

УДК 577.3

РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О КЛЕТОЧНОМ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗЕ И ВОЗБУДИМОСТИ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ШКОЛА

П.Г. КОСТЮКА

© 2024 г. С. С. Колесников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 18.04.2024 г.

После доработки 25.04.2024 г.

Принята к публикации 30.04.2024 г.

Становление и развитие клеточной физиологии в СССР в значительной степени ассоциируется с именем академика Платона Григорьевича Костюка, выдающегося ученого с мировым именем. Его активная научная деятельность пришлась на вторую половину XX в. — период бурного развития электрофизиологии, сопровождавшегося значимыми достижениями, отмеченными тремя Нобелевскими премиями. В то время электрофизиология была фактически единственной областью биологии, в которой были разработаны методы и подходы для анализа физиологических процессов в тканях и клетках в режиме реального времени. Цель данного эссе — осветить ретроспективные аспекты становления электрофизиологии и очертить вклад школы П.Г. Костюка в этот процесс.

Ключевые слова: электрофизиология, электрическая возбудимость, ионные каналы, фиксация потенциала, patch clamp

DOI: 10.31857/S0301179824020051 **EDN:** CGTSWG

ВВЕДЕНИЕ

Развитие отечественной нейрофизиологии в значительной степени ассоциируется с именем академика Платона Григорьевича Костюка (1924–2010). Выдающийся ученый с мировым именем, он фактически являлся основателем школы клеточной нейрофизиологии в СССР, в рамках которой проводились исследования мирового уровня. Платон Григорьевич и его ученики внесли существенный вклад в развитие клеточной и молекулярной физиологии и клеточной биофизики. Впервые в СССР он применил микроэлектродную технику для анализа ионных механизмов возбудимости, изучения синаптических процессов в спинном мозге и исследования структурно-функциональной организации нервных центров. Платоном Григорьевичем Костюком была предложена оригинальная методика внутриклеточной перфузии. Это позволило выявить существенные мембранные и молекулярные механизмы, лежащие в основе жизнедеятельности нервной клетки, установить ряд функциональных свойств ионных каналов и рецепторов, очертить их фармакологический профиль. Только исследования роли Ca^{2+} в физиологии клетки и механизмов Ca^{2+} гомеостаза могли бы обессмертить его имя в науке.

Будучи плодотворным ученым (~1000 научных публикаций, 15 монографий, 4 учебника), Платон Григорьевич также был крупным организатором науки, педагогом, общественным деятелем и в целом очень интересным и разносторонним человеком [1, 109]. Не ставя задачу в рамках данной статьи очертить все его личностные качества и жизненный путь, тем не менее отмечу, что научная деятельность П.Г. Костюка была повсеместно признана и высоко оценена государством и научной общественностью. Он был действительным членом Академии наук СССР и ее преемницы — Российской академии наук, Академии наук УССР, Академии медицинских наук Украины, Немецкой академии естествоиспытателей “Леопольдина”, Академии наук Чехии, Европейской академии естественных наук. За выдающиеся достижения в развитии физиологической науки, большой вклад в подготовку высококвалифицированных научных кадров в 1984 г. П.Г. Костюк был удостоен звания Героя Социалистического Труда. Он награжден двумя орденами Ленина (1981, 1984), двумя орденами Трудового Красного Знамени (1967, 1974), орденами “За заслуги” (1993) и Князя Ярослава Мудрого V степени (1998), медалями “За победу над Германией”, “За доблестный труд”. Ему присуждены Государ-

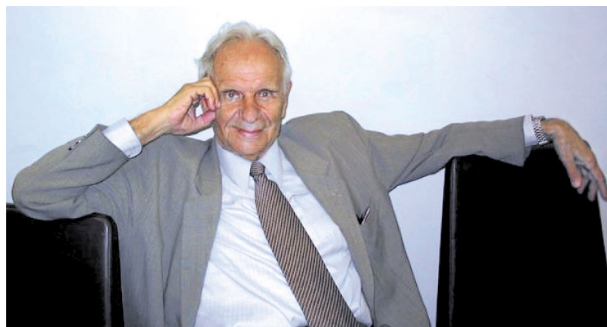


Рис. 1. Платон Григорьевич Костюк (1924–2010.).

ственная премия СССР (1983), Государственная премия УССР (1976), Государственная премия Украины (1992), премия имени И.П. Павлова (1960), премия имени И.М. Сеченова (1977), премия имени А.А. Богомольца (1987), премия имени Луиджи Гальвани Джорджтаунского университета (США, 1992) (рис. 1).

Активная научная деятельность П.Г. Костюка пришлась на вторую половину XX в. — период бурного развития и фундаментальных достижений электрофизиологии, отмеченных тремя Нобелевскими премиями: 1963 г. — Джон Экклс, Алан Ходжкин и Эндрю Хаксли (John Eccles, Alan Hodgkin, and Andrew Huxley) “за открытия ионных механизмов возбуждения и ингибирования мембраны нервных клеток”; 1970 г. — Бернард Кац, Юлиус Аксельрод и Ульф Эйлер (Bernard Katz, Julius Axelrod, and Ulf von Euler) “за работы в области биохимии нерва”; 1991 г. — Эрвин Неер и Берт Сакман (Erwin Neher, Bert Sakmann) “за открытия, касающиеся функционирования одиночных ионных каналов в клетках”. В то время электрофизиология была фактически единственной областью биологии, в которой были разработаны достаточно эффективные методы и подходы для анализа *in situ* и *ex vivo* в режиме реального времени физиологических процессов в тканях и одиночных клетках, разумеется, если таковые были ассоциированы с изменением электрического потенциала на клеточной мембране. Цель данного эссе — осветить ретроспективные аспекты развития электрофизиологии и очертить вклад школы П.Г. Костюка в этот процесс.

РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О БИОЭЛЕКТРИЧЕСТВЕ

Становление и развитие представлений об электрических явлениях в биологических объектах имеют долгую историю и в значительной степени связаны с исследованиями нервно-мышечных

препаратов. Еще древнегреческие врачи в попытке выявить связь анатомии и физиологии ввели понятие “жизненной силы” — эфемерной субстанции, которая обеспечивает активность тела человека и животных. Древнеримский врач, анатом, фармаколог и философ Кладиус Гален (Claudius Galenus) (129–216 гг. н.э.) в своем учении обосновывал ключевую роль нервов в движении различных частей тела и утверждал, что головной и спинной мозг являются “средоточием движения, чувствительности и душевной деятельности” [8]. По Галену, движение инициируется “жизненной силой” (animal spirits), которая распространяется по нервам. Хотя ни Гален, ни его последователи не прояснили ни природу “жизненной силы”, ни каким образом она управляет движением, идеи Галена оставались концептуальными вплоть до XVII в. несмотря на то, что они не привели к сколь-нибудь значительным открытиям.

Наполнить идею некоторым содержанием попытался Рене Декарт (1596–1650), французский философ, математик и естествоиспытатель, одна из ключевых фигур научной революции XVII в., которая в значительной степени связана с разработкой гидравлических машин, физических принципов их функционирования и механики в целом. Декарт рассматривал организм как механическую машину, полагая, что все его действия и происходящие в нем процессы управляются законами механики. Следуя представлениям Галена о том, что все тело пронизано нервами, берущими свое начало в мозге, Декарт рассматривал нервы как тонкие ниточки, окруженные оболочкой, как трубочкой [23]. В этих трубочках движется “жизненная сила” — наиболее подвижные и легкие частицы крови, которые отфильтровываются от других частиц в мозге. Под действием внешних возмущений на органы чувств или нервные окончания натяжение нити усиливается, открывая клапаны в мозге, и “жизненная сила” может перемещаться по нервам в мышцы, раздувая их и тем самым заставляя укорачиваться и сокращаться. Таким образом, нервная субстанция, транспортируемая по нервам из мозга, детерминирует двигательную реакцию в ответ на внешнее воздействие.

Не отражая, как мы теперь знаем, сколь-нибудь реалистичную картину функционирования нервной системы и нервно-мышечного сопряжения, эти механистические представления Декарта тем не менее допускали верификацию, а значит, приносили научную методологию в

исследования нервной системы. Центральным в представлениях Декарта было то, что нервы были лишь транспортной системой для нервной субстанции, источником которой был мозг, а будучи оторванными от мозга, нервы сами по себе не могли инициировать мышечное сокращение. Кроме того, мышечное сокращение ассоциировалось с перетеканием нервной субстанции, т.е. с изменением объема мышц. Оба положения были вполне проверяемы. Определяющий шаг в этом направлении был сделан голландским натуралистом Яном Свамердамом (Jan Swammerdam, 1637–1680), который разработал нервно-мышечный препарат, ключевой для последующей экспериментальной нейрофизиологии, и в определенном смысле заложил основы современных представлений о функциях нерва [23].

В одной из первых экспериментальных работ Свамердам продемонстрировал, что изолированное сердце лягушки способно сокращаться, для чего, следовательно, не требуется его связь с мозгом. Далее, он показал, что перерезание нерва *in situ* обездвиживает различные мышцы лягушки и других животных, но их сократимость можно инициировать касанием нерва металлическим предметом. И наконец, Свамердам отработал методику выделения бедренных мышц лягушки без нарушения иннервации. Используя эти препараты, он показал, что изолированные мышцы способны сокращаться при механическом раздражении нерва и объем мышц при сокращении не меняется. Это окончательно поставило под сомнение существование “нервной субстанции” в форме жидкости или газа. Далее, Свамердам показал, что мышечное сокращение, инициируемое раздражением нерва, является универсальным явлением, которое можно наблюдать на нервно-мышечных препаратах не только бедренной, но и других мышц лягушки, на различных мышцах других животных. Природа раздражимости / возбудимости нерва в нервно-мышечных препаратах Свамердама оставалась неясной долгое время.

Исаак Ньютон (1642–1727), вероятно, был первым, кто предположил электрическую природу возбудимости нерва, исходя из соображений, что только электрическая энергия и упругие колебания могут распространяться достаточно быстро между мозгом и мышцей [96]. Стивен Гейлс (Stephen Halles, 1677–1761), английский физиолог и химик, пришел к аналогичным заключениям, полагая, что нервный сигнал может переноситься вдоль поверхности нерва в форме электрической энергии [43]. Идея об электри-

ческой природе возбудимости нерва была мало популярна и подвергалась обширной критике. Один из ключевых аргументов состоял в том, что все органы и ткани животных являются проводниками и поэтому электрический сигнал не может распространяться по нерву избирательно к данной мышце, не распространяясь в другие мышцы и ткани. Тем не менее эта идея была воспринята рядом натуралистов XVIII в., включая Пьера Бертолона (Pierre Bertholon de Saint-Lazare) (1741–1800), французского физика, который исследовал влияние электричества на биологические объекты и аккумулировал разнородные факты, подтверждающие связь электричества и физиологии [2]. Именно он ввел понятие *animal electricity*, или “биоэлектричество” в современном звучании.

Феноменологическая электрофизиология

Первые целенаправленные экспериментальные подтверждения того, что электрические явления могут играть существенную роль в физиологических процессах, были получены британским ученым Джоном Уолшем (John Walsh, 1726–1795). Проводя эксперименты с электрическими угрями и скатами в период 1772–1775 гг., Уолш продемонстрировал, что эти животные могут генерировать видимые разряды и вызывать шок, наподобие тех, какие могут создаваться с помощью Лейденской банки, т.е. заряженного электрического конденсатора [112]. Электрический орган рыб был идентифицирован и анатомически описан Джоном Хантером (John Hunter, 1728–1793), шотландским хирургом и натуралистом, сотрудничавшим с Уолшем [45, 112]. Организация электрического органа в виде стопок мембранных дисков позже послужила прообразом для создания электрической батареи Вольта.

