

УДК 612.014.1:577.3

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ МЕМБРАН ЗБУДЛИВИХ КЛІТИН І МЕТАБОЛІЗМ

П. Г. Костюк

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Поверхнева мембрана клітини — це високоспеціалізована структура, що забезпечує здійснення ряду найважливіших функцій клітини. У самій загальній формі ці функції, безпосередньо пов'язані з поверхневою мембраною, можуть бути визначені так.

1. Створення нерівномірного розподілу речовин між протоплазмою клітини і позаклітинним середовищем.

2. Використання цього нерівномірного розподілу для генерації клітинних реакцій.

Поверхнева мембрана — основний фактор в обох функціях, хоч протоплазма і внутріклітинні структури можуть брати в них участь як вторинні фактори (наприклад, у вигляді деякого зв'язування речовин, що надійшли у клітину через поверхневу мембрану, яке закріплює створену її механізмами нерівномірність розподілу, та у вигляді передачі активності, що виникла на поверхневій мембрані, до внутріклітинних виконавців). Проте тепер навряд чи хто-небудь може серйозно ставити питання про протоплазматичне зв'язування речовин як першопричину асиметричного розподілу між клітиною і середовищем або внутріклітинні процеси як основу впливу на клітину зовнішнього подразнення.

Очевидно, існують два основні способи здійснення поверхневою мембраною цих найважливіших життєвих функцій; вони звичайно позначаються як «пасивний» і «активний». Під пасивним прийнято розуміти такий шлях, при якому на створення або зміну нерівномірного розподілу речовин між клітиною і середовищем не потрібна витрата енергії клітинного метаболізму, і їх пересування здійснюється з області, де вони мають більш високу вільну енергію, в область, де вона стає більш низькою. Клітинний метаболізм може включатися в цей шлях лише посередньо, підтримуючи або змінюючи ті бар'єри, які існують у ньому для пересування. Активним же шляхом є такий, при якому пересування речовин здійснюється з області, де вони мають меншу вільну енергію, в область з більшою вільною енергією; ця зміна може відбуватися лише з витратою енергії, вивільнюваної всередині клітини в процесі клітинного метаболізму.

Останні два десятиліття інтенсивного розвитку клітинної фізіології привели до досить стрункої схеми взаємозв'язку цих двох шляхів, яка тепер вже стала майже класичною. У поверхневій мембрані існує система активного транспорту речовин, зокрема основних неорганічних іонів, яка, використовуючи енергію клітинного метаболізму, переносить їх крізь мембрану і створює тим самим нерівномірний розподіл між протоплазмою і позаклітинним середовищем, компенсуючи прагнення до теплового вирівнювання. Досягнута асиметрія в їх розподілі створює трансмембранний електрохімічний градієнт, який може негайно

викликати реакцію клітини на зовнішнє подразнення — якщо тільки зовнішній подразник підвищує проникність поверхневої мембрани, порушує баланс і тим самим створює можливість для майже раптової появи трансмембранного струму. Активна реакція клітини по суті пасивна, а стан спокою — непереривний активний процес.

Чи так це просто? Факти, одержані в останні роки, більше свідчать про те, що хоч така схема в принципі правильна, вона водночас становить значне спрощення дійсно наявних у клітині відношень, і співвідношення «активних» і «пасивних» компонентів у функції поверхневої мембрани значно складніше. До таких фактів насамперед відноситься демонстрація можливості створення трансмембранної різниці потенціалів безпосередньо за рахунок «активного» переносу іонів крізь мембрану, а не за рахунок концентраційних градієнтів, здійснена на м'язових волокнах Кейнсом та співроб. [11] та підтверджена Муллінсом [14] і Едріаном [9]. У нашій лабораторії це питання було докладно досліджене на гігантських нервових клітинах молюсків, які є зручним об'єктом для всебічних електрофізіологічних, фізико-хімічних і біохімічних досліджень, та водночас мають всі функціональні властивості, характерні для нервових клітин самих високоорганізованих тварин.

Природно, що ці клітини, як і всі інші, вкриті поверхневою мембраною, фізичні характеристики якої можна точно виміряти з допомогою звичайних електротехнічних методів у поєднанні з введенням у клітину двох мікроелектродів (одного для пропускання електричного струму, а другого — для вимірювання різниці потенціалів по обидві сторони мембрани). Ця різниця у спокої становить 50—60 мВ, питомий опір мембрани — $1 \text{ ком} \cdot \text{см}^2$, а питома ємність — 30 мкф/см^2 [6, 8].

