Спектральные характеристики мембран в порядке возрастания их интенсивности расположены следующим образом: тепловой шум < лоренцевский или дробовой шум, связанный с «открыванием» и «закрыванием» ворот, < шум типа  $1/f$  (фликер-шум). Спектр типа  $1/f$  наблюдался в самых разнообразных системах <sup>45</sup> — на микроэлектродах, на отверстиях небольшого диаметра, разделяющих два раствора электролита, на пористых мембранах, а также на искусственных фосфолипидных и биологических мембранах. Во всех случаях необходимым условием зависимости  $1/f$  было либо пропускание через систему электрического тока, либо наличие разности концентраций проникающего иона по обе стороны мембраны. Точной теории, объясняющей спектральную плотность флуктуаций типа  $1/f$ , пока не существует. Из различных попыток теоретического объяснения такого рода зависимости следует отметить два наиболее распространенные. Одна из таких попыток сводится к привлечению уравнения диффузии для описания автокорреляционной функции. Такое уравнение дает асимптотическую зависимость, описываемую обратным квадратным корнем из времени, и соответствующее преобразование Фурье дает спектр типа  $1/f$ . Существенно, что зависимость  $1/f$  получается лишь в определенном интервале частот. Второй способ объяснения зависимости  $1/f$  использует идею неоднородности. Иначе говоря, предполагается наличие многих независимых источников шума, каждый из которых имеет лоренцевский спектр. Подбирая определенную плотность распределения этих источников по частотам, можно добиться близости суммарного спектра к зависимости  $1/f$ , естественно, в некотором интервале частот. Таким образом, хотя природа шума типа  $1/f$  достоверно не установлена, по-видимому, можно считать, что сама эта зависимость является приближенной и справедливой лишь в ограниченном интервале.

В опытах на биологических мембранах на фоне шума  $1/f$  долгое время не удавалось измерить дробовой шум, непосредственно связанный с действием ворот. Только в 1973 г. Фишман <sup>46</sup> получил разностные спектры флуктуаций потенциала нативной мембраны и мембраны с заблокированными ТЭА калиевыми каналами. Разностный спектр, очевидно, отвечает флуктуациям электрических характеристик калиевых каналов и имеет как раз лоренцевский характер (см. рис. 26):

$$G(f) = \frac{f(\varphi)}{f^2 + f_*^2(\varphi)}. \quad (35)$$

Из термодинамической теории флуктуаций известно, что лоренцевский спектр с одной характерной частотой получается для двухуровневых систем или, иными словами, для систем, описываемых одной термодинамической переменной. Если же ионный канал обладает набором конформационных состояний, как в модели Ходжкина — Хаксли, где их число предполагается равным пяти, то в спектре возникает несколько лоренцевских членов

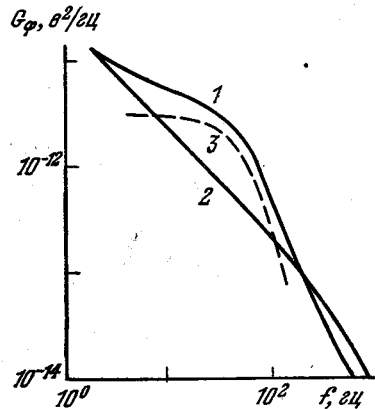


Рис. 26. Спектры флуктуаций мембранного потенциала в состоянии покоя <sup>46</sup>;

1 — нормальная кривая, 2 — спектр после добавления ТЭА, 3 — разность между кривыми 1 и 2, соответствующая калиевым каналам.

с кратными частотами <sup>47</sup>. В самом деле, если канал состоит из четырех субъединиц, каждая из которых находится в одном из двух состояний, то кинетическую схему такого канала можно изобразить следующим образом:

$$\boxed{0} \xrightleftharpoons[\beta]{4\alpha} \boxed{1} \xrightleftharpoons[2\beta]{3\alpha} \boxed{2} \xrightleftharpoons[3\beta]{2\alpha} \boxed{3} \xrightleftharpoons[4\beta]{\alpha} \boxed{4}. \quad (36)$$

Числа в квадратах соответствуют числу активных субъединиц, стрелки и выражения возле них показывают возможные переходы и соответствующие константы скоростей; последний квадрат соответствует проводящему состоянию. Спектр флуктуаций в такой модели вычисляется легко:

$$G_g(\omega) = 2 \operatorname{Re} \int_0^{\infty} e^{i\omega t} G_g(t) dt, \quad (37)$$

где  $G_g(t)$  — коррелятивная функция проводимости:

$$G_g(t) = \langle g(0) g(t) \rangle - \langle g(0) \rangle^2. \quad (38)$$

Пусть в проводящем состоянии калиевый канал имеет проводимость  $g_0$ , и пусть  $P(1, 0)$  — вероятность проводящего состояния в начальный момент времени, а  $P(1, 0; 1, t)$  — вероятность того, что канал открыт в моменты времени 0 и  $t$ . Тогда

$$\langle g(0) g(t) \rangle = g_0^2 P(1, 0; 1, t) = g_0^2 P(1, 0) P(1, t/1, 0), \quad (39)$$

где  $P(1, t/1, 0)$  — условная вероятность проводящего состояния канала в момент времени  $t$  при условии, что канал открыт в начальный момент времени.