Революционный вклад в развитие представлений о биоэлектричестве внес Луиджи Гальвани (1737–1798), итальянский врач, физиолог и физик, значительная часть научной деятельности которого была посвящена проверке идеи о роли электричества в мышечном сокращении [99]. В своих знаменитых *Commentarius* [36], опубликованных в 1791 г. и обобщавших эксперименты за период 1780–1790 гг., Гальвани, в частности, констатировал, что препарировал лягушку специально для “электрических исследований”. Его нервно-мышечный препарат включал нижние конечности лягушки с оголенным бедренным нервом и металлический электрод в позвоночном канале. Используя электростатический

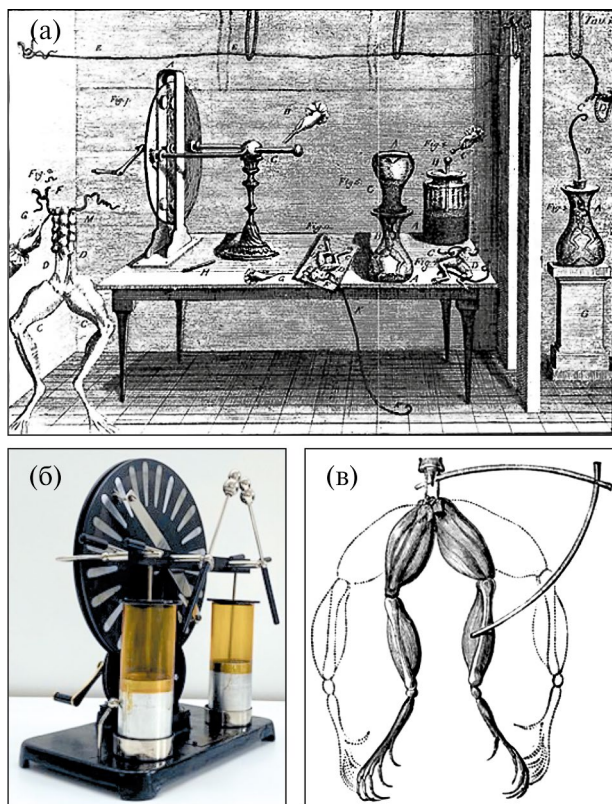


Рис. 2. Эксперименты Гальвани.

генератор и Лейденскую банку как накопитель и источник электрического заряда (рис. 2а, б), Гальвани удалось продемонстрировать мышечное сокращение в ответ на стимуляцию нерва электрическим разрядом.

Однажды мышечное сокращение наблюдалось, когда его ассистент случайно коснулся ланцетом бедренного нерва в момент разряда зарядного устройства, не контактировавшего непосредственно с препаратом лягушки (рис. 2а). Этот феномен объясняется способностью электромагнитного возмущения распространяться в непроводящей среде, наводя индукционные токи (токи Фуко) в проводниках. Это явление и труды Бенджамина Франклина (1706–1790) (один из отцов-основателей США, дипломат, ученый) по атмосферному электричеству [24] привели Гальвани к изящному эксперименту. Когда он располагал нервно-мышечный препарат с прикрепленным длинным проводником рядом с громоотводом, то вспышка молнии могла стимулировать мышечное сокращение.

Одним их существенных фактов, установленных Гальвани, было то, что при стимуляции

мышечного сокращения сильный электрический разряд мог оказаться менее эффективен, чем слабый. Более того, после серии стимуляций мышца теряла способность к сокращению, которая, однако, могла восстановиться после определенного периода покоя. По сути, это была первая демонстрация явления рефрактерности в возбудимых системах.

Современник Гальвани Альбрехт фон Галлер (1708–1777), швейцарский анатом, естествоиспытатель и непререкаемый авторитет в физиологии своего времени, сформулировал концепцию чувствительности / раздражимости (irritability) — одну из важнейших идей в физиологии XVIII в. [98]. В соответствии с этой доктриной, реакция организма на внешнее воздействие слабо зависит от его природы и сводится к универсальным изменениям внутренних функций. Следуя этой доктрине, Гальвани рассматривал электрический разряд как триггер, стимулирующий мышечное сокращение, а не как его движущую силу. Он предполагал, что внешний электрический разряд запускал специфический внутренний механизм, который и приводил мышцу в движение: “The electrical atmosphere hit, and pushed, and vibrated by the spark is that, which brought to the nerve, and similarly pushing, and commoting some extremely mobile principle existing in nerves excites the action of the nerveo-muscular force” [98]. В конечном итоге Гальвани пришел к заключению, что этот extremely mobile principle (элемент) является электрическим сам по себе и представляет особую форму электричества, генерируемого организмом как следствие жизненных процессов.

В согласии с этой идеей Гальвани показал, что если соединить концы нервов у двух нервно-мышечных препаратов, расположенных на металлических пластинках, то это инициирует сокращение обеих мышц. По существу, это была демонстрация распространения биоэлектричества. Гальвани также показал, что если нерв соединить металлической дугой с мышцей, то можно вызвать ее сокращение, которое не наблюдалось, если нерв подсушить (Рис. 2в). Это навело Гальвани на мысль, что нерв представляет собой проводящую среду, изолированную от внешней непроводящей оболочкой, наподобие воска. Фактически это было предсказание существования липидной клеточной мембраны. Мышца по Гальвани сама по себе является источником биоэлектричества и похожа на заряженную Лейденскую банку, которая аккумуля-

рует положительный и отрицательный заряды на внешней и внутренней сторонах соответственно. Природа этого электрического дисбаланса и механизмы его поддержания, разумеется, не имели объяснения в ту пору. Электрический ток, который очевидно требовался для обеспечения сократимости, т.е. перезарядки мышцы, требовал специальных проводящих путей. Гальвани полагал, что на поверхности нерва и мышцы имеются мелкие проницаемые для воды отверстия, которые обеспечивают требуемую электрическую связь внутренней и внешней сред. По сути, этим Гальвани предвосхитил концепцию проводящих водных пор, т.е. ионных каналов, которые пронизывают непроницающую клеточную мембрану, обеспечивая ее перезарядку.

В то время, когда Гальвани выполнял свои эксперименты по анализу природы биоэлектричества, его соотечественник Алессандро Вольта (1745–1827), итальянский физик, химик и физиолог, проводил исследования способности металлов генерировать электричество. Вольта обнаружил, что между различными металлами, соединенными в единую цепь, возникает разделение зарядов на противоположных концах, что и можно было зарегистрировать электрометром, представляющим собой чувствительный электроскоп (прибор, реагирующий на электрический заряд), соединенный с электрическим конденсатором. Оказалось, что наибольший электрический заряд и, соответственно, электрический потенциал генерировались парой цинк–серебро, но и в этом случае таковой был значительно меньше потенциала, продуцируемого электростатическим генератором (рис. 26). Последовательное соединение биметаллических пар в стопку пропорционально повышало генерируемый потенциал, но как источник электричества эта конструкция не выдерживала критики. Успех пришел, когда Вольта обеспечил контакт биметаллов через кусочек бумаги, пропитанной соевым раствором – фактически это было изобретение электрической батареи [110]. Существенным свойством батареи Вольта оказалось то, что она была постоянным источником электричества, в отличие от Лейденской банки, генерировавшей лишь кратковременные, практически мгновенные разряды.

Руководствуясь своими опытами, Вольта подверг критике теорию Гальвани о биоэлектричестве, основываясь на том, что в экспериментах Гальвани использовались металлические электроды, в частности пара железо–медь, что при

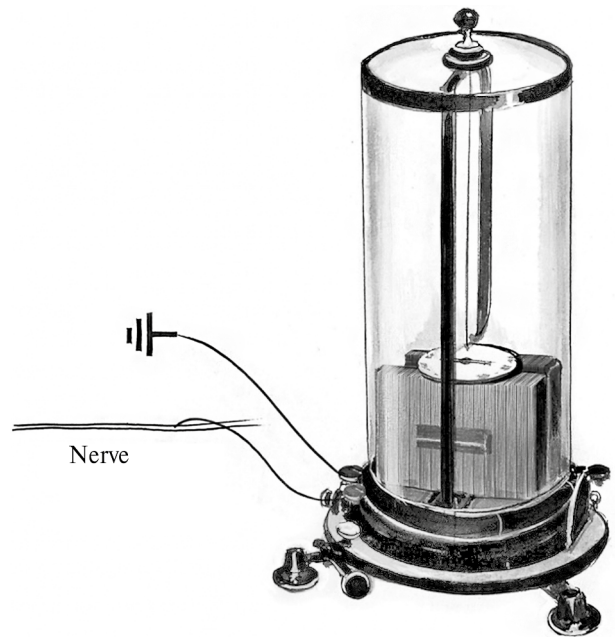


Рис. 3. Астатический гальванометр Нобили.

контакте с биологической тканью, содержащей электролит, должно было приводить к генерации электричества. Убедительные аргументы Вольта и его авторитет, в значительной степени связанный с эффективностью его электрической батареи, разделили ученое сообщество на два лагеря – один, состоящий из сторонников теории Гальвани о биоэлектричестве, и второй – из разделяющих мнение Вольта, что эксперименты Гальвани являются артефактом. Дилемма разрешилась спустя несколько десятилетий.

Инструментальная электрофизиология. Начало

Дальнейший прогресс в исследовании биоэлектричества ассоциировался с развитием физических методов анализа электрических явлений в целом. Существенным инструментальным шагом было создание итальянским физиком Леопольдо Нобили (1784–1835) нового типа гальванометра – прибора, измеряющего силу и направление тока (рис. 3). Он оказался настолько чувствительным, что позволил ему впервые зарегистрировать электрический ток в препарате лягушки по Гальвани [98].

Значимые технические инновации были внесены Эмилем Дюбуа-Реймоном (Emil Du Bois-Reymond, 1818–1896), немецким физиологом и философом швейцарского происхождения. Во-первых, чтобы снять возражение Вольта, Дюбуа-Реймон разработал неполяризуемые элект-