Найбільш повно фізико-хімічні властивості такої мембрани можуть бути описані при визначенні її електродних властивостей, тобто залежності існуючого на ній мембранного потенціалу від активності іонів у стичних з нею розчинах. З іонів, що знаходяться в позаклітинному розчині, лише іони калію при зміні їх активності істотно впливають на мембранний потенціал. Дослідження залежності мембранного потенціалу від логарифма активності іонів калію показує, що мембрана може поводитись як калієвий електрод (тобто змінювати потенціал приблизно на 58 мВ при зміні активності у десять раз), але лише при активності калію понад 20 мМ [5]. Такої активності калію в міжклітинній рідині ніколи не буває, і, отже, чисті калієво-електродні властивості клітинної мембрани — явище штучне. В умовах природного іонного середовища поведінка мембрани значно відрізняється від властивостей такого електрода; привертає увагу велика варіабільність індивідуальних показників мембранного потенціалу при цьому. Чому відбувається таке зрушення?

Звичайним поясненням цього є припущення, що в таких умовах мембрана значною мірою проникна і для інших іонів, зокрема для іонів натрію і хлору; калієва провідність є лише одним з компонентів іонної провідності мембрани. Дійсно, усунення іонів натрію з середовища в таких умовах дещо наближує мембранний потенціал до калієвої функції [4].

Проте, проведені в нашій лабораторії Айрапетяном [3] дослідження показали, що існують значно більш ефективні способи наблизити властивості мембрани до властивостей калієвого електрода. При охолодженні клітини деполяризуючий вплив іонів калію проявляється повною мірою; досить відновити температуру, як він зникає; більше того, мембранний потенціал стає вище звичайного. Такого самого ефекту можна досягти дією строфантину.

Отже, мембранний потенціал нервової клітини у фізіологічних умовах виявляється значно більше метаболічно залежним, ніж це має місце у мембрани, що працює на суто фізико-хімічних принципах. Природно, що в такому випадку і температурний коефіцієнт мембранного потенціалу у фізіологічних умовах має бути зовсім іншого роду, ніж той, який передбачався рівнянням Нернста для дифузійного мембранного потенціалу. Дослідження такої залежності на великій кількості гігантських нервових клітин показало, що для більшості з них він значно перевищує показники, передбачені цим рівнянням, хоч у деяких і точно їм відповідає. Клітини цього типу, як правило, виявлялись на самій поверхні нервового ганглію, де вони легко могли опинитися в несприятливих, нефізіологічних умовах у ході експерименту [2].

Таким чином, поверхнева мембрана може поводитись як калієвий електрод, проте в умовах її функціонування, близьких до нормальних, у ній працює ще якийсь електрогенний механізм, функція якого не визначається активністю іонів калію в стичному з мембраною середовищі. Створювана ним різниця потенціалів може додаватися до потенціалу калієвого електрода. Є всі підстави постулювати, що цей електрогенний механізм становить активний транспорт іонів натрію з клітини, який не компенсується протилежним рухом іонів калію. Одним з переконливих підтверджень правильності такого постулату є дослідження поведінки поверхневої мембрани у клітин, заздалегідь насичених іонами натрію (таке насичення легко досягається витримуванням їх у холодних розчинах, позбавлених іонів калію, або мікроін'єкцією з мікроелектродів, заповнених NaCl, і може бути проконтрольоване мікрофотометрично або з допомогою вимірювання внутріклітинної активності внутріклітинним натрієвим електродом). Після повернення такої збагаченої натрієм клітини до нормального середовища вона починає інтенсивно транспортувати ці іони в зовнішнє середовище, що супроводжується підвищенням різниці потенціалів, яка виникає на мембрані, вище рівня, максимально можливого для калієвого електрода. Повторне охолодження або застосування метаболічних інгібіторів усуває цей ефект [3].

Отже, підтримання електричної поляризації поверхневої мембрани в умовах, близьких до нормальних, може базуватися не тільки на суто фізико-хімічних принципах (дифузійному руху іонів уздовж електрохімічних градієнтів), активний метаболічний перенос іонів проти градієнтів також може бути причиною електрогенезу. Різниця потенціалів, додана таким чином до дифузійних потенціалів, порівняно невелика (видимо, не більше 20 мВ); проте при цьому слід брати до уваги, що вона лежить у межах значень, близьких до порогових для генерації в клітині активних процесів і тому може дуже істотно позначатися на фізіологічній діяльності клітини.

Для того, щоб мати можливість докладніше розглянути саме можливе функціональне значення цього додавання, необхідно коротко спинитися на основних принципах генерації в нервовій клітині активного процесу — нервового імпульсу — електричним виразом якого є потенціал дії.