Выражения для вероятностей  $P$  легко находятся из решения уравнения (4) с использованием (5). В результате получаем:

$$G_g(\omega) = 24g_0^2 n_{\infty}^4 (\alpha_n + \beta_n) \sum_{k=1}^4 \frac{n_{\infty}^{4-k} (1-n_{\infty})^k}{(k-1)! (4-k)!} \frac{1}{\omega^2 + k^2 (\alpha_n + \beta_n)^2}. \quad (40)$$

Эти формулы легко обобщаются на случай, когда имеется заданное распределение состояний канала по проводимости <sup>48</sup>. Таким образом, выяснение вида частотной зависимости спектра, а также зависимости характерной частоты от потенциала позволяют в принципе решить вопрос о числе переменных, необходимых для описания канала. Несмотря на быстрый прогресс в этой области, точность эксперимента не позволяет пока вынести окончательное суждение. По амплитуде флуктуаций и среднему значению флуктуирующей переменной уже удалось оценить среднее расстояние между каналами, которое оказалось порядка нескольких сотен Å для калиевых каналов в аксоне кальмара.

## 6. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИМПУЛЬСОВ ПО НЕРВНЫМ ВОЛОКНАМ

### а) Скорость и форма импульса

Важнейшим свойством нервного импульса является его способность распространяться вдоль волокна без затухания с постоянной скоростью. В одномерном случае распределение мембранного потенциала  $\varphi(x, t)$  определяется кабельным уравнением, представляющим собой дифференциальную форму закона Ома:

$$C \frac{\partial \varphi}{\partial t} = \frac{1}{R'} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} - J, \quad (41)$$

где  $C$  — емкость мембраны, приходящейся на единицу длины волокна,  $R$  — сумма продольных внутриклеточного и внеклеточного сопротивлений,  $J$  — ионный ток, протекающий через мембрану. Электрический ток  $J$  является функционалом от потенциала, который в свою очередь зависит от времени и координаты. Эта зависимость определяется уравнениями (3)–(5). Такой вид функционала  $J$  специфичен для биологической возбудимой среды. Однако уравнение (4), если отвлечься от формы  $J$ , имеет более общий характер и описывает многие физические явления, например, процесс горения. Поэтому передачу нервного возбуждения часто уподобляют горению порохового шнура. Если в бегущем пламени процесс поджигания осуществляется за счет теплопроводности, то в нервном импульсе возбуждение происходит при помощи так называемых локальных токов (рис. 27).

Эти представления появились еще в конце прошлого века. Затем последовали многочисленные попытки рассчитать передачу нервного импульса математически. Однако для этого надо было знать закономерности

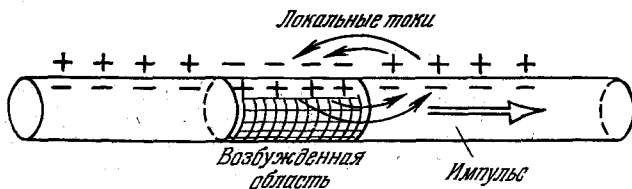


Рис. 27. Локальные токи, обеспечивающие распространение нервного импульса.

возбуждения. Не располагая фактическими данными о природе нервного возбуждения, многие исследователи ограничились построением теоретических моделей, свойства которых напоминали процесс возбуждения. Наиболее интересные из них можно найти в обзоре <sup>49</sup>.

По мере накопления экспериментальных данных становилось ясно, что сам эффект распространения мало чувствителен к деталям процесса возбуждения, и что ответ на вопросы, связанные с распространением, можно получить при помощи весьма простых моделей, отражающих лишь общие свойства возбуждения. Исследователей интересовал вопрос о вычислении скорости нервного импульса в однородном волокне, а также сложные режимы распространения возбуждения в активных средах, например, таких, как сердечная мышца. Известно, что в миокарде может возникать явление трепетания или фибрилляции, связанное со спонтанной электрической активностью среды. Задачей о фибрилляции занимались Винер и Розенблют <sup>50</sup>. Ими было введено понятие формальной возбудимой среды, в которой природа возбуждения была несущественной, и получены основополагающие результаты. Их идеи в дальнейшем были значительно развиты и усовершенствованы в работах Гельфанда, Фомина, Цетлина и др. <sup>51, 52</sup>.

Другая группа работ была так или иначе связана с вычислением скорости импульса. Сюда можно отнести известное исследование Колмогорова и др. <sup>53</sup> об уравнении диффузии с нелинейным источником. В этом круге работ уже нельзя было обойтись без каких-нибудь, хотя бы простейших, представлений о физике процесса. Они обычно сводились к тому, что по достижении некоторых критических условий либо начиналась разрядка мембранной емкости, либо происходило включение мембранного генератора с заданными свойствами <sup>54–57</sup>. Такое физическое моделирование позволяло получать аналитические результаты и выяснять физические закономерности. Еще одна группа работ связана с решением детальной системы уравнений Ходжкина — Хаксли на вычислительных машинах <sup>58</sup>.