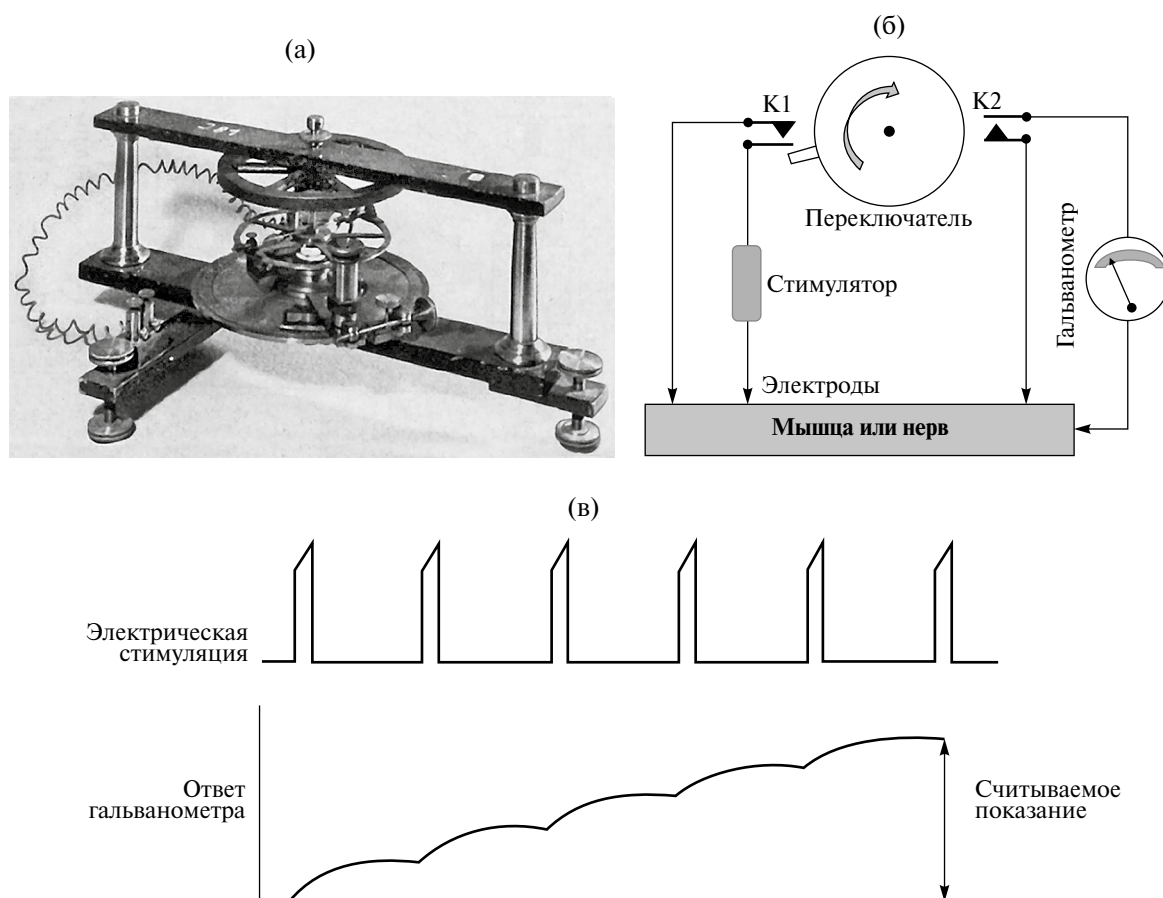


Рис. 4. Электромеханический рефлекс Бернштейна.

роды в виде проводника из амальгамы цинка и сульфата цинка с покрытием из формовочной глины. Им также был создан первый импульсный источник тока для градуированной стимуляции нерва и мышц. Он модифицировал гальванометр Нобили, добавив мультипликатор (фактически электрический трансформатор), что обеспечило достаточную чувствительность, чтобы детектировать импульсные биопотенциалы. Фактически Дюбуа-Реймон создал первый комплекс приборов для электрофизиологических исследований биологических тканей и прежде всего нервов и мышц. Используя нервно-мышечный препарат лягушки, он впервые продемонстрировал существование основных электрических явлений в возбудимых тканях, показав, что между интактной поверхностью и поперечным разрезом мышцы или нерва протекает постоянный ток покоя и при возбуждении мышцы и нерва этот ток кратковременно падает почти до нуля [35]. Как мы знаем сейчас, это явление, названное Дюбуа-Реймоном как отрицательное колебание (negative variation), связано с генерацией и распространением потенциал действия.

Следующим шагом было измерение скорости распространения возбуждения, впервые выполненное Германом фон Гемгольцем (1821–1894), немецким физиком, врачом и физиологом. Измеряя задержку между моментом электрической стимуляции нерва и сокращением мышцы, Гемгольц оценил эту скорость величиной ~ 30 м/с [100], что было существенно медленнее распространения электрического сигнала по проводнику. Это отчасти поставило под сомнение электрическую природу сигнала, распространявшегося по нерву после электрической стимуляции. Внести ясность в этот вопрос могло бы измерение скорости распространения “отрицательного колебания”, что не удалось сделать Дюбуа-Реймону, но удалось его ученику Юлиусу Бернштейну (Julius Bernstein, 1839–1917 гг.), немецкому физиологу.

Из экспериментов Гемгольца и им подобных следовало, что “отрицательное колебание” — потенциал действия (action potential) в современной терминологии — должно представлять собой быстрое событие длительностью поряд-

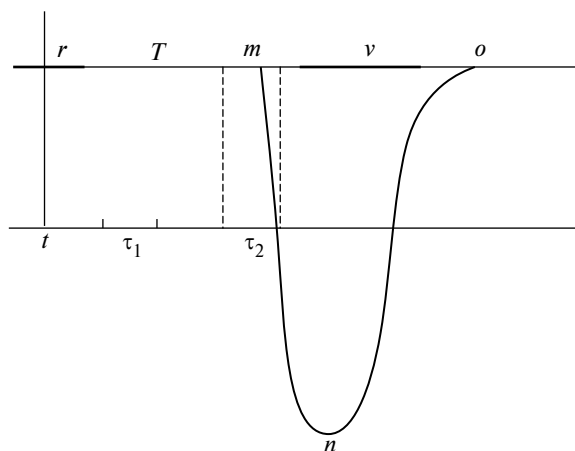


Рис. 5. Потенциал действия (negative variation) в дискретной реконструкции Бернштейна [22].

ка 1 мс. Все типы гальванометра – единственного измерительного прибора, доступного в ту пору для мониторинга биоэлектричества, – были слишком инерционны: характерное время отклика было порядка 1 с. Поэтому регистрация миллисекундных электрических событий казалась неразрешимой на тот момент задачей. Бернштейн предложил оригинальную методику, основанную на использовании сконструированного им прибора – дифференциального реатора (differential rheotome) в специальной конфигурации (рис. 4а, б) [22]. Общая идея Бернштейна состояла в том, что отклик гальванометра, фактически интегратора, на электрический импульс постоянной длительности был пропорционален его амплитуде (рис. 4в). Это давало возможность дискретной реконструкции временного хода потенциала действия (ПД), если использовать достаточно короткую стимуляцию нерва. В электромеханическом реаторе Бернштейна достигалось рекордное по тем временам временное разрешение порядка 0.3 мс.

Варьируя задержку между электрическим стимулом и моментом измерения с шагом 0.3 мс и многократно повторяя каждое измерение для накопления сигнала, Бернштейн провел дискретную реконструкцию ПД с шагом 0.3 мс (рис. 5). Это была первая достаточно точная регистрация ПД, который действительно оказался быстрым событием с длительностью порядка нескольких миллисекунд. Более того, оказалось, что ПД демонстрировал овершут по отношению к нулевой линии тока покоя, показывая, что измеряемый ток менял полярность. Меняя расположение стимулирующего электрода, Бернштейн оценил

скорость распространения потенциала действия величиной 28.7 м/с, что практически совпадало с оценкой Гемгольца – 30 м/с.

Еще одним концептуально значимым вкладом Бернштейна была “мембранная гипотеза” [97]. В соответствии с этой гипотезой, клетка окружена мембраной, которая в покое селективно проницаема для ионов K^+ . Поскольку концентрация K^+ внутри клетки выше, чем снаружи, то, согласно термодинамическим законам, ионы K^+ должны двигаться наружу, создавая отрицательный по отношению к наружной поверхности трансмембранный потенциал. Опираясь на термодинамическую теорию возникновения диффузионного потенциала в растворах, развитую немецким физиком и химиком Вальтером Нернстом (Walter Nernst, 1864–1941), Бернштейн предложил следующее выражение для потенциала покоя клеточной мембраны:

$$V = KT \frac{2v}{u+v} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}, \quad (1)$$

где $K = 0.86 \times 10^{-4}$ В; T – абсолютная температура соответственно; v и u – подвижности моновалентных анионов и катионов соответственно; $[K^+]_o$ и $[K^+]_i$ – внеклеточная и внутриклеточная концентрации K^+ соответственно.

Таким образом, в соответствии с Бернштейном, потенциал на мембране покоящейся клетки фактически определяется равновесным потенциалом для ионов K^+ . Основываясь на своих регистрациях “отрицательного колебания”, Бернштейн предположил, что во время возбуждения мембрана утрачивает свою селективность к K^+ и становится проницаемой для других ионов. При том, что мембранная гипотеза в целом объясняла существование тока покоя и падение его во время прохождения потенциала действия, она не предсказывала его овершут, т.е. реверсию его знака. По этой причине и потому что, по мнению Бернштейна, оно могло быть следствием возникновения серии диффузионных потенциалов на границах разделов сред, он не придавал существенного значения этому явлению. Между тем британский биолог и физиолог Чарльз Овертон (1865–1933) продемонстрировал, что внеклеточный Na^+ абсолютно необходим для мышечного сокращения, которое практически не зависело от типа внеклеточного аниона [22]. Он предположил, что при стимуляции мышцы или нерва электрическим импульсом их мембрана кратковременно становится проницаемой для Na^+ , что и объясняет реверсию знака

“отрицательного колебания” (рис. 4). Поскольку уже было известно, что концентрация Na^+ в цитозоле существенно меньше экстраклеточной и наоборот для K^+ , Овертон постулировал существование Na^+/K^+ обмена (Na^+/K^+ -АТФазы, как мы теперь знаем), который поддерживает Na^+/K^+ градиент, необходимый для возбудимости нервов и мышц.

Хотя Бернштейном впервые было дано правдоподобное описание функции клеточных мембран, их структурная и компонентная организация не была детализирована до появления электронной микроскопии в 1950-х гг. Тем не менее, исследуя эффекты местных анестетиков, немецкий фармаколог Ганс Мейер (1853–1939) и независимо Овертон показали, что чем выше коэффициент распределения масло / вода, т.е. липофильность соединения, тем больше его проницаемость через мембрану и выше эффективность наркоза. Этот факт привел их к заключению, что липоиды являются существенным компонентом клеточных мембран [22].

Дальнейшее развитие мембранная теория получила в работах голландских физиологов Эверта Гортера (Evert Gorter, 1881–1954) и Франсуа Гренделя (François Grendel, 1897–1969). Они предположили, что если внешняя поверхность клетки формируется липидами, то термодинамически выгодно, чтобы это был бислой, в котором полярные гидрофильные головки липидов обращены наружу в сторону водной среды, а гидрофобные хвосты обращены внутрь, изолируясь от водной среды. В этом случае площадь поверхности клетки должна быть вдвое меньше площади суммарного липидного монослоя. Для проверки своей идеи Гортер и Грендель использовали тени эритроцитов ряда млекопитающих и оценивали суммарную площадь поверхности известного количества клеток. Затем липиды экстрагировались ацетоном, и в камере Лэнгмюра–Блоджетт (Langmuir–Blodgett) формировался монослой. В соответствии с гипотезой, площадь последнего оказалось примерно вдвое больше суммарной площади поверхности эритроцитов [41]. Модель Гортера–Гренделя была дополнена британскими биохимиком Джеймсом Даниэлем (James Danielli, 1911–1964) и физиологом Хью Доусоном (Hugh Dawson, 1909–1996). Они рассматривали клеточную мембрану как липидный бислой с инкорпорированными белками, которые, в частности, обеспечивают его проницаемость для гидрофильных молекул, включая ионы [29].

Ионная теория возбудимости мембран

История науки оставила множество свидетельств того, что научный прогресс инициируется не только плодотворными идеями, но и нередко зависит от развития техники и методологических подходов. В формировании представлений о механизмах клеточной возбудимости решающую роль сыграло введение в практику электрофизиологических исследований препаратов гигантского аксона кальмара, а также микроэлектродной техники и регистрации биоэлектрических явлений с использованием методологии фиксации потенциала (voltage clamp), которые позволили напрямую измерять трансмембранный потенциал и ионные трансмембранные токи.

В 1936 г. британский зоолог и нейрофизиолог Джон Янг (John Young, 1907–1997), который исследовал головоногих моллюсков, описал трубчатые структуры диаметров 0.5–1 мм у кальмара и каракатицы, простиравшиеся от головы до хвоста [113]. Янг предположил, что эти структуры являются аксонами. В силу своей морфологии гигантский аксон кальмара вскоре стал стандартным препаратом в электрофизиологических исследованиях, начиная с пионерских работ американского биофизика Кеннета Коула (Kenneth Cole, 1900–1984) и британских нейрофизиолога Алана Ходжкина (Alan Hodgkin, 1914–1998) и биофизика Эндрю Хаксли (Andrew Huxley, 1917–2012).