Найбільш докладну характеристику поведінки мембрани під час генерації імпульсу дає вимірювання виникаючих при цьому трансмембранних струмів з допомогою методу фіксації напруги на мембрані (так званий voltage-clamp). Введення в клітину, крім відповідного, другого поляризовуючого електрода, з'єднаного з керувальною електронною системою, дозволяє автоматично підтримувати різницю потенціалів на мембрані і вимірювати необхідний для цього поляризовуючий струм, рівний за величиною і протилежний за напрямком трансмембранним

струмам. Характер іонних струмів, що виникають при цьому в гігантській нервовій клітині, був з'ясований у дослідях Кришталя, Магури і Пархоменка [7], Чемберлена і Керкута [10]. При деполяризації мембрани понад пороговий рівень виникає початковий вхідний струм іонів, який потім змінюється на стійкий вихідний струм. Якщо мембранний потенціал зрушується все далі у тому ж напрямку, вхідний струм посилюється, потім зменшується і нарешті змінюється на протилежно спрямований. Отже, трансмембранний струм під час генерації імпульсу безсумнівно становить «пасивний» рух іонів, керований їх електрохімічними градієнтами.

Водночас з такою реакцією при генерації в клітині потенціалів дії виникають електричні реакції іншої природи. Якщо в клітині, яка перебуває в стані високої фізіологічної активності, генерується достатньо тривалий розряд імпульсів, то через певний час слідом за ним розвивається істотне підвищення мембранного потенціалу (гіперполяризація). Вона може бути настільки значною, що мембранний потенціал підвищується понад порогове значення, і генерація імпульсів припиняється. Через деякий проміжок часу мембранний потенціал починає знову знижуватися, досягає порогової величини, і клітина починає генерувати ритмічні імпульси [2]. Потім знову виникає гіперполяризація і період мовчання і т. д. Така гіперполяризація відрізняється всіма тими рисами, які вище описані як характерні для «активного» компонента мембранного потенціалу. Насичення клітини натрієм провокує її появу, причому в цих умовах гіперполяризація стає ще більше температурно-залежною. Дія ДНФ або строфантину відразу ж змінює її на реполяризацію і розряд.

На підставі цих даних можна постулювати таку схему зв'язку між генерацією імпульсу і електрогенним іонним транспортом. Для переключення активного транспорту натрію із звичайного електронейтрального на електрогенний режим необхідне певне підвищення активності іонів натрію всередині клітини, які надходять туди під час генерації імпульсної активності. Досягнення цієї критичної концентрації через посередництво механізму електрогенного транспорту гіперполяризує мембрану і припиняє імпульсну активність, яка відновлюється знову після видалення з клітини надлишкового натрію тощо.

Природно, що досить важливо для оцінки таких даних знати, чи є така постімпульсна гіперполяризація поширеним механізмом в діяльності нервової системи або вузько-спеціальною рисою досліджуваних нами структур. Дані, які надходять тепер з ряду лабораторій, свідчать про те, що правильним є, видимо, перше припущення. Нахаджима і Такаhashi [15] прийшли до висновку, що тривала гіперполяризація після тетанічної активності у рецепторних нейронів рака створюється діяльністю електрогенного натрієвого насоса. Ранг і Ритчі [16] зробили такий самий висновок щодо посттетанічної гіперполяризації у немієлінізованих нервових волокон ссавців.

Не менший інтерес становить і питання про те, чи є виникнення інтенсивної імпульсної активності і гадане збільшення внутріклітинної активності іонів натрію єдино можливим фізіологічним механізмом активації електрогенного іонного транспорту. Чи не може така активація здійснюватися, наприклад, прямо синаптичними впливами з допомогою взаємодії передатчиків з ферментними транспортними системами? Нещодавно описані деякі явища, для пояснення яких можна припускати такий зв'язок.

Лібет і Кобаяші [13] виявили, що синаптичні впливи викликають у нейронах симпатичних гангліїв, поряд із звичайними постсинаптичними-

ми процесами, також дуже тривалі зміни потенціалу постсинаптичної мембрани, не супроводжувані зміною її іонної провідності. Керкут та співробіт. [12] встановили, що допамін викликає у нейронів слимака тривалу гіперполяризацію (і гальмування), також не пов'язану зі зміною іонної провідності постсинаптичної мембрани. В обох випадках були висловлені припущення про можливість постсинаптичної стимуляції електрогенного натрієвого насоса, проте вони потребують ще ретельного експериментального аналізу.