Однако мы не будем детально анализировать эти численные методы решения, а также формализованные возбудимые среды, и сразу перейдем к обсуждению физических моделей и подходов, допускающих аналитическое решение.

Известно, что ионный ток, текущий через мембрану при прохождении нервного импульса, является знакопеременным. Поэтому аппроксимируем

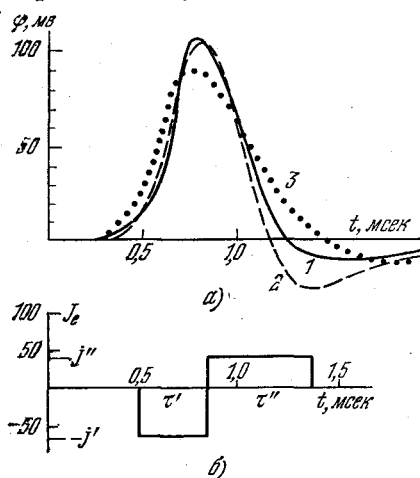


Рис. 28. Бегущий импульс.

а) Форма спайка (1 — аксон кальмара при 18,5 °С, 2 — рассматриваемая модель, 3 — теоретическая модель Ходжкина — Хаксли); б) аппроксимация ионного тока при возбуждении.

ределенной формы, причем один оказывается устойчивым, а другой — неустойчивым. Скорость устойчивого импульса равна

$$v_1 = \left( \frac{j'}{\varphi^* RC^2} - \frac{2}{r_m RC^2} \right) \left( \frac{j'}{\varphi^* RC^2} - \frac{1}{r_m RC^2} \right)^{-1/2}. \quad (42)$$

Если пренебречь проводимостью мембраны в состоянии покоя, то получим простую формулу

$$v_1 = \sqrt{\frac{j'}{\varphi^* RC^2}}, \quad (43)$$

которая впервые была выведена Компанейцем и Гуровичем<sup>55</sup>. В ответ вошли только параметры первой фазы тока возбуждения, т. е. скорость распространения определяется передним фронтом бегущего импульса. Представляет интерес зависимость скорости от диаметра нервного волокна. Эксперимент на гладких волокнах показывает, что скорость приблизительно пропорциональна квадратному корню из диаметра. Такой же результат дает и приведенная формула.

С помощью полученного решения можно рассчитать форму потенциала действия для конкретных объектов. При сопоставлении с экспериментом допустимо небольшое варьирование порога возбуждения и амплитуды первой фазы тока. На рис. 28 приведен нервный импульс в аксоне кальмара. Видно, что простая аналитическая модель дает очень хорошую аппроксимацию потенциала действия, которая не уступает полученной из точных уравнений Ходжкина — Хаксли. Подбор разумных значений параметров, стоящих в формуле (43), дает величины скоростей, весьма близкие к экспериментальным значениям<sup>59</sup>. Например, для гигантского волокна кальмара получается скорость около 21 м/сек.

Полученное решение несколько напоминает солитоны, интенсивно изучаемые в различных системах. Так же как и в случае солитонов, для нервного импульса имеется набор разрешенных скоростей, стабильная форма, не зависящая от условий формирования и т.п. Однако имеются и существенные отличия. Солитоны представляют собой возбуждения, возникающие в динамических системах, в то время как нервный импульс возникает и распространяется в активной среде и является существенно диссипативным процессом. Еще одной особенностью нервного импульса является «рефрактерный хвост», который устраняет возможность повторного возбуждения сразу после прохождения импульса. Из-за этого невозможно, например, прохождение импульсов друг сквозь друга. Тем не менее, было бы интересно попытаться приложить методы теории солитонов и к этой области.

#### б) Распространение импульсов по неоднородным волокнам

Нервные волокна, по которым распространяются импульсы, не являются однородными. Там, где происходит ветвление или изменяется сечение волокон, прохождение импульсов может быть затруднено, а иногда и просто невозможно. Эта проблема была исследована разными авторами с помощью различных методов. Применялись как аналитические методы<sup>60</sup>, так и расчеты с помощью вычислительных машин<sup>58, 61</sup>.

Рассмотрим прохождение импульса по расширяющемуся волокну (рис. 29). Анализ показывает, что по мере приближения к расширению скорость импульса уменьшается, а после расширения начинает расти, пока не выйдет на новое стационарное значение, которое превышает первоначальное. Таким образом, переход на более высокую скорость происходит не монотонно, а через замедление. Это замедление тем больше, чем больше разница в сечениях. При достаточно большом расширении импульс может остановиться совсем. Представляет интерес вычисление критического расширения волокна, которое не пропускает импульс. Расчет, сделанный в простой аналитической модели, показывает, что условие блокирования имеет вид

$$\left(\frac{r_2}{r_1}\right)^{3/2} > \kappa + 1,11 \sqrt{\kappa - 1,69} = K(\kappa), \quad (44)$$

где  $r_1$  и  $r_2$  — радиусы двух частей волокна,  $\kappa$  — фактор безопасности, т. е. отношение амплитуды потенциала действия к порогу. Оценки с параметрами, принятыми для гигантского аксона кальмара, показывают, что критическим является расширение, несколько больше четырехкратного. Вычисления в модели Ходжкина — Хаксли дают величину порядка пяти.