Используя внеклеточные электроды и мостовую схему для измерения импеданса, Коул в соавторстве с американским биофизиком Говардом Кертисом (Howard Curtis, 1906–1972) обнаружили, что генерация потенциала действия сопровождается быстрым и кратковременным снижением сопротивления мембраны, что указывало на изменение ионной проницаемости мембраны аксона [25]. Вскоре Коулу и Кертису [28] и независимо Ходжкину и Хаксли [53] удалось инкорпорировать миниэлектроды в гигантский аксон, что позволило впервые непосредственно измерить потенциал покоя (порядка -50 мВ) и зарегистрировать потенциал действия. Было показано, что в соответствии с экспериментами Бернштейна, электрическая стимуляция аксона инициирует быстрое падение величины потенциала с последующей инверсией его знака. Последнее, как следовало из экспериментов Овертона, могло быть следствием кратковременного увеличения проницаемости мембраны для ионов Na^+ , что и было подтверждено эксперименталь-

но Ходжкиным и британским физиологом Бернардом Кацем (Bernard Katz, 1911–2003) [55].

Последующим шагом, обеспечившим существенный прогресс в электрофизиологии, было использование методологии фиксации потенциала, предложенной Джоржем Мармонтом (George Marmont), сотрудником Коула [26, 87]. Ключевым шагом было создание усилителей с обратной связью, обеспечивавшей контроль потенциала на мембране. Ходжкин и Хаксли в полной мере раскрыли потенциал этого подхода, внося ряд модификаций. Во-первых, они использовали двухэлектродную схему для фиксации потенциала, что позволило нивелировать ошибку, связанную с поляризуемостью электродов. Во-вторых, их устройство позволяло компенсировать сопротивление электродов, тем самым существенно ускоряя перезарядку емкости мембраны, что обеспечивало практически мгновенную (в масштабе характерных времен изменения токов) фиксацию потенциала на клеточной мембране. Этот подход позволил количественно исследовать ионные токи в гигантском аксоне кальмара, в частности установить их зависимость от мембранного потенциала и концентрации внеклеточных ионов и их кинетику в разных условиях.

Впервые ионные токи при фиксированном мембранном потенциале были зарегистрированы Ходжкиным и Хаксли в 1949 г. в соавторстве с Кацем [54]. Последующая серия работ, в которых менялись концентрации ионов Na^+ и K^+ в экстраклеточной среде, привела Ходжкина и Хаксли к заключению, что возбудимость клеточной мембраны детерминирована пассивными потоками ионов Na^+ и K^+ через мембрану, движущая сила которых определяется их электрохимическими градиентами. Проницаемость мембраны обеспечивается специфическими транспортными путями, скорее всего водными порами, т.е. ионными каналами в современной терминологии [56–60]. Кульминацией их исследований было создание электрического эквивалента мембраны аксона и математической модели генерации потенциала действия [61, 62].

С электрической точки зрения, по Ходжкину и Хаксли [61], мембрана гигантского аксона кальмара представляет собой электрическую емкость, соединенную параллельно с проводящими элементами (проводимостями) и источниками тока (электрическими батареями), которые являются электрическими эквивалентами электрохимического потенциала (рис. 6).

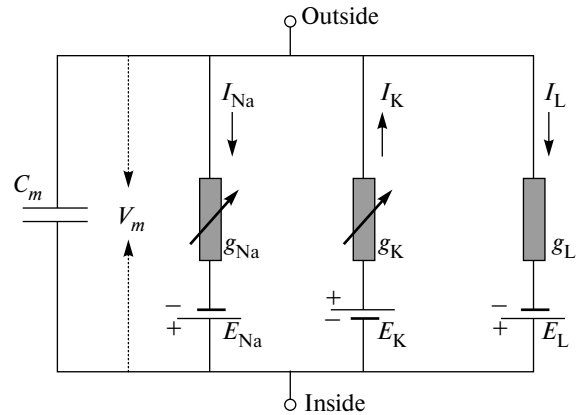


Рис. 6. Эквивалентная электрическая схема гигантского аксона кальмара [61].

Таким образом, ток через мембрану I_m складывается из трансмембранного тока ионов I_i и тока перезарядки емкости мембраны I_c :

$$I_m = I_i + I_c = I_i + C_m \frac{dV}{dt}. \quad (2)$$

Как следует из этого выражения, за исключением кратковременного скачкообразного перехода V с одного уровня на другой, в режиме фиксации потенциала $dV/dt = 0$ и поэтому $I_m = I_i$.

Входящие Na^+ и выходящие K^+ токи, I_{Na} и I_{K} , детерминируются потенциалзависимыми проводимостями g_{Na} и g_{K} , свойства которых меняются во времени при изменении мембранного потенциала, и электрохимическими градиентами с электрическими эквивалентами E_{Na} и E_{K} соответственно. Кроме того, имеется неспецифический ток утечки I_L , который ассоциируется с постоянной проводимостью g_L и E_L , близкой к нулю. В аналитическом виде при трансмембранном потенциале V :

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} (V - E_{\text{Na}}), \quad (3)$$

$$I_{\text{K}} = g_{\text{K}} (V - E_{\text{K}}), \quad (4)$$

$$I_L = g_L (V - E_L). \quad (5)$$

Измеряя Na^+ токи при различных потенциалах и аппроксимируя их временной ход экспоненциальными функциями, Ходжкин и Хаксли пришли к ряду предположений о механизмах их управления. Поскольку для K^+ проводимости была характерна только активация, для нее постулировался лишь активационный воротный механизм (gating particles), за который ответ-

ственные четыре n -частицы. Пересечь мембрану K^+ ионы могут только в случае, если все n -частицы одновременно находятся в требуемом состоянии, что дает уравнение:

$$g_K = n^4 \bar{g}_K, \quad (6)$$

где константа, n — фракция n -частиц в требуемом состоянии. При этом величина $1-n$ характеризует фракцию n -частиц в состоянии, при котором перенос ионов K^+ отсутствует. Переход между состояниями описывается реакцией первого порядка, что дает:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n = \frac{n_\infty - n}{\tau_n}, \quad (7)$$

α_n и β_n — потенциал-зависимые константы скорости переходов из состояния $1-n$ в состояние n и обратно.

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}, \quad (8)$$

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}. \quad (9)$$

Для граничных условий $n = n_0$ при $t = 0$, уравнение (6) имеет решение:

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0) \exp(-t / \tau_n). \quad (10)$$

Проводимость для ионов Na^+ контролируется двумя независимыми процессами активации и инактивации, которые были описаны двумя воротными механизмами — частицами m и h соответственно. Три m частицы ответственны за активацию, и одна h частица ответственна за инактивацию. Соответствующие кинетические уравнения имели следующий вид:

$$g_{Na} = m^3 h \bar{g}_{Na}, \quad (11)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1-m) - \beta_m m = \frac{m_\infty - m}{\tau_m}, \quad (12)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1-h) - \beta_h h = \frac{h_\infty - h}{\tau_h}, \quad (13)$$

$$\tau_m = \frac{1}{\alpha_m + \beta_m}, \quad (14)$$

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}, \quad (15)$$

$$\tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h}, \quad (16)$$

$$h_\infty = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h}, \quad (17)$$

где $\bar{g}_{Na}$ — константа, n и h — фракция активаци-

онных n -частиц и инактивационных h -частиц в требуемом состоянии; пары констант скоростей α_m, β_m и α_h, β_h имеют тот же смысл что и в уравнении (6). Решения уравнений (11) и (12) при начальных условиях $m = m_0$ и $h = h_0$ имеют вид:

$$m = m_\infty - (m_\infty - m_0) \exp(-t / \tau_m) \quad (18)$$

$$h = h_\infty - (h_\infty - h_0) \exp(-t / \tau_h) \quad (19)$$

Используя уравнения (2–15) Ходжкина и Хаксли, удалось не только количественно описать потенциал-зависимые ионные токи гигантского аксона кальмара, но и правильно предсказать возбудимость мембраны и ее свойства [61]. В частности, НН (Hodgkin and Huxley) модель правильно предсказывала электрический порог возбудимости, ее рефрактерность, форму потенциала действия и его амплитуду. Более того, рассматривая уравнение (2) как уравнение для плотности тока, Ходжкин и Хаксли вывели кабельное уравнение для потенциала действия в цилиндрическом аксоне с реальными геометрическими параметрами и показали, что НН-модель правильно предсказывала векторность его распространения и скорость [61, 62].

Внутриклеточный электрод

Анализ электрической возбудимости, проведенный Ходжкиным и Хаксли, революционизировал электрофизиологию в целом, привнес в нее не только ионную теорию, но и системность в аналитической обработке и представления данных. В тоже время использовавшаяся ими методология была адаптирована для гигантского аксона кальмара и не была применима для электрофизиологических исследований клеток большинства типов, характерный размер которых порядка 10 мкм. Развитие электрофизиологии одиночной клетки во многом связано с микроэлектродной техникой и технологией получения стеклянных микроэлектродов с субмикронным кончиком, который смог обеспечить минимально повреждающее проникновение в цитозоль клеток. Многие клетки выдерживали введение нескольких микроэлектродов, что обеспечивало регистрации в режиме фиксации потенциала в сочетании с электрофоретической инъекцией биологически активных соединений [101]. Весьма полезной оказалась возможность инъекции красителями для мечения клеток *in situ*, что позволяло идентифицировать их морфологию, локализацию и синаптические контакты с другими нейронами и мышечными клетками. Первая за-

документированная регистрация внутриклеточного потенциала с помощью микроэлектрода была проведена в лаборатории американского физиолога Ральфа Джерарда (Ralf Gerard, 1900–1974) его студентом Нингом Лингом (Ning Ling, 1919–2019) [85]. Микроэлектродная техника быстро стала ключевым электрофизиологическим подходом, который позволил исследовать электрогенез в самых разнообразных клетках от одноклеточных организмов до нейронов *in situ*.

Вал данных, полученных с помощью микроэлектродной техники, подтвердил основную идею ионной теории Ходжкина и Хаксли, что клеточная возбудимость определяется пассивными потоками ионов, прежде всего ионов Na^+ и K^+ , при участии специфических структур, впоследствии названных ионными каналами. В то же время определенные результаты свидетельствовали о том, что электрическая модель гигантского аксона кальмара не является универсальной и возбудимость мышечных клеток, сомы и дендрита нейронов детерминируются комбинациями различных потенциал-зависимых Na^+ , K^+ и Ca^{2+} каналов в сочетании с другими ионными каналами.

Развитие представлений об ионных каналах

Как мы теперь знаем, ионные каналы — это специализированные белковые структуры, которые формируют трансмембранную водную пору и обеспечивают селективный и управляемый транспорт ионов через клеточную мембрану по механизму электродиффузии [51]. Как уже упоминалось выше, электродиффузия ионов как первопричина возникновения биоэлектрических потенциалов была предложена Бернштейном, который предположил и экспериментально показал, что потенциал на мембране покоящейся мышечной клетки фактически определяется равновесным потенциалом для ионов K^+ , что предполагает ее высокую селективность для ионов K^+ . Кроме того, он показал, что при возбуждении нерва и мышцы величина потенциала на мембране падает (отрицательная флуктуация), и объяснил это явление тем, что во время возбуждения мембрана утрачивает свою избирательную селективность к K^+ и становится проницаемой для других ионов. Таким образом, по Бернштейну, избирательная проницаемость мембраны для ионов и наличие ионных градиентов могут служить основой для возникновения и изменения биопотенциалов. Эксперименты Ходжкина и Хаксли и их ионная теория электрической возбудимости клеточной мембраны предполагали существова-

ние независимых транспортных путей для Na^+ и K^+ , каждый из которых характеризуется специфической потенциал-зависимостью и динамическими свойствами. Эта идея была верифицирована в дальнейших экспериментах, в которых было показано, что тетродотоксин селективно блокирует потенциал-зависимые Na^+ токи [92], а тетраэтиламмоний блокирует K^+ токи [108].