Наведені дані про складність процесів зв'язку між активним іонним транспортом та електричними явищами на поверхневій мембрані, які визначають її функціональні властивості, звичайно, можна вже тепер врахувати як у фізичних, так і математичних моделях такої мембрани — з допомогою включення додаткової ЕРС, величина якої визначається швидкістю електрогенного транспорту. Для того, щоб таке включення стало не формальним, необхідно розв'язати деякі принципиальні питання кінетики електрогенного іонного транспорту і, насамперед, питання про характер зв'язку між внутріклітинною активністю іонів натрію та швидкістю їх виведення. Наявні літературні дані дуже суперечні — можливо, тому, що вони одержані на різних об'єктах. Кейнс і співроб. [11] спершу припустили, що швидкість виведення натрію в м'язових волокнах пропорційна кубу внутріклітинної концентрації, а при високих значеннях її настає насичення транспортної системи.

Великий інтерес становлять нещодавно опубліковані дані Томаса [17], одержані на гігантських нейронах молюсків. Автор прямо вимірював трансмембранний струм, створюваний електрогенним насосом, і встановив, що цей струм пропорційний внутріклітинній активності іонів натрію і становить $\frac{1}{3}$ струму, використаного для мікроіонофорезу цих іонів у клітину. Отже, можна гадати, що в цьому випадку $\frac{2}{3}$ натрію переноситься крізь мембрану в обмін на інший катіон, і лише $\frac{1}{3}$ бере участь у створенні електричної поляризації мембрани.

Дальший розвиток цих експериментів дасть, видимо, можливість представити кількісний опис ролі електрогенного іонного транспорту в функції поверхневої мембрани збудливої клітини.

Література

1. Айрапетян С. Н.— Биопфизика, 1969, 14, 663.
2. Айрапетян С. Н.— Биопфизика, 1969, 14, 866.
3. Айрапетян С. Н.— Биопфизика, 1969, 14, 1027.
4. Герасимов В. Д., Костюк П. Г., Майский В. А.— Биопфизика, 1965, 10, 82.
5. Герасимов В. Д., Костюк П. Г., Майский В. А.— Биопфизика, 1965, 10, 272.
6. Герасимов В. Д., Майский В. А.— Физиол. журн. СССР, 1963, 49, 1099.
7. Крышталь О. А., Магура И. С., Пархоменко Н. Т.— Биопфизика, 1969, 14, 936.
8. Майский В. А.— Физиол. журн. СССР, 1963, 49, 1468.
9. Adrian R., Slayman C.— J. Physiol., 1966, 184, 970.
10. Chamberlain S., Kerkut G.— Comp. Biochem. Physiol., 1969, 28, 787.
11. Cross S., Keynes R., Rybova R.— J. Physiol., 1965, 181, 865.
12. Kerkut G., Brown L., Walker R.— Life Science, 1969, 8, 297.
13. Libet B., Kobayashi H.— Feder. Proc., 1968, 27, 750.
14. Mullins L., Awad M.— J. Gen. Physiol., 1965, 48, 761.
15. Nakajima S., Takahashi K.— J. Physiol., 1966, 187, 105.
16. Rang H., Ritchie J.— J. Physiol., 1968, 196, 183.
17. Thomas R.— J. Physiol., 1969, 201, 495.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF SURFACE MEMBRANES OF EXCITABLE CELLS AND METABOLISM

P. G. Kostyuk

The A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

All the active physiological processes developing on the surface membranes of the excitable cells are produced by transmembrane currents of the basic inorganic ions — sodium, potassium, calcium and chloride. The data obtained by the present time show that ion transfer through the membrane in these case can be produced by means of two different forces — “passively” due to electrochemical gradients existing on the membrane and “actively” due to the energy of metabolic processes taking place in the cell. In the first case ion transfer is possible only in gradient direction, and in the second one — also in the direction against electrochemical gradient for the ion in transfer. Both mechanisms are interdependent, as the metabolic ion transfer maintains their non-uniform distribution on both sides of the membrane and thus maintains electrochemical gradients, and “passive” penetration of ions through the membrane inside the cell, in its turn, activates metabolic transport systems.

Investigations carried out on the mollusc giant neurons confirm these statements well. These investigations show that both “passive” and “active” ion transfer may take part in producing constant electrical polarization of membrane. The degree of “active” transfer participation may be determined by measuring the temperature dependence of the membrane potential, investigating the effect of metabolic inhibitors on it, etc. This degree proves to be particularly essential, when in connection with the accumulation of sodium ions inside the cell the activation of enzyme systems takes place, providing “active” transfer of sodium from the cell into the extracellular medium. Under natural conditions such activation is possible with rhythmical cell excitation resulting in the entering of sodium ions into it. An increase in the membrane potential produced by the “active” transfer may lead to cessation of rhythmical activity and stopping of further accumulation of sodium in the cell.

The possibility of chemical activation of the systems of “active” ion transfer by substances acting on the surface membrane from extracellular medium (for example, by synaptic transmitters) and participation of such transfer in the creation of synaptic reaction are discussed.