При обратном движении импульса блокирования не происходит. Импульс всегда может перейти из широкого волокна в узкое. Но изменение скорости при прохождении неоднородности носит противоположный характер. При подходе к сужению скорость импульса увеличивается,

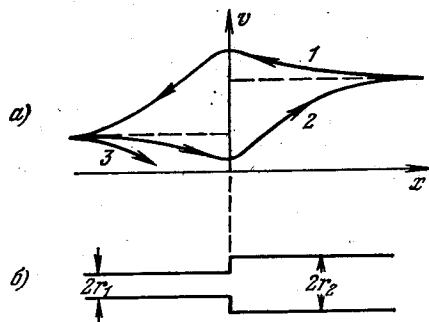


Рис. 29. Прохождение импульсов по расширяющемуся волокну.

а) Изменение скорости импульса в зависимости от его направления (1, 2 — импульсы проходят, 3 — импульс блокируется); б) схематическое изображение расширяющегося волокна.

а затем начинает спадать до нового стационарного значения (см. рис. 29). Таким образом на графике скорости мы получаем своеобразную петлю гистерезиса. Происхождение «гистерезиса» физически вполне понятно. Расположенное впереди широкое волокно с большой емкостью представляет собой мощный сток для заряда, поэтому потенциал медленнее поднимается до порога. Если же впереди находится сужение, то оно, будучи не в состоянии поглотить большой заряд, представляет собой отражающий экран, вблизи которого потенциал поднимается скорее, и следовательно, скорость импульса увеличивается.

Другой неоднородностью является ветвление волокон. Здесь возможны различные варианты прохождения и блокирования импульса.

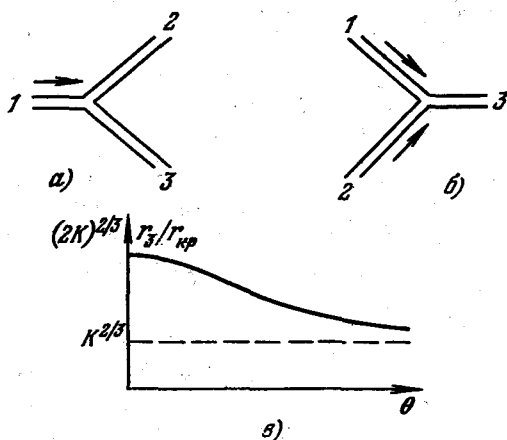


Рис. 30. Прохождение импульсов через узел ветвления.

а) Импульс подходит по одному волокну; б) импульсы подходят сразу по двум волокнам; в) зависимость критического радиуса третьего волокна от временного сдвига между импульсами.

кий вид, то мы ограничимся графической иллюстрацией. Если импульсы подходят к узлу по волокнам 1 и 2, имеющим одинаковый радиус  $r$ , то критический радиус третьего волокна, осуществляющий блокирование, зависит от временного сдвига так, как показано на рис. 30.

При одновременном подходе импульсов к узлу ветвления возникает эффект синхронизации, выражающийся в уменьшении временного сдвига между импульсами по мере их приближения к узлу. Если временной сдвиг между импульсами мал, то импульсы помогают друг другу проникнуть в широкое третье волокно. Однако, если сдвиг достаточно велик, то импульсы начинают мешать друг другу. Связано это с тем, что импульс, подошедший первым, но не сумевший возбудить третье волокно, частично переводит узел в рефрактерное состояние<sup>52</sup>.

### в) Взаимодействие импульсов

До сих пор мы рассматривали передачу нервного импульса по одиночному волокну более или менее сложной формы. Однако в организме нервные волокна обычно объединены в пучки или нервные стволы. Это хорошо видно на их срезах, которые выглядят так же, как срезы многожильного кабеля. Каждое волокно в таком пучке представляет собой самостоятельную линию связи, но все они имеют «один общий провод» — межклеточную жидкость. Следовательно, когда по одному из волокон бежит нервный

Если импульс подходит к узлу ветвления по одному волокну (рис. 30), то условие блокирования имеет вид

$$\frac{\sqrt{r_3^3} + \sqrt{r_1^3}}{\sqrt{r_1^3}} > K(\kappa).$$

Более интересен подход к узлу ветвления импульсов сразу по двум волокнам. Если импульсы движутся синхронно, то условие блокирования имеет вид

$$\frac{\sqrt{r_3^3}}{\sqrt{r_1^3} + \sqrt{r_1^3}} > K(\kappa).$$

Однако гораздо сложнее вопрос о разновременном подходе импульсов к узлу ветвления. Условие блокирования зависит от временного сдвига. Поскольку оно имеет довольно громоздкий