Термин “ионный канал” применительно к проводимости мембраны, по-видимому, впервые используется в обзоре Каца о механизмах синаптической передачи [64] в контексте, который не предполагал какую-либо молекулярную структуру. Рассуждения о гипотетических водных порах для трансмембранного переноса ионов как отдельных молекул прослеживаются в ранних работах по анализу селективной проницаемости мембраны и эффектов соединений, которые специфически блокировали потенциал-зависимые Na^+ и K^+ токи [11, 12, 46–50]. Работы американцев, биофизика Бертила Хилле (Bertil Hille, автора электрофизиологической библии “Ion channels of excitable membranes”) и физиолога Клэя Армстронга (Clay M. Armstrong), в значительной степени инициировали эволюцию термина “ионный канал” из удобного эквивалента термина “проводимость” в концепцию молекулярной организации ионной проницаемости мембран [13, 48]. Ключевые, экспериментально выявляемые свойства пока еще гипотетических ионных каналов, такие как селективность, потенциал-зависимость, активация / инактивация, специфическая чувствительность к блокаторам, неявно предполагали их стабильную структуру, т.е. белковую природу. Поскольку действие блокаторов хорошо описывалось в рамках закона действующих масс для бимолекулярной реакции, это предполагало дискретность их клеточных мишеней. Между тем прямая верификация белковой природы проводящих элементов мембраны отсутствовала, хотя в ее пользу свидетельствовали эффекты протеаз на ионную проводимость клеточных мембран [103], а также данные, полученные с использованием искусственных мембран.

Пионерские работы в области реконструкции клеточной мембраны в искусственном липидном бислое были выполнены американскими учеными Паулем Миллером (Paul Mueller) и Дональдом Рудиным (Donald Rudin) [89, 90]. Они показали, что потенциал-зависимая проводимость может быть индуцирована в липидной мембране при встраивании определенных веществ, вклю-

чая антибиотики (alamethicin, monazomycin) и не идентифицированные белковые препараты, экстрагированные из бактерий и названные EIM (excitability inducing material). При достаточно малых концентрациях агентов, встраивающихся в липидный бислой (gramicidin A, некоторые белки), наблюдались дискретные флуктуации тока, которые могли отражать изменение проводимости водной поры при случайных переходах между открытым и закрытым состояниями [15, 52]. Подобные реконструкции потенциал-зависимой и ионоселективной проводимости путем модификации чистой липидной мембраны белковыми и пептидными препаратами привели к общему консенсусу [88]: (i) ионные каналы формируются мембранными белками; (ii) ионные каналы стохастически флуктуируют между дискретными состояниями — проводящим и непроводящим. В согласии с последним, корреляционный анализ ионных токов клеточных мембран показал, что спектры мощности флуктуаций токов хорошо описываются моделями ионного канала с дискретными уровнями проводимости и Марковской кинетикой переходов между ними [27]. Встал вопрос, можно ли зарегистрировать дискретные скачки тока на мембране клетки, ассоциирующиеся с активностью одиночных ионных каналов, как в случае искусственной мембраны? Ответ на этот вопрос обеспечили немецкие биофизик Эрвин Неер (Erwin Neher) и физиолог Берт Сакман (Bert Sakmann).

Patch clamp

Неер и немецкий физиолог Ганс Люкс исследовали ионные токи гигантского нейрона виноградной улитки *Helix pomatia*, в котором было трудно обеспечить изопотенциальность всей мембраны, что искажало характеристики токов. Им пришла мысль отводить токи с небольшого участка мембраны, который, как они ожидали, должен быть изопотенциальным, используя внеклеточную стеклянную пипетку, которой они присасывались к поверхности нейрона [93]. Далее, Неер и Сакман использовали этот подход в варианте с более миниатюрной пипеткой, чтобы изолировать фрагмент (patch) мембраны мышечной клетки достаточно малых размеров, тем самым сводя к минимуму количество активных никотиновых рецепторов — катионных каналы, активируемых ацетилхолином (ACh) [94].

При микронном кончике пипетки неспецифическая утечка была достаточно мала, что снижало шум, а мембрана пэпча содержала всего несколько

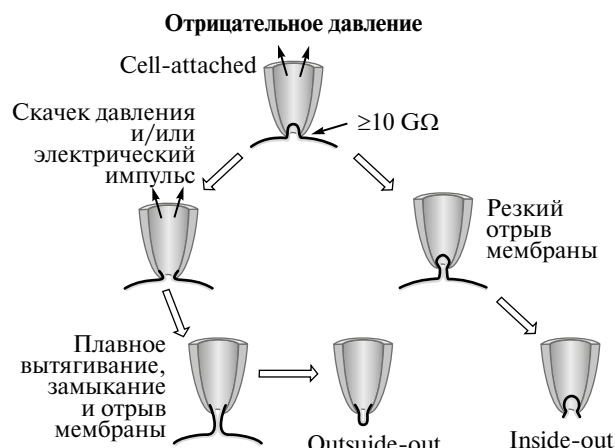


Рис. 7. Основные моды метода patch clamp.

никотиновых рецепторов, и поэтому ACh, имеющийся в пипетке, инициировал достаточно разрешимые дискретные скачкообразные флуктуации мембранного тока примерно одной амплитуды. Далее, эта методология, которая получила название patch clamp, была улучшена за счет ферментативной обработки клеточной мембраны и использования всасывающего давления, что позволило получать гигаомные сопротивления утечки в контакте пипетка / мембрана [44, 95]. Это позволило воспроизвести классические варианты электрофизиологических регистраций и даже получить новые возможности (рис. 7) [105].

Методология patch clamp получила Нобелевскую премию и повсеместное распространение, и обретенные с ее помощью данные окончательно верифицировали идею, что ионная проницаемость мембраны обеспечивается макромолекулярными водными порами, транспортная эффективность которых определяется стохастическими переходами между открытым и закрытым состояниями. Последующие многочисленные и значимые исследования ионных каналов принципиально не изменили эту концепцию, сформированную в 1980-е гг., хотя и существенно ее расширили. Так, молекулярное клонирование и гетерологичная экспрессия и структурные исследования подтвердили, что ионные каналы формируются трансмембранными белками, добавив, что они функционируют как олигомерные комплексы. Множество различных типов ионных каналов было идентифицировано, и их молекулярная организация была установлена [9, 19].

Сейчас мы знаем, что субъединицы K^+ каналов млекопитающих кодируются примерно 80 генами, из которых 32 гена кодируют ПЗ K^+

каналы [9]. Дюжина из них кодирует так называемые K^+ каналы задержанного выпрямления, для которых характерны медленная активация и отсутствие инактивации. Именно такие K^+ каналы исследовались Ходжкиным и Хаксли в гигантском аксоне кальмара. ПЗ K^+ каналы функционируют как октамер из четырех порообразующих α -субъединиц и четырех аксессуарных β -субъединиц, которые нековалентно связаны с гомотетрамером α -субъединиц и модулируют его активность [11, 91]. Каждая α -субъединица имеет в своем составе шесть трансмембранных α -спиральных фрагмента S1–S6, среди которых S5 и S6 участвуют в формировании поры, а S4, несущий положительно заряженные аргинины и лизины, является сенсором электрического потенциала [14, 40]. Таким образом, структурные данные свидетельствуют об удивительной предсказательной точности НН модели, которая предполагала четыре воротных частицы у ПЗ K^+ каналов задержанного выпрямления, которые действительно имеют четыре молекулярных сенсора электрического потенциала.

ПЗ Na^+ каналы также являются олигомером одной или двух аксессуарных β -субъединиц (5 генов) и порообразующей α -субъединицы (9 генов), которая является псевдотетрамером, поскольку состоит из четырех топологически гомологичных, ковалентно связанных доменов (D1–D4). Каждый домен, как и в случае ПЗ K^+ каналов, включает шесть трансмембранных α -спиральных фрагмента S1–S6, включая порообразующие S5 и S6 и электрический сенсор S4 [84, 114]. Внутриклеточная петля, соединяющая D1 и D4, ответственна за инактивацию ПЗ Na^+ каналов [9, 14]. Таким образом, в структуре ПЗ Na^+ каналов четыре элемента участвуют в его активации и один — в инактивации. Напомним, что НН модель постулировала три активационных и одну инактивационную частицы, что вполне соответствует структуре ПЗ Na^+ каналов.

ВКЛАД ШКОЛЫ П.Г. КОСТЮКА В РАЗВИТИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ

Платон Григорьевич Костюк начал свою научную деятельность еще будучи студентом Киевского университета, в лаборатории общей физиологии, которой руководил известный электрофизиолог Данил Семенович Воронцов. Он направил исследовательскую деятельность способного студента на изучение механизмов функционирования нервной системы, что в итоге оказалось судьбоносным решением, опреде-

лившим область интересов будущего академика. После окончания университета П.Г. Костюк фокусировался на изучении структурно-функциональной организации нервной системы и на разработке проблем молекулярной нейрофизиологии и биофизики клетки. Ему удалось впервые в СССР адаптировать микроэлектродную технику отведения, а затем и методологию фиксации потенциала для электрофизиологических исследований [4]. Первым серьезным научным достижением П.Г. Костюка можно считать исследование процессов возбуждения и торможения в двухнейронной рефлекторной дуге спинного мозга [5]. Ему, в частности, удалось охарактеризовать синаптические задержки возбуждающих и тормозных потенциалов в нейронах спинного мозга. Видимо, эти неординарные для того времени результаты, доложенные на конференции, привлекли внимание одного из корифеев нейрофизиологии — будущего Нобелевского лауреата Джона Эклса, который пригласил П.Г. Костюка на стажировку в свою лабораторию в г. Канберре (Австралия) [6]. Одним из итогов этой полугодовой научной командировки явилась классическая работа, в которой была сформулирована идея о двух системах пресинаптической регуляции синаптической передачи [30, 31]. Мне, однако, представляется, что наиболее значимым результатом этой поездки было соприкосновение с передовыми технологиями и познание вкуса решения самых актуальных задач нейрофизиологии. Во-всяком случае задачи, которые ставил и решал на протяжении своей научной деятельности П.Г. Костюк и его ученики, несомненно, были мирового уровня [10, 69–71].

Хотя научные достижения П.Г. Костюка многогранны, в контексте обзора данный раздел сфокусирован на более узкой цели — охарактеризовать ключевые результаты его школы, которые внесли весомый вклад в развитие электрофизиологии и биофизики мембран.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы

В настоящее время роль Ca^{2+} как вторичного медиатора и универсального регулятора внутриклеточных процессов хорошо обоснована [63]. Однако ионная теория возбудимости Ходжкина и Хаксли, разработанная для гигантского аксона кальмара и отводившая ключевую роль Na^+ и K^+ каналам, доминировала в 1950–1960-е гг., поскольку во многом подтверждалась экспериментами с миелинизированными нервами, скелетными и сердечными мышцами. В то же время

исследования возбудимости мышечных клеток принесли результаты, которые потребовали корректировки этой догмы, стимулировали исследования роли Ca^{2+} в клеточной физиологии и привели к открытию Ca^{2+} каналов.