импульс; он создает электрическое поле в межклеточной жидкости, которое может повлиять на мембранный потенциал соседних волокон. Конечно, в нормальных условиях разные линии связи должны работать без взаимных помех, но возможность взаимодействия в принципе существует, и в особых, патологических условиях, она может проявиться. Действительно, обрабатывая нервные стволы специальными химическими веществами, удается наблюдать не только взаимные помехи, но и передачу возбуждения в соседние волокна. Пожалуй, наиболее четкий опыт такого рода удалось поставить Катцу и Шмидту<sup>62</sup>. В лабораторных условиях они поместили два отдельных нервных волокна в ограниченный объем внешнего раствора. Концы волокон были разведены в разные стороны, и их можно было возбуждать и контролировать по отдельности. Было обнаружено, что если по одному из волокон бежит импульс, то одновременно изменяется возбудимость второго волокна. Изменение проходит через три четко выраженные стадии. Сначала возбудимость второго волокна падает (повышается порог возбуждения). Это уменьшение возбудимости опережает потенциал действия, бегущий по первому волокну и длится примерно до тех пор, пока потенциал в первом волокне не достигнет максимума. Затем возбудимость возрастает. Эта стадия совпадает по времени с процессом уменьшения потенциала в первом волокне. И наконец, возбудимость еще раз уменьшается, когда в первом волокне происходит небольшая заключительная гиперполяризация мембраны.

Экспериментально изучалось также одновременное прохождение импульсов по обоим волокнам. Взаимодействие импульсов при определенных условиях приводило к их синхронизации. Несмотря на то, что собственные скорости импульсов в разных волокнах были различными, при их одновременном возбуждении мог возникнуть коллективный импульс. Если собственные скорости импульсов были одинаковы, то коллективный импульс имел меньшую скорость. Когда собственные скорости отличались заметно, коллективная скорость имела промежуточное значение. Синхронизоваться могут лишь импульсы, скорости которых отличаются не слишком сильно — в эксперименте Катца и Шмидта не более чем на 10%, причем взаимодействие очень сильно зависит от сопротивления внешней среды и оказывается тем больше, чем выше сопротивление.

Перейдем к математическому описанию этого явления.

Мембранные потенциалы двух параллельных волокон удовлетворяют следующей системе уравнений:

$$\begin{aligned} C_1 \frac{\partial \varphi_1}{\partial t} &= \frac{R_2 + R_3}{\gamma} \frac{\partial^2 \varphi_1}{\partial x^2} - \frac{R_3}{\gamma} \frac{\partial^2 \varphi_2}{\partial x^2} - J_1, \\ C_2 \frac{\partial \varphi_2}{\partial t} &= -\frac{R_3}{\gamma} \frac{\partial^2 \varphi_1}{\partial x^2} + \frac{R_1 + R_3}{\gamma} \frac{\partial^2 \varphi_2}{\partial x^2} - J_2; \end{aligned} \quad (45)$$

здесь  $R_1$  и  $R_2$  обозначают продольные сопротивления аксоплазмы первого и второго волокна, а  $R_3$  — продольное сопротивление внешней среды,  $\gamma = R_1 R_2 + R_1 R_3 + R_2 R_3$ . Величины ионных токов могут быть заданы тем или иным способом, в зависимости от принятой модели нервного возбуждения. Если воспользоваться описанной выше простой аналитической моделью, то довольно быстро удастся решить выписанную систему. Результаты сводятся к следующему. При возбуждении одного волокна в соседнем наводится знакопеременный мембранный потенциал: в начале волокно гиперполяризуется, затем деполяризуется и наконец еще раз гиперполяризуется. Очевидно, что эти три фазы соответствуют пониженной, повышенной и еще раз пониженной возбудимости волокна. Специально была исследована возможность передачи возбуждения между соседними волокнами, — так называемой эфаптической передачи. Подстановка типич-

ных значений параметров, входящих в конечные формулы, показывает, что в нормальных условиях эфаптическая передача в стволах отсутствует. При повышении радиуса волокна вероятность передачи на него возбуждения увеличивается. Особо исследован случай неоднородных стволов. Передача возбуждения из волокна в волокно оказалась наиболее вероятной в неоднородных участ-

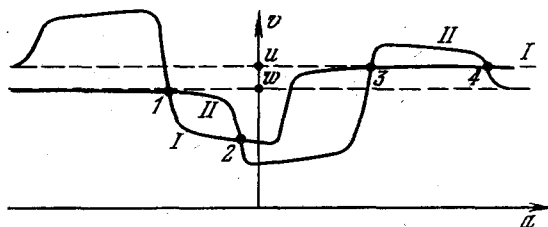


Рис. 31. К отысканию скорости коллективного импульса во взаимодействующих волокнах.

$a$  — расстояние между импульсами,  $v$  — скорость коллективного импульса,  $u, w$  — скорости отдельных не взаимодействующих импульсов. Кривые I и II — теоретические скорости импульсов в каждом из волокон при взаимодействии с соседним; точки их пересечения 1, 2, 3, 4 — коллективные состояния.

ние между импульсами  $a$ . Поскольку импульсы влияют друг на друга, то формально скорость каждого из них является функцией расстояния между ними (рис. 31). Точки пересечения кривых представляют собой коллективное состояние, поскольку при этих условиях оба импульса движутся с одинаковой скоростью на постоянном расстоянии друг от друга. На приведенном рисунке имеются четыре коллективных состояния, отмеченных цифрами 1, 2, 3 и 4; устойчивыми из них являются только состояния 1 и 3.