В 1953 г. британские физиологи Пауль Фэтт (Paul Fatt, 1924–2014) и Бернард Кац исследовали электрофизиологические свойства разгибательной мышцы краба и описали неожиданный феномен – ПД сохранялся при замене экстраклеточного Na^+ на ТВА (tetrabutylammonium) [32]. Их интерпретация данного явления была очень осторожна: “...(i) it may be that TEA remains adsorbed to the fibre surface, but is mobilized during excitation and temporarily transferred into the cell interior; (ii) alternatively, influx of calcium or magnesium, or outflux of some internal anion may be responsible”. Пять лет спустя Фэтт и Бернард Гинсбург (Bernard Ginsborg, 1925–2018) показали, что потенциал действия может генерироваться в мышце в условиях, когда внеклеточный Na^+ эквимоллярно заменяется на Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+} [33]. Это было ясным свидетельством того, что ПД может поддерживаться входом Ca^{2+} , а также Sr^{2+} и Ba^{2+} . Аналогичные эксперименты П.Г. Костюка с сотрудниками показали, что гигантские нейроны улитки *Helix* сохраняют способность генерировать ПД при эквимоллярной замене Na^+ на Ca^{2+} и что ПД имеет Na^+ и Ca^{2+} компоненты [39, 86]. Независимо это также было продемонстрировано американскими нейрофизиологами Гедальдигом (D. Geduldig) и Юнгом (D. Junge) [37]. В серии работ Кац и мексиканский нейрофизиолог Рикардо Миледи (Ricardo Miledy, 1927–2017) исследовали нервно-мышечное сопряжение на препаратах лягушки и показали, что вход Ca^{2+} необходим для нормального высвобождения нейротрансмиттера ACh [65, 66]. Таким образом, достаточно высокая проницаемость возбудимых мембран для ионов Ca^{2+} сомнений не вызвала; были неясны механизмы Ca^{2+} проницаемости, например Ca^{2+} мог проникать через ПЗ Na^+ - или K^+ каналы.

Примерно в то же время американские нейрофизиологи японского происхождения Сусуму Хагивара (Susumu Hagiwara, 1922–1989) и Шигехиро Накажима (Shigehiro Nakajima) исследовали ПД в мышце рака и сердце лягушки [42]. Как и в экспериментах других электрофизиологов, возбудимость мышечных клеток обоих типов сохранялась при эквимоллярной замене внеклеточного Na^+ на Ca^{2+} , причем ТТХ полностью ингибировал натриевые ПД, но не ПД, генерируемые в кальциевых условиях, которые подавлялись экс-

траклеточным Mn^{2+} . Подобные данные, аккумулировавшиеся в различных лабораториях, свидетельствовали о том, что физиологически важный вход Ca^{2+} в клетки обеспечивается не Na^+ или K^+ каналами, а специфическими транспортными путями, вероятно, Ca^{2+} каналами.

Первая документированная регистрация ПЗ Ca^{2+} тока в условиях фиксации потенциала была выполнена в 1967 г. немецким фармакологом Харальдом Рейтером (Harald Reuter) на волокнах Пуркинье [102]. Им было показано, что Ca^{2+} переносит входящий ПЗ ток с потенциалом реверсии 150 мВ, что свидетельствовало о том, что внутриклеточная концентрация Ca^{2+} должна была быть на четыре порядка ниже экстраклеточной. Вскоре ПЗ Ca^{2+} токи были идентифицированы в сердечных клетках желудочка и предсердия [16, 104].

В нейрональных клетках ПЗ Ca^{2+} токи были впервые описаны в 1970 г. Олегом Крышталем и Игорем Магурой, сотрудниками П.Г. Костюка [80], и независимо американскими нейрофизиологами Гедальдигом (D. Geduldig) и Грюнером (R. Gruener) [38]. Разработанная в команде П.Г. Костюка методология внутриклеточной перфузии позволила провести серию классических исследований ПЗ Ca^{2+} каналов в различных нейрональных клетках и, в частности, очертить их потенциал-зависимость, кинетические свойства и чувствительность к блокаторам [67–69, 72]. Представляется, что ключевым результатом этих, во многом пионерских работ была демонстрация того, что ПЗ Ca^{2+} каналы находятся под строгим метаболическим контролем, в частности регулируются сАМР-зависимым фосфорилированием [34, 75].

Вполне осознавая, что вход наружного Ca^{2+} через Ca^{2+} каналы – это лишь часть сценария внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации, П.Г. Костюк и его сотрудники были одними из первых, кто внедрил и развивал методологию мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} [17, 77, 78]. Собственные интересные результаты и состояние дел в этой сфере в целом были обобщены П.Г. Костюком в монографии, которая была первой в области внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации [79].

Внутриклеточная перфузия

По мере накопления данных об ионной проницаемости плазмалеммы различных клеток становилось ясно, что интерпретация электрофизиологических данных требует точной оценки величины ионных градиентов, которые к тому же

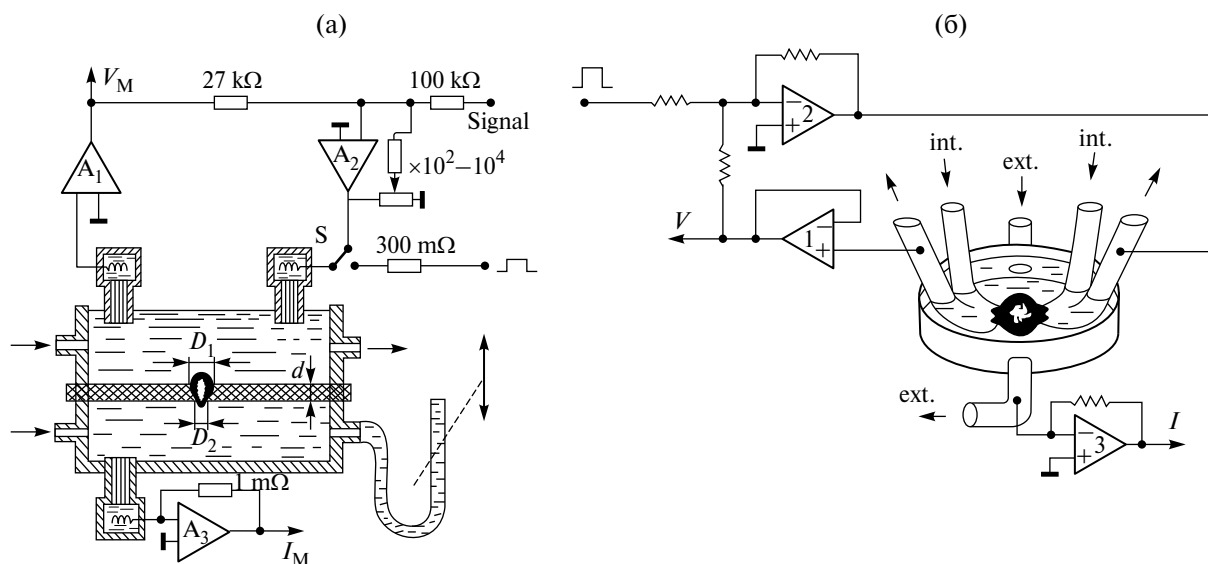


Рис 8. Внутриклеточная перфузия.

могли достаточно сильно варьировать в процессе регистрации за счет больших ионных токов, инициируемых деполяризацией. Кроме того, ряд фактов свидетельствовал о том, что ионные каналы находятся под метаболическим контролем, что требовало изучения соответствующих механизмов. Возникла потребность в той или иной степени контролировать внутриклеточную среду, что привело к идее внутриклеточной перфузии, и команда П.Г. Костюка была одной из первых, кто осознал такую необходимость [76].

В первоначальном варианте идея внутриклеточной перфузии была реализована для гигантских нейронов улитки следующим образом [7]. В пленке из парафилма (parafilm) делалось коническое отверстие с диаметром поры меньше, чем размер клетки. Пленка закреплялась между двумя независимо перфузируемыми отсеками электрофизиологической камеры (рис. 8а). Клетка подводилась к отверстию и засасывалась, для чего в нижнем отсеке устанавливалось пониженное по отношению к верхнему давление. После этого прикладывался кратковременный скачок пониженного давления, что приводило к разрушению части мембраны, обращенной в узкую часть конуса, и обеспечивало достаточно быстрый (несколько минут) диффузионный обмен между цитозолем и нижним отсеком, заполненным внутриклеточным раствором. Обычно это также обеспечивало улучшение контакта мембрана клетки–пластик и, следовательно, значительно уменьшало электрическую утечку между нижним отсеком и верхним, заполнен-

ным экстраклеточным раствором. В дальнейшей модификации идея внутриклеточной перфузии была реализована с помощью одной или двух перфузируемых пипеток (рис. 8б) [73]. Именно этот подход позволил команде П.Г. Костюка получить ряд пионерских результатов [67, 69, 70]. От перфузируемой пипетки (рис. 8б) до метода patch clamp (рис. 7) было рукой подать.

TTX-резистентные Na^+ каналы

Как уже отмечалось выше, 9 генов кодируют α -субъединицы ПЗ Na^+ каналов млекопитающих — $Na_v1.1$ – $Na_v1.9$ [114]. Хотя с момента описания ПЗ Na^+ токов в гигантском аксоне кальмара Ходжкиным и Хаксли долгое время считалось, что чувствительность к наномолярному ТТХ является их визитной карточкой, впоследствии оказалось, что в сенсорных нейронах и клетках некоторых других типов имеется ПЗ Na^+ токи, не чувствительные к ТТХ. Еще одной характерной особенностью этих Na^+ токов является медленная инактивация. Приоритет в открытии ТТХ-нечувствительных ПЗ Na^+ токов принадлежит П.Г. Костюку и его ученикам [3, 74]. На данный момент установлено, что сайт связывания ТТХ локализован на α -субъединицах и что α -субъединицы $Na_v1.1$ – $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ и $Na_v1.7$ формируют ТТХ-чувствительные Na^+ каналы, ингибируемые при наномолярных концентрациях токсина. Так называемые ТТХ-резистентные Na^+ каналы формируются $Na_v1.5$, $Na_v1.8$, и $Na_v1.9$, которые ингибируются лишь при микромолярных дозах ТТХ [106].

Протон-активируемые Na^+ каналы

Практически все биохимические процессы рН-зависимы, и потому поддержание гомеостаза внутриклеточного протона и мониторинг экстраклеточного рН являются важными задачами физиологии клетки. Для мониторинга внеклеточного протона клетки используют несколько молекулярных сенсоров, включая GPCR (G-protein coupled receptor) рецепторы нескольких типов и ионные каналы, активность которых зависит от рН экстраклеточной среды, включая ASIC, TRP, K2P [98]. Ионные каналы ASIC (acid-sensing ion channel) представляют собой протон-активируемые Na^+ каналы, которые вовлечены в ряд нормальных и патологических процессов, включая формирование болевого ощущения [98, 107, 115]. ASIC-каналы функционируют в виде гомо- или гетеротримеров субъединиц, которые у млекопитающих кодируются четырьмя генами. Моментом открытия ASIC-каналов можно считать первую регистрацию протон-активируемого тока в сенсорных нейронах крысы и нейроblastоме мыши, которая была выполнена О.А. Крышталем и В.И. Пидопличко [81]. Они же предположили существование протон-активируемых Na^+ каналов [81], что позже подтвердилось молекулярным клонированием [111], а также то, что эти каналы могут быть медиаторами боли [82].