Состояние 1 соответствует такому случаю, когда впереди находится импульс, собственная скорость которого меньше. Он притормаживает второй быстрый импульс, не выпуская его вперед, и они оба движутся с относительно малой скоростью. В состоянии 3 впереди находится «быстрый» импульс, который тянет за собой «медленный». Коллективная скорость оказывается близкой к собственной скорости быстрого импульса.

#### г) Учет динамики развития возбуждения

Основные результаты этой главы были получены с помощью простой аналитической модели. Физически такой подход вполне оправдан, но при этом остаются вопросы, насколько точно такая аппроксимация, и как влияет истинная динамика развития возбуждения на распространение импульса<sup>63-65</sup>. Ответить на эти вопросы можно с помощью уравнений Ходжкина — Хаксли (3)–(5), (41). Скорость распространения импульса определяется только его передним фронтом, поэтому мы можем вообще не рассматривать калиевую проводимость. Далее, можно не рассматривать натриевую инактивацию, поскольку время этого процесса существенно больше времени активации. Тогда, в соответствии с уравнениями Ходжкина — Хаксли, получим

$$\begin{aligned} \frac{d\psi}{d\xi} &= \frac{1}{u^2} \frac{d^2\psi}{d\xi^2} + m^3, & -\infty < \xi < \infty, \\ \frac{dm}{d\xi} &= -\frac{1}{\tau(\psi)} [m - m_0(\psi)], \end{aligned} \quad (46)$$



где введена автомодельная координата  $\xi = t + (x/v)$  и следующие обозначения:

$$u = v \sqrt{\frac{RC^2 \Phi_*}{j'}}, \quad \psi = \frac{\Phi}{\Phi_*};$$

здесь  $\tau(\psi)$  и  $m_0(\psi)$  — известные функции. Из системы (46) удастся получить простые выражения для скорости распространения возбуждения в двух предельных случаях — быстрой и медленной релаксации натриевого тока. В первом случае, полагая  $\tau \rightarrow 0$ , получаем

$$u = 1 \quad \text{или} \quad v = \sqrt{\frac{j'}{RC^2 \Phi_*}}.$$

Этот результат совпадает с выражениями (43) для скорости распространения импульса в простой модели, рассмотренной выше. Можно считать, что количественно она соответствует быстрой релаксации натриевого тока. В предельном случае медленной релаксации получаем

$$v \approx 1,25 \left( \frac{j'}{\tau^3 C^5 \Phi_* R^4} \right)^{1/8}. \quad (47)$$

Подстановка известных значений параметров в (47) дает значение безразмерной скорости  $n \approx 0,39$ . Экспериментальное значение  $n$  составляет 0,27. Едва ли имеет смысл останавливаться на обсуждении способов более точного решения системы (46), которые приводят к лучшему согласию теории ( $n \sim 0,3$ ) и эксперимента. Достаточно подчеркнуть, что динамика натриевого тока оказывает существенно влияние на скорость распространения нервного импульса.

## 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов функционирования биологических систем обычно основывается на структурных исследованиях. В случае с возбудимыми мембранами положение осложняется тем, что до сих пор нет такого структурно-химического фундамента. Поэтому наиболее актуальной задачей ближайшего будущего следует считать выделение, изучение и реконструкцию мембранных компонентов, ответственных за регулируемый электрическим полем селективный ионный транспорт.

Достигнутый прогресс в изучении ионного транспорта связан отчасти с модельными экспериментами на БЛМ. Однако до сих пор остается много неясностей в важнейшей области, к которой относятся проблемы структуры, устойчивости и фазовых переходов в мембранах. Именно структурные дефекты, по-видимому, ответственны за фоновую проводимость БЛМ; они же могут определять закономерности электрического пробоя и фликкершум, характерный для этих систем. Теория подобных явлений пока отсутствует.

Количественное описание ионного переноса через мембраны, содержащие различные комплексоны, которые действуют как подвижные переносчики или фиксированные каналы, хотя и развито с почти исчерпывающей полнотой, но носит феноменологический характер. Переход на молекулярный уровень связан с большими трудностями, которые коренятся в самой природе изучаемого объекта. Кажется очевидным, что связывание и последующее движение иона сопряжено с конформационной перестройкой системы. Однако полный расчет структуры даже изолированного ионного комплекса (например, калия с валиномицином) представляет пока непреодолимую проблему. Возможный путь состоит, по-видимому, в более широком применении ЭВМ. Такие расчеты необходимы и для корректного решения проблемы селективности.