P2X рецепторы

В начале 1960-х гг. британский физиолог и фармаколог Джеффри Бернсток (Geoffrey Burnstock, 1929–2020 гг.) и его ученики исследовали гладкомышечную мускулатуру толстой кишки морской свинки, сократительная активность которой, как уже было известно, контролируется симпатическим и парасимпатическим нервами, высвобождающими норадреналин и ацетилхолин. Ими было обнаружено, что в присутствии атропина и бретилия, ингибирующих холинергическую и адренергическую нейротрансмиссию соответственно стимуляция нерва инициировала гиперполяризацию гладкомышечных клеток [20]. Это свидетельствовало о том, что помимо ацетилхолина и норадреналина нерв способен высвобождать еще один нейротрансмиттер, который позже был идентифицирован как АТР [21]. Это была работа, которая, по сути, ознаменовала появление нового направления в межклеточных коммуникациях — пуринергической сигнализации. В данный момент известно, что в геноме млекопитающих 8 генов кодируют метаботропные P2Y пурино-

рецепторы, агонистами которых являются АТР, АДФ, УТР, UDP или UDP-глюкоза, 4 гена кодируют метаботропные P1 рецепторы аденозина, и 7 генов кодируют ионотропные P2X рецепторы, которые являются катионными каналами, активируемые АТР [21].

Следует отметить, что впервые АТР-стимулируемый катионный ток был зарегистрирован в гладкомышечных клетках артерии кролика американскими физиологами Кристофером Бенхамом (Christopher Benham) и фармакологом Ричардом Тзиеном (Richard Tsien, 1952–2016) [18]. В нейронах активность P2X рецепторов впервые была описана сотрудниками П.Г. Костюка — О.А. Крышталем, С.М. Марченко и А.Г. Обуховым [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя приведенный выше фактологический материал не исчерпывает все грани и объем исследований, проводившихся Платоном Григорьевичем Костюком и его учениками, только приведенные факты оставляют мало сомнения в том, что П.Г. Костюк и его школа внесли существенный методологический и концептуальный вклад в исследования ионных каналов и тем самым в развитие современных представлений о механизмах клеточного электрогенеза.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00609-24-02 от 12.04.2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брезжестовский П. Миссионер в науке // Троицкий вариант. 2010. № 54. С. 8.
2. Бертолон П. Об электрической материи тела человеческого, в здоровом и болезненном состоянии. Унив. тип., у В. Огорокова. М. 1789. 454 с.
3. Веселовский Н.С., Костюк П.Г., Цыдренко А.Я. “Медленные” натриевые каналы в соматической мембране нейронов спинальных ганглиев новорожденных крыс // Доклады АН СССР. 1980. Т. 250. № 1. С. 216–218.
4. Костюк П.Г. Микроэлектродная техника. Издательство АН УССР. Киев. 1960. 131 с.
5. Костюк П.Г. Двухнейронная рефлекторная дуга. Медгиз. М. 1959. 256 с.
6. Костюк П.Г. Над океаном времени. Наукова думка. Киев. 2005. 199 с.
7. Крыштал О.А., Пидопличко В.П. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология. 1975. Т. 7. С. 327–329.

8. *Ajita R.* Galen and his contribution to anatomy: A Review // *J. Evol. Med. Dent. Sci.* 2015. V.4. № 26. P. 4509–4516.
<https://doi.org/10.14260/jemds/2015/651>
9. *Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A. et al.* The concise guide to pharmacology 2021/22: Ion channels // *Br. J. Pharm.* 2021. V. 178. P. S157–S245.
<https://doi.org/10.1111/bph.15539>
10. *Araki T., Ito M., Kostyuk P.G., Oscarsson O., Oshima T.* Injection of alkaline cations into cat spinal motoneurons // *Nature* 1962. V. 196. P. 1319–1320.
<https://doi.org/10.1038/1961319a0>
11. *Armstrong C.M., Binstock L.* Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride // *J. Gen. Physiol.* 1965. V. 48. № 5. P. 859–872.
<https://doi.org/10.1085/jgp.48.5.859>
12. *Armstrong C.* Interference of injected tetra-n-propyl-ammonium bromide with outward sodium ion current in squid giant axons // *Nature*. 1966. V. 211. № 5945. P. 322–323.
<https://doi.org/10.1038/211322a0>
13. *Armstrong C.M.* Ionic pores, gates, and gating currents // *Q. Rev. Biophys.* 1974. V. 7. № 2. P. 179–210.
<https://doi.org/10.1017/s0033583500001402>
14. *Armstrong C.M., Hollingworth S.* Na⁺ and K⁺ channels: history and structure // *Biophysical J.* 2021. V. 120. № 5. P. 756–763.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.013>
15. *Bean R.C., Shepherd W.C., Chan H. et al.* Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes // *J. Gen. Physiol.* 1969. V. 53. № 6. P. 741–757.
<https://doi.org/10.1085/jgp.53.6.741>
16. *Beeler G.W., Jr., Reuter H.* Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres // *J. Physiol.* 1970. V. 207. № 1. P. 191–209.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009056>
17. *Belan P., Kostyuk P., Snitsarev V., Tepikin A.* Calcium clamp in isolated neurons of the snail *Helix pomatia* // *J. Physiol.* 1993. V. 462. P. 47–58.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019542>
18. *Benham C.D., Tsien R.W.* A novel receptor-operated Ca-permeable channel activated by ATP in smooth muscle // *Nature* 1987. V. 328. № 6127. P. 275–278.
<https://doi.org/10.1038/328275a0>
19. *Bezánilla F.* Ion channels: From conductance to structure // *Neuron* 2008. V. 60. № 3. P. 456–468.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.035>
20. *Burnstock G., Campbell G., Bennett M., Holman M.E.* Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli // *Nature* 1963. V. 200. P. 581–582.
<https://doi.org/10.1038/200581a0>
21. *Burnstock G.* Purinergic signalling: from discovery to current developments // *Exp. Physiol.* 2014. V. 99. № 1. P. 16–34.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>
22. *Carmeliet E.* From Bernstein's rheotome to Neher-Sakmann's patch electrode. The action potential // *Physiol. Rep.* 2019. V. 7. № 1. e13861.
23. *Cobb M.* Timeline: Exorcizing the animal spirits: Jan Swammerdam on nerve function // *Nature Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. № 5. P. 395–400.
<https://doi.org/10.1038/nrn806>
24. *Cohen I.B.* Benjamin Franklin's experiments. Harvard University Press. Cambridge. 1941. 451 p.
25. *Cole, K.S., Curtis H.J.* Electric impedance of the squid giant axon during activity // *J. Gen. Physiol.* 1939. V. 22. № 5. P. 649–670.
<https://doi.org/10.1085/jgp.22.5.649>
26. *Cole K.S.* Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane // *Arch. Sci. Physiol.* 1949. V. 3. P. 253–258.
27. *Conti F., Wanke E.* Channel noise in nerve membranes and lipid bilayers // *Q. Rev. Biophys.* 1975. V. 8. № 4. P. 451–506.
<https://doi.org/10.1017/s0033583500001967>
28. *Curtis H.J., Cole K.S.* Membrane action potentials from the squid giant axon // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1940. V. 15. № 2. P. 147–157.
<https://doi.org/10.1002/JCP.1030150204>
29. *Danielli J.F., Davson H.* A contribution to the theory of permeability of thin films // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1935. V. 5. № 4. P. 495–508.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030050409>
30. *Eccles J.C., Kostyuk P.G., Schmidt R.F.* Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres // *J. Physiol.* 1962. V. 161. № 2. P. 237–257.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006884>
31. *Eccles J.C., Kostyuk P.G., Schmidt R.F.* Presynaptic inhibition of the central actions of flexor reflex afferents // *J. Physiol.* 1962. V. 161. P. 258–281.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006885>
32. *Fatt P., Katz B.* The electrical properties of crustacean muscle fibres // *J. Physiol.* 1953. V. 120. № 1–2. P. 171–204.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1953.sp004884>
33. *Fatt P., Ginsborg B.L.* The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres // *J. Physiol.* 1958. V. 142. № 3. P. 516–543.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1958.sp006034>
34. *Fedulova S.A., Kostyuk P.G., Veselovsky N.S.* Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP // *Brain Res.* 1981. V. 214. № 1. P. 210–214.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90457-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90457-1)
35. *Finkelstein G.* Mechanical neuroscience: Emil du Bois-Reymond's innovations in theory and practice // *Front. Syst. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 133.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00133>
36. *Galvani L.* De viribus electricitatis in motu musculari. Commentarius. (Commentary on the effects of electricity on muscular motion). De Bononiesi Scientarium et Ertium Instituto atque // *Academia Commentarii.* 1791. V. 7. P. 363–418.
37. *Geduldig D., Junge D.* Sodium and calcium components of action potential in the *Aplysia* giant neurone // *J. Physiol.* 1968. V. 199. № 2. P. 347–365.

- <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008657>
38. *Geduldig D., Gruener R.* Voltage clamp of the Aplysia giant neurone: early sodium and calcium currents // *J. Physiol.* 1970. V. 211. № 1. P. 217–244.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009276>
 39. *Gerasimov V.D., Kostyuk, P.G., Maiskii V.A.* The influence of divalent cations on the electrical characteristics of membranes of giant neurons // *Biofizika* 1965. V. 10. P. 447–453.
 40. *González C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I. et al.* K⁺ channels: function-structural overview // *Compr. Physiol.* 2012. V. 2. № 3. P. 2087–2149.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
 41. *Gorter E., Grendel F.* On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood // *J. Exp. Med.* 1925. V. 41. № 4. P. 439–443.
<https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>
 42. *Hagiwara S., Nakajima S.* Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions // *J. Gen. Physiol.* 1966. V. 49. № 4. P. 793–806.
<https://doi.org/10.1085/jgp.49.4.793>
 43. *Hales S.* Statical essays: containing haemastaticks. V. 2. W. Innys et al. London. 1733.
 44. *Hamill O., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflügers Arch.* 1981. V. 391. № 2. P. 85–100.
<https://doi.org/10.1007/BF00656997>
 45. *Hunter J.* Anatomical Observations on the Torpedo // *Philosoph. Transac.* 1773. V. 63. P. 481–489.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1773.0040>
 46. *Hille B.* The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion // *J. Gen. Physiol.* 1967. V. 50. № 5. P. 1287–1302.
<https://doi.org/10.1085/jgp.50.5.1287>
 47. *Hille B.* Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve // *J. Gen. Physiol.* 1968. V. 51. № 2. P. 199–219.
<https://doi.org/10.1085/jgp.51.2.199>
 48. *Hille B.* Ionic channels in nerve membranes // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1970. V. 21. P. 1–32.
[https://doi.org/10.1016/0079-6107\(70\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0079-6107(70)90022-2)
 49. *Hille B.* The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve // *J. Gen. Physiol.* 1971. V. 58. № 6. P. 599–619.
<https://doi.org/10.1085/jgp.58.6.599>
 50. *Hille B.* The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve // *J. Gen. Physiol.* 1972. V. 59. № 6. P. 637–658.
<https://doi.org/10.1085/jgp.59.6.637>
 51. *Hille B.* Ion channels of excitable membranes (3rd ed). Sinauer. Sunderland (Mass). 2001. 814 p.
 52. *Hladky S.B., Haydon D.A.* Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics // *Nature* 1970. V. 225. № 5231. P. 451–453.
<https://doi.org/10.1038/225451a0>
 53. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* Action potentials recorded from inside a nerve fibre // *Nature* 1939. V. 144. P. 710–711.
<https://doi.org/10.1038/144710A0>
 54. *Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B.* Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid // *Arch. Sci. Physiol.* 1949. V. 3. P. 129–150.
 55. *Hodgkin A.L., Katz B.* The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid // *J. Physiol.* 1949. V. 108. № 1. P. 37–77.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1949.sp004310>
 56. *Hodgkin A.L.* The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle // *Biol. Rev.* 1951. V. 26. № 4. P. 339–409.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1951.tb01204.x>
 57. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* 1952. V. 116. № 4. P. 449–472.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004717>
 58. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* 1952. V. 116. № 4. P. 473–496.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004718>
 59. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* 1952. V. 116. № 4. P. 497–506.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004719>
 60. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* Movement of sodium and potassium ions during nervous activity // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1952. V. 17. P. 43–52.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1952.017.01.007>
 61. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *J. Physiol.* 1952. V. 117. № 4. P. 500–544.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
 62. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* Propagation of electrical signals along giant nerve fibers // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1952. V. 140. № 899. P. 177–183.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1952.0054>
 63. *Islam M.S.* Calcium signaling: From basic to bedside // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. V. 1131. P. 1–6.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_1
 64. *Katz B.* Mechanisms of synaptic transmission // *Rev. Mod. Phys.* 1959. V. 31. № 2. P. 524–531.
<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.31.524>
 65. *Katz B., Miledi R.* Ionic requirements of synaptic transmitter release // *Nature* 1967. V. 215. № 5101. P. 651.
<https://doi.org/10.1038/215651a0>
 66. *Katz B., Miledi R.* The role of calcium in neuromuscular facilitation // *J. Physiol.* 1968. V. 195. № 2. P. 481–492.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008469>
 67. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Doroshenko P.A.* Calcium currents in snail neurones. I. Identification of calcium current // *Pflügers Arch.* 1974. V. 348. № 2. P. 83–93.
<https://doi.org/10.1007/BF00586471>
 68. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Doroshenko P.A.* Calcium cur-