Наиболее интригующим вопросом в физике нервного импульса остается механизм действия ионных каналов возбудимых мембран, управляемых электрическим полем. Изменение проводимости канала либо связано с заметной перестройкой молекулярной геометрии системы, либо вызвано изменением электростатической компоненты энергии иона. Кажется естественным, что в первом случае канал будет работать дискретно, по принципу «все или ничего», а во втором проводимость его будет меняться непрерывно. Измерение спектров флуктуаций тока в принципе позволяет выбрать между этими двумя возможностями. Поэтому флуктуационный анализ ионных токов биологических мембран приобретает особое значение. Трудно переоценить важность и другого экспериментального метода изучения возбудимых мембран — измерения токов ворот. Если описывать ионный канал как некоторую макромолекулярную систему, которая характеризуется набором возможных конформационных состояний, каждому из которых отвечает определенное значение электрической переменной, то токи ворот отражают изменение этой переменной и тем самым — конформационную перестройку. Однако до сих пор остается не ясным, какова природа электрического параметра, характеризующего состояние канала. Пока не видно способа, который позволил бы различить, происходит ли перенос или поворот каких-то заряженных групп на большие расстояния, или имеет место кооперативная переориентация совокупности диполей атомного масштаба. Выяснение этого вопроса остается одной из актуальнейших задач биофизики нервного импульса.

Регистрация токов ворот имеет и более общее значение. Если рассматривать ионный транспорт через каналы как векторную ферментативную реакцию, то измерение асимметричных токов смещения фактически является новым и очень удобным методом изучения конформационных переходов. В современной биофизике живо обсуждается вопрос о том, играют ли такие переходы решающую роль в процессе ферментативного катализа<sup>66</sup>, или просто сопутствуют ему. Регуляционная роль конформационных переходов в мембранных транспортных системах вполне очевидна. Однако не исследован механизм ионно-конформационных взаимодействий в связи с элементарным актом перемещения частиц по каналу. Серьезного изучения заслуживает в связи с этим фундаментальная проблема соотношения динамических и статистических факторов, актуальная не только в связи с транспортными задачами, но имеющая и общий для биофизики интерес<sup>67</sup>. Проявление динамических закономерностей, которые определяют некоторую степень «машинности» в поведении системы<sup>68</sup>, может оказаться важным при рассмотрении каналов активного транспорта.

Теория распространения нервных импульсов по отдельным волокнам различной геометрии разработана достаточно подробно. Следующим шагом является рассмотрение густых сетей из электрически связанных нервных волокон, как возбудимых сред. В физике изучались близкие системы в связи с задачей о распространении фронта пламени. Однако биологическая возбудимая среда, которая «горит, но не сгорает», характеризуется большим разнообразием возможных режимов активности, среди которых особый интерес представляет фибрилляция или так называемая электрическая турбулентность. Развитие теории возбудимых сред связано со значительными трудностями, так как, кроме случайного распределения параметров, необходимо принимать во внимание нелинейный характер и память функции источника. Поэтому не удивительно, что подходящий формализм до сих пор разработать не удалось. Требуется специального анализа и такой вопрос, как применимость эргодической гипотезы к возбудимым средам. Сложность этой задачи окупается не только практиче-

ской важностью, но и внутренней красотой, которая проглядывается в тех модельных подходах, которые уже развиты в этой области.

Эпоха единой науки давно миновала, но влияние физики на прогресс биологии по-прежнему велико. И касается это не только новых методов исследования, но и самого стиля мышления. Поэтому нам казалось естественным поделиться с физической аудиторией успехами и трудностями одного из увлекательных направлений современной биологии.