- rents in snail neurones. II. The effect of external calcium concentration on the calcium inward current // *Pflugers Arch.* 1974. V. 348. № 2. P. 95–104.
<https://doi.org/10.1007/BF00586472>
69. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* Effects of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // *Nature* 1975. V. 257. № 5528. P. 691–693.
<https://doi.org/10.1038/257691a0>
 70. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* Asymmetrical displacement currents in nerve cell membrane and effect of internal fluoride // *Nature* 1977. V. 267. № 5606. P. 70–72.
<https://doi.org/10.1038/267070a0>
 71. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Shakhovalev Y.A.* Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurons // *J. Physiol.* 1977. V. 270. № 3. P. 545–568
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011968>
 71. *Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Fedulova S.A.* Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents // *Neurosci.* 1981. V. 6. № 5. 2431–2437.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90090-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90090-7)
 72. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* Intracellular perfusion // *J. Neurosci. Methods* 1981. V. 4. № 3. P. 201–210.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(81\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(81)90032-7)
 73. *Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Tsyndrenko A.Y.* Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents // *Neurosci.* 1981. V. 6. № 2. P. 2423–2430.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90088-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90088-9)
 74. *Kostyuk P.G.* Metabolic control of ionic channels in the neuronal membrane // *Neurosci.* 1984. V. 3. № 4. P. 983–989.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90282-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90282-3)
 75. *Kostyuk P.G.* Intracellular perfusion of nerve cells and its effects on membrane currents // *Physiol. Rev.* 1984. V. 64. № 2. P. 435–454.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.2.435>
 76. *Kostyuk P.G., Belan P.V., Tepikin A.V.* Free calcium transients and oscillations in nerve cells // *Exp. Brain Res.* 1991. V. 83. № 2. P. 459–464.
<https://doi.org/10.1007/BF00231173>
 78. *Kostyuk P.G., Kirischuk S.I.* Spatial heterogeneity of caffeine- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} transients in isolated snail neurons // *Neurosci.* 1993. V. 53. № 4. P. 943–947.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90479-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90479-y)
 79. *Kostyuk P., Verkhratsky A.* Calcium signalling in the nervous system. Wiley & Sons. Chichester, 1995. 220 p.
 80. *Krishtal O.A., Magura I.S.* Calcium ions as inward current carriers in mollusk neurons // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 85. № 4. P. 857–866.
[https://doi.org/10.1016/0010-406x\(70\)90080-0](https://doi.org/10.1016/0010-406x(70)90080-0)
 81. *Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* A receptor for protons in the nerve cell membrane // *Neurosci.* 1980. V. 5. № 12. P. 2325–2327.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90149-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90149-9)
 82. *Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception // *Neurosci.* 1981. V. 6. № 12. P. 2599–2601.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90105-6)
 83. *Krishtal O.A., Marchenko S.M., Obukhov A.G.* Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons // *Neurosci.* 1988. V. 27. № 3. P. 995–1000.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90203-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90203-5)
 84. *Kruger L.C., Isom L.L.* Voltage-Gated Na^+ Channels: Not just for conduction. Cold Spring Harb // *Perspect. Biol.* 2016. V. 8. № 6. a02926.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029264>
 85. *Ling G.N., Gerard R.W.* The normal membrane potential of frog sartorius fibers // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1949. V. 34. № 3. P. 383–396.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030340304>
 86. *Magura I.S.* Action potentials of the mollusc giant neurons in solutions with a change in sodium and calcium concentrations // *Neurophysiol.* 1969. V. 1. P. 109–117.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008657>
 87. *Marmont G.* Studies on the axon membrane; a new method // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1949. V. 34. № 3. P. 351–382.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030340303>
 88. *Miller C.* Ion Channel Reconstitution. Springer New York, New York, 1984. 577 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1361-9>
 89. *Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C.* Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system // *Nature.* 1962. V. 194. P. 979–980.
<https://doi.org/10.1038/194979a0>
 90. *Mueller P., Rudin D.O.* Induced excitability in reconstituted cell membrane structure // *J. Theor. Biol.* 1963. V. 4. № 3. P. 268–280.
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(63\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(63)90006-7)
 91. *Nakajo K., Kasuya G.* Modulation of potassium channels by transmembrane auxiliary subunits via voltage-sensing domains // *Physiol. Rep.* 2024. V. 12. № 6. e15980.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15980>
 92. *Narahashi T.J., Moore J.W., Scott W.R.* Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon // *J. Gen. Physiol.* 1964. V. 47. № 5. P. 965–974.
<https://doi.org/10.1085/jgp.47.5.965>
 93. *Neher E., Lux H.D.* Voltage clamp on Helix pomatia neuronal membrane; current measurement over a limited area of the soma surface // *Pflugers Arch.* 1969. V. 311. № 3. P. 272–277.
<https://doi.org/10.1007/BF00590532>
 94. *Neher E., Sakmann B.* Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres // *Nature.* 1976. V. 260. № 5554. P. 799–802.
<https://doi.org/10.1038/260799a0>
 95. *Neher E., Sakmann B., Steinbach J.H.* The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through indi-

- vidual open channels in biological membranes // Pflugers Arch. 1978. V. 375. № 2. P. 219–228.
<https://doi.org/10.1007/BF00584247>
96. *Newton I.* Principia Mathematica. Sir Isaac Newton's Mathematical Principles of Natural Philosophy and his System of the World: translated into English by Andrew Motte in 1729. University of California Press. Berkeley. 1934. 680 p.
 97. *Nilius B.* Pflügers Archiv and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp // Pflugers Arch. 2003. V. 447. P. 267–271.
<https://doi.org/10.1007/s00424-003-1156-2>
 98. *Pattison L.A., Callejo G., St. John. Smith. E.* Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2019. V. 374. № 1785. 20190291.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0291>
 99. *Piccolino M.* Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani // Brain Res. Bull. 1998. V. 46. № 5. P. 381–407.
[https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00026-4)
 100. *Piccolino M.* A “Lost time” between science and literature: the “Temps Perdu” from Hermann von Helmholtz to Marcel Proust // Audiologic. Med. 2009. V. 1. № 4. P. 261–270.
<https://doi.org/10.1080/16513860310023218>
 101. *Purves R.D.* Ed. Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis. Academic Press, London. 1981. 146 p.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1982.sp002669>
 102. *Reuter H.* The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration // J. Physiol. 1967. V. 192. № 2. P. 479–492.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1967.sp008310>
 103. *Rojas E., Armstrong C.* Sodium conductance activation without inactivation in pronase-perfused axons // *Nature: New Biology*. 1971. V. 229. № 6. P. 177–178.
<https://doi.org/10.1038/newbio229177a0>
 104. *Rougier O., Vassort G., Garnier D., Gargouil Y.M., Coraboeuf E.* Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential // Pflugers Arch. 1969. V. 308. № 2. P. 91–110.
<https://doi.org/10.1007/BF00587018>
 105. *Sakmann B., Neher E.* Eds. Single channel recording. Second edition. Plenum Press, New York, 1995. 700 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1229-9>
 106. *Sanchez-Sandoval A.L., Hernández-Plata E., Gomora J.C.* Voltage-gated sodium channels: from roles and mechanisms in the metastatic cell behavior to clinical potential as therapeutic targets // Front. Pharmacol. 2023. V. 14. 1206136.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1206136>
 107. *Storozhuk M., Cherninskyi A., Maximyuk O. Isaev D., Krishtal O.* Acid-sensing ion channels: Focus on physiological and some pathological roles in the brain // Curr. Neuropharmacol. 2021. V. 19. № 9. P. 1570–1589.
<https://doi.org/10.2174/1570159X19666210125151824>
 108. *Tasaki I., Hagiwar A.S.* Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride // J. Gen. Physiol. 1957. V. 40. № 6. P. 859–885.
<https://doi.org/10.1085/jgp.40.6.859>
 109. *Verkhatsky A., North A.R., Petersen O.H., Krishtal O.* In memoriam: Platon Kostyuk (1924–2010) // Cell Calcium. 2010. V. 44. № 1. P. 91–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.07.003>
 110. *Volta A.* On the electricity excited by the mere contact of conducting substances of different kinds // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1800. P. 403–431.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1800.0018>
 111. *Waldmann R., Champigny G., Bassilana F. Heurteaux, C., Lazdunski, M.* A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // Nature. 1997. V. 386. № 6621. P. 173–177.
<https://doi.org/10.1038/386173a0>
 112. *Walsh J.* Of the Electric Property of the Torpedo // *Philosophical Transactions*. 1773. V. 63. P. 461–480.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1773.0039>
 113. *Young J.Z.* Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1936. V. 4. № 5. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1936.004.01.001>
 114. *Xu L., Ding X., Wang T. Mou S., Sun H., Hou T.* Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling // Drug Discovery Today. 2019. V. 24. № 7. P. 1389–1397.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.014>
 115. *Zhu Y., Hu X., Wang L. Zhang J., Pan X., Li Y. et al.* Recent advances in acid-sensitive ion channels in central nervous system diseases // Curr. Pharm. Des. 2022. V. 28. № 17. P. 1406–1411.
<https://doi.org/10.2174/1381612828666220422084159>

Evolution of Conception of Cell Electrogenesis and Excitability and Electrophysiological School of P.G. Kostuk

S. S. Kolesnikov

*Institute of Cell Biophysics, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, 142290 Russia*

e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Abstract — The formation and evolution of cell physiology in USSR was associated with the academician Platon Kostuk, an outstanding world-renowned scientist. His scientific activity occurred in the second half of 20th century, the period of burst-like progress in electrophysiology that provided a number of remarkable results rewarded with three Nobel prizes. In biology of that time, electrophysiology was the only field, wherein methods and approaches were developed for the on-line analysis of physiological processes in cells and tissues. The goal of the given essay is to highlight retrospective aspects of the bioelectricity concept and to characterize the related contribution of the electrophysiological school of P.G. Kostuk to the field.

Keywords: electrophysiology, electrical excitability. Ion channels, voltage clamp, patch clamp