Институт электрохимии АН СССР

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Гальвани, А. Вольты, Избранные работы о животном электричестве, М.—Л., Биомедгиз, 1937.
2. А. Ходжкин, Нервный импульс, М., «Мир», 1965.
3. Б. Катц, Нерв, мышца и синапс, М., «Мир», 1968.
4. Б. И. Ходоров, Общая физиология возбудимых мембран, М., «Наука», 1975.
5. A. Hodgkin, A. Huxley, J. Physiol. (Lnd.) 117, 500 (1952).
6. K. Cole, Ions, Potentials and Nerve Impulse, N.Y., J. Wiley, 1955.
7. J. F. Danielli, H. A. Davson, J. Cell. Comp. Physiol. 5, 495 (1935).
8. P. Mueller, D. Rudin, H. Tien, W. Wescott, Nature 194, 979 (1962).
9. T. Hana, D. A. Haydon, J. L. Taylor, Proc. Roy. Soc. A281, 377 (1964).
10. D. A. Haydon, J. Taylor, J. Theor. Biol. 4, 281 (1963).
11. P. Mueller, D. Rudin, Nature 217, 713 (1968).
12. Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, А. М. Шкроб, Мембраноактивные комплексоны, М., «Наука», 1974.
13. В. С. Маркин, Ю. А. Чизмаджев, Индуцированный ионный транспорт, М., «Наука», 1974.
14. A. Parsegian, Nature 221, 884 (1969).
15. B. Neumcke, P. Läuger, Biophys. J. 9, 1160 (1969).
16. S. Ginsburg, D. Noble, J. Membrane Biol. 18, 163 (1974).
17. S. Hladky, D. Haydon, Nature 225, 451 (1970).
18. S. Krasne, G. Eisenman, G. Szabo, Science 174, 412 (1971).
19. Е. А. Либерман, В. П. Топалы, Биофизика 14, 452 (1969).
20. S. Hui, D. Parsons, M. Cowden, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 71, 5068 (1974).
21. L. Langmuir, D. Waugh, J. Gen. Physiol. 21, 745 (1938).
22. D. Deamer, D. Branton, Science 158, 655 (1967).
23. J. Toyoshima, T. Thompson, Biochemistry 14, 1518, 1525 (1975).
24. R. Kornberg, H. McConnell, Biochemistry 10, 1111 (1971).
25. W. Pechhold, S. Blasenbrey, S. Woerner, Kolloid Zs. 189, 14 (1963).
26. W. Pechhold, ibid. 228, 1 (1968).
27. H. Trauble, J. Membrane Biol. 4, 193 (1971).
28. М. В. Волькенштейн, Конфигурационная статистика полимерных цепей, М., Изд-во АН СССР, 1952.
29. W. Pechhold, W. Dollpohf, A. Engel, Acustica 17, 61 (1966).
30. F. Johnson, H. Eyring, M. Polissar, The Kinetic Basis of Molecular Biology, N.Y., J. Wiley, 1954.
31. C. Armstrong, Quart. Rev. Biophys. 7, 179 (1975).
32. W. Chandler, H. Meves, J. Physiol. (Lnd.) 180, 788 (1965).
33. F. Conti, J. De Felice, ibid. 248, 45 (1975).
34. B. Hille, J. Gen. Physiol. 59, 637 (1972).
35. B. Hille, ibid. 61, 669 (1973).
36. G. Eisenman, Biophys. J. 2, 259 (1962).
37. L. Atwater, F. Bezanilla, S. Rojas, J. Physiol. (Lnd.) 201, 657 (1969).
38. A. Hodgkin, R. Keynes, ibid. 128, 6 (1954).
39. T. Hill, J. Theor. Biol. 10, 442 (1966).
40. Ю. А. Чизмаджев, С. Х. Айтыян, ibid. 64, 429 (1977).
41. K. Heckmann, Zs. phys. Chem. (N.F.) 44, 184 (1965).
42. С. М. Фишман, Б. И. Ходоров, М. В. Волькенштейн, Биофизика 17, 421 (1972).
43. R. Keynes, S. Rojas, J. Physiol. (Lnd.) 239, 393 (1974).
44. Ю. А. Чизмаджев, В. Ф. Пастушенко, Б. И. Ходоров, ДАН СССР 223, 491 (1975).
45. A. Verveen, L. De Felice, Progr. Biophys. and Molec. Biol. 28, 189 (1974).
46. H. Fischman, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 70, 876 (1973).

47. Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц, Статистическая физика, М., «Наука», 1964.
48. Y. Chen, T. Hill, Biophys. J. 13, 776 (1973).
49. A. Scott, Rev. Mod. Phys. 47, 487 (1975).
50. N. Wiener, A. Rosenbluth, Arch. Inst. Cardiol. M  x. 16, 206 (1946).
51. И. М. Гельфанд, М. Л. Ц  тлин, ДАН СССР 131, 1242 (1960).
52. С. В. Фомин, М. Б. Беркинблит, Математические проблемы в биологии, М., «Наука», 1973.
53. А. Н. Колмогоров, И. Г. Петровский, Н. С. Пискунов, Бюлл. МГУ, сер. А, 1, 6 (1937).
54. F. Offner, A. Weinberg, J. Young, Bull. Math. Biophys. 2, 61 (1940).
55. А. С. Компанеев, В. Ц. Гурович, Биофизика 11, 913 (1966).
56. Ю. И. Аршавский, М. Б. Беркинблит, С. А. Ковалев, В. В. Смолянинов, в кн. Модели структурно-функциональной организации некоторых биологических систем, под ред. И. М. Гельфанда, М., «Наука», 1966, с. 28.
57. В. С. Маркин, Ю. А. Чизмаджев, Биофизика 12, 900 (1967).
58. Б. И. Ходоров, Проблема возбудимости, Л., «Медицина», 1969.
59. С. Е. Б  сслер, УФН 98, 653 (1969).
60. В. С. Маркин, В. Ф. Пастушенко, Ю. А. Чизмаджев, Итоги науки. Электрохимия, т. 6, М., Изд. ВИНТИ, 1971, с. 165.
61. М. Б. Беркинблит и др. Биофизика 16, 103 (1971).
62. B. Katz, O. Schmidt, J. Physiol. (Lnd.) 97, 471 (1940).
63. J. Rinzell, J. B. Keller, Biophys. J. 13, 1313 (1973).
64. В. Ф. Пастушенко, Ю. А. Чизмаджев, В. С. Маркин, Биофизика 20, 1078 (1975).
65. P. H. Hunter, P. A. McNaughton, D. Noble, Progr. Biophys. and Molec. Biol. 30 (213), 99 (1975).
66. Л. А. Блюменфельд, Проблемы биологической физики, М., «Наука», 1974.
67. Э. Шрёдингер, Что такое жизнь с точки зрения физики? М., ИЛ, 1947.
68. Ю. И. Хургин, Д. С. Чернавский, С. Э. Шноль, Мол. биол. 1, 419 (1